

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen May

Charakterisierung CD4⁺ PD-1⁺ T-Zellen im Blut gesunder Menschen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Frederik Bitzer
aus Dortmund

Hamburg 2021

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **30.06.2022**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: **Prof. Dr. Eva Tolosa**

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: **PD Dr. Thomas Jacobs**

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.2	Das adaptive Immunsystem	2
1.2.1	Imitation der physiologischen T-Zell – Stimulation <i>in vitro</i>	4
1.2.2	Charakteristika von T-Effektor Zellen.....	4
1.2.3	Regulierende T-Zellpopulationen und Zytokine.....	6
1.3	Koinhibitorische Rezeptoren	7
1.3.1	PD-1.....	8
1.3.2	CTLA-4	10
1.3.3	LAG-3	10
1.3.4	Tim-3	11
1.3.5	Differenzierung von T-Effektorzellen	12
1.4	Malaria.....	14
1.4.1	Epidemiologie und Klinik.....	14
1.4.2	CD4 ⁺ T-Zellen im Rahmen einer Malariainfektion	15
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2	MATERIAL	19
2.1	Laborgeräte	19
2.2	Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren.....	19
2.3	Verwendete Chemikalien	20
2.4	Kits für zellbiologische Arbeiten	21
2.5	Verwendete Antikörper.....	22
2.6	Zusammensetzung der Probanden.....	22
2.7	Software	24
2.8	Ethik.....	24
3	METHODEN	25
3.1	Allgemeine Einführung in die zugrundeliegenden Methoden	25
3.1.1	Blutentnahmen.....	25
3.1.2	Zentrifugations- und Kühlungsmanagement.....	25
3.1.3	Bestimmung der Zellzahlen.....	25
3.1.4	Durchflusszytometrie und Zellsortierung	25
3.2	Konkrete Anwendung der verwendeten Methoden.....	26
3.2.1	Ex-vivo-Färbung von Oberflächen- und intrazellulären Rezeptoren.....	26
3.2.1.1	Analyse der durchflusszytometrischen Daten	27
3.2.2	Durchführung der Suppression Assays.....	27
3.2.2.1	Isolation von PBMCs aus peripher gewonnenem Blut.....	29
3.2.2.2	Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen aus PBMCs durch Bead-basierte Zellseparation	29
3.2.2.3	Färbung und Sortierung der CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulation mittels FACS	30
3.2.2.4	Kultivierung und Stimulation der Zellpopulationen.....	31

3.2.2.5	Messung der Proliferation durch Zugabe von ³ H-Thymidin	33
3.2.2.6	Bestimmung des Zytokinprofils der untersuchten Zellpopulationen.....	33
3.3	Statistische Analyse.....	33
4	ERGEBNISSE.....	34
4.1	Untersuchung des regulatorischen Potentials humaner CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gesunder Menschen.....	34
4.1.1	Ergebnisse der Suppressionsassays	35
4.2	Zytokinkonzentrationen in Assoziation zu immunregulatorischen T-Zellen im Vergleich.....	38
4.2.1	Das Zytokinprofil von stimulierten CD4 ⁺ T-Zellen, die mit CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen oder Regulatorischen T-Zellen in Kultur genommen wurden.....	38
4.3	Das koinhibitorische Rezeptor-Profil von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen humaner, gesunder Spender	41
4.3.1	Expression und Koexpression von Koinhibitoren auf humanen CD4 ⁺ T-Zellen.....	42
4.3.2	Koexpression von Koinhibitoren auf humanen CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen.....	44
4.3.3	Expression von Koinhibitoren auf humanen Regulatorischen T-Zellen.....	46
4.3.4	Anteil von T _{FH} -Zellen an der Population humaner CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen.....	48
4.3.5	Exemplarische Koinhibitoren-Färbung eines mit <i>P. falciparum</i> infizierten Patienten	50
4.3.5.1	Evaluation einer behelfswisen Gatingstrategie zur Auswertung der fehlgefärbten Malariaprobe	52
4.3.5.2	Vergleich der Rezeptorexpression von CD4 ⁺ T-Zellen, CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen und Tregs eines mit <i>P. falciparum</i> infizierten Menschen mit gesunden Menschen.....	54
5	DISKUSSION	57
5.1	CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gesunder Menschen können die Proliferation stimulierter CD4⁺ T-Zellen hemmen	57
5.2	Die Kokultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen mit stimulierten CD4⁺ T-Zellen führt zu einer Suppression von IL-2, IFN-γ und IL-10	63
5.2.1	Keine eindeutige PD-1 - assoziierte Modulation von TNF- α	64
5.2.2	Verminderung der IL-2 – Konzentration durch Kokultivierung mit PD-1 ⁺ T-Zellen.....	65
5.2.3	Ähnliche Konzentrationsreduktion von IFN- γ und IL-10 in Assoziation zur Kokultivierung mit CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen	66
5.2.4	Zytokine der Referenzpopulation büßen nach Kokultivierung mit CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen oder Tregs insgesamt an Konzentration ein	68
5.3	CLTA-4 wird auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen vermehrt koexprimiert	72
5.4	Etwa ein Drittel der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen können den Follikulären T-Helferzellen zugeordnet werden.....	75
5.5	Fazit und Ausblick.....	80
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	82
6.1	Summary	83
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	86
9	TABELLENVERZEICHNIS	87
10	LITERATUR	88

11	DANKSAGUNG	102
12	LEBENS LAUF	104
13	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	105

1 Einleitung¹

Das Immunsystem ist ein feinreguliertes System aus zellulären und humoralen Bestandteilen, dessen Hauptaufgabe es ist, den Organismus einerseits vor Schaden durch Noxen zu bewahren und ihn dabei andererseits nicht selbst zu schädigen. Die Induktion einer Immunantwort kann infektiös bedingt, z.B. durch Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten, aber auch nicht-infektiös bedingt sein, wie im Rahmen onkologischer und autoimmuner Erkrankungen. Die Immunantwort spielt sich in Abhängigkeit zur Noxe und zu ihrem pathogenen Potential auf unterschiedlichen Ebenen ab, die eng miteinander verflochten sind. Zu unterscheiden ist dabei das angeborene vom erworbenen (adaptiven) Immunsystem.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Der angeborene Teil des Immunsystems umfasst neben der Haut, dem Komplementsystem sowie antimikrobiellen Proteinen (z.B. Defensine) auch von Geburt an zirkulierende und ortständige Zellen, die v.a. myeloischen (Granulozyten, Makrophagen, myeloische dendritische Zellen), aber auch lymphatischen Ursprungs (natürliche Killerzellen, lymphatische dendritische Zellen) sind. Die Zellen des angeborenen Immunsystems haben die Fähigkeit mittels sogenannter Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors, PRRs*) körperfremde, molekulare Strukturen auf pathogenen Mikroorganismen zu erkennen, die evolutionsbiologisch stark konservierte Bestandteile von Bakterien oder Viren darstellen. Die Effektormechanismen aktivierter Zellen des angeborenen Immunsystems beinhalten neben der Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen auch das Sezernieren von Zytokinen und Chemokinen, die umliegende Immunzellen aktivieren und diese in die Immunantwort einbinden können. Nach erfolgter Phagozytose und intrazellulärer Prozessierung des Pathogens durch antigenpräsentierende Zellen (APZs; z.B. Dendritische Zellen (DZs) Makrophagen, B-Zellen), erfolgt der wichtige Schritt der Antigenpräsentation. Hierbei werden einzelne Bestandteile des zuvor phagozytierten Pathogens auf der Zelloberfläche der APZ präsentiert. Die Präsentation erfolgt mittels des sogenannten *major histocompatibility complex der Klasse II (MHC-Klasse-II)*, welcher ein polymorphes Zelloberflächenprotein darstellt, das in Verbindung mit dem präsentierten Antigen von

¹ Die wesentliche Informationsgrundlage dieses Kapitels bildet *Kenneth et al. (2018): Janeway Immunologie*. Abweichende Quellen sind gesondert angegeben.

Zellen des adaptiven Immunsystems detektiert werden und in der Folge eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems induzieren kann. Durch Modulation des Zytokinmilieus gestalten APZs darüber hinaus den immunologischen Fortgang einer Entzündungsreaktion insofern, als dass Zytokine beispielsweise die Differenzierung von Zellen des adaptiven Immunsystems induzieren und dabei helfen eine gezielte Immunantwort zu koordinieren und zu potenzieren (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

1.2 Das adaptive Immunsystem

Während die angeborene Immunantwort innerhalb weniger Minuten greift und ihre Wirkung für einige Tage entfaltet, setzen die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems überlappend erst nach einigen Tagen ein, insofern es sich nicht um Gedächtniszellen des adaptiven Immunsystems handelt, die eine Reexposition durch ein bereits bekanntes Antigen erfahren (vgl. Kapitel 1.3.5). Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem, sind die Zellen des erworbenen Immunsystems nicht auf unspezifische PAMPs angewiesen, um Pathogene zu detektieren und aktiviert zu werden, sondern in der Lage durch APZs präsentierte, pathogenspezifische Zellbestandteile zu erkennen und eine ebenso spezifische Immunantwort zu generieren. Grundlage dafür sind im Wesentlichen Immunzellen lymphatischen Ursprungs. Der zelluläre Anteil des adaptiven Immunsystems besteht aus Lymphozyten, wobei man T- und B-Lymphozyten unterscheidet. Diese beiden Lymphozyten-Spezies unterscheiden sich sowohl funktionell als auch phänotypisch in Bezug auf die exprimierten Rezeptoren.

B-Zellen sind benannt nach dem Ort ihrer Entstehung, dem Knochenmark (engl.: *bone marrow*), wo sie aus pluripotenten Stammzellen bzw. lymphatischen Vorläuferzellen entstehen. Reife, naive B-Zellen, also B-Zellen, deren Rezeptor vollständig ausgebildet und funktionsfähig ist, aber noch keinen Antigenkontakt hatte, wandern aus dem Knochenmark in die sekundären lymphatischen Organe und interagieren hier mit anderen Immunzellen, wie T-Zellen und APZs. Die Bindung eines Antigens an den B-Zellen-Rezeptor (BZR) einer naiven B-Zelle induziert die Differenzierung der B-Zelle hin zur Plasmazelle, welche Antikörper (AKs) synthetisieren und sezernieren können. Der Aufbau von Antikörpern entspricht dem des BZR, jedoch sind AKs nicht membranständig, sondern werden als frei zirkulierende Proteine sezerniert. Als solche sind sie Teil des humoralen, adaptiven Immunsystems und können spezifisch an ein Antigen binden, um dieses zu neutralisieren oder für die Phagozytose durch Makrophagen zu markieren. So potenzieren sie den

antipathogenen Effekt einer einzelnen, aktivierten B-Zelle. Die Generierung einer suffizienten humoralen Immunantwort ist die Voraussetzung für eine langanhaltende Immunität, die idealerweise im Falle einer Reexposition für die Eliminierung der Noxe sorgt. Für den Aufbau einer suffizienten humoralen Immunantwort sind bestimmte Subpopulationen T-zellulärer Helferzellen, die sogenannten Follikulären T-Helferzellen, essentiell.

T-Zellen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark, jedoch wandern sie als noch unreife Zellen früh aus dem Knochenmark aus, um in den Thymus zu migrieren, wo alle weiteren Reifungsprozesse stattfinden. Dieser Prozess der Thymusinvasion ist namensgebend für T-Zellen. Im Thymus reifen die frühen Stadien der T-Zellen, sogenannte Thymocyten, durch Interaktion mit thymalem Bindegewebe (Thymusstroma) heran. Im Zuge der Heranreifung bilden Thymocyten einen Antigen-Erkennungsrezeptor aus, den T-Zell-Rezeptor (TZR). Dieser besteht aus zwei Proteinketten, zumeist aus einer TZR- α - und einer TZR- β -Kette (α : β -TZR), und kommt nur membrangebunden vor. Sowohl die α - als auch die β -Kette enthält einen konstanten und einen hochvariablen Anteil, wobei letzterer die Antigenbindungsstelle bildet. Genau wie BZRs, sind auch TZRs interzellulär verschieden und hochspezifisch für ein bestimmtes Antigen. Eine Besonderheit bei T-Zellen ist die Expression weiterer Oberflächenrezeptoren durch Interaktion der heranreifenden, lymphatischen T-Zellen untereinander und mit dem umgebenden Thymusstroma. Dabei handelt es sich um die Rezeptoren *Cluster of differentiation* (CD) 4, CD8 sowie um den TZR-assoziierten Rezeptor CD3. Während CD3 essentiell für die Zelloberflächenexpression des TZR sowie die Signaltransduktion ist, erfüllen CD4 und CD8 als sogenannte Korezeptoren eine wichtige Funktion bei der Interaktion von T-Lymphozyten mit MHC-Molekülen. Auf reifen T-Zellen wird nur einer der beiden Korezeptoren exprimiert. Aufgrund der engen funktionellen Assoziation von TZR, CD3 sowie CD4 oder CD8, spricht man in der Zusammenschau auch vom T-Zell-Rezeptorkomplex (TZRK), welcher zur Erkennung von Antigenen und zur konsekutiven Aktivierung der T-Zelle dient. Essentiell für die T-zelluläre Reifung und Ausbildung funktionsfähiger Rezeptoren ist die Selektion der Thymocytenpopulation anhand ihrer Fähigkeit körpereigene Peptidfragmente, die mittels MHC-Molekülen auf Thymusepithelzellen präsentiert werden, als solche zu erkennen, mit ihnen zu interagieren und sie zu tolerieren (positive Selektion). Demgegenüber erfolgt im weiteren Reifungsverlauf auch eine negative Selektion, im Zuge derer alle T-Zellen zugrunde gehen, die zu stark mit körpereigenen Peptiden reagieren, also autoimmun wirken. Diese Selektionsmechanismen, die in ähnlicher Form auch die B-

zelluläre Reifung betrifft, führen zu einem Untergang einer Vielzahl an unreifen T- bzw. B-Zellen, lassen jedoch die verbliebenen Zellen des adaptiven Immunsystems mit einem immer noch riesigen Repertoire an reifen, naiven T- bzw. B-Zellen zurück, die gleichermaßen antigenspezifisch und tolerant gegenüber körpereigenen Strukturen sind.

Voraussetzung für eine T-Zell-Aktivierung (*Priming*) sind neben der Interaktion zwischen MHC : Antigen-Komplex und TZRK sogenannte costimulatorische Signale, welche von costimulatorischen Rezeptoren auf APZs ausgehen und zeitgleich zur Antigenpräsentation dargeboten werden müssen (Sharpe, 2009). Die wichtigsten kostimulatorischen Rezeptoren sind Moleküle der B7-Rezeptor-Gruppe, zu denen CD80 und CD86 gehören. Diese Rezeptoren interagieren mit dem CD28-Rezeptor auf T-Zellen und können als Absicherung gegen eine zu niederschwellige Aktivierung einer T-Zelle mit der Gefahr von Autoimmunität interpretiert werden. Bei gleichzeitigem Stimulus durch MHC - Antigen-Komplex und B7-Molekül werden T-Zellen aktiviert, was eine Proliferation und Differenzierung des betreffenden T-Zell-Klons hin zu einer T-Effektorzelle induziert.

1.2.1 Imitation der physiologischen T-Zell – Stimulation *in vitro*

Interessanterweise lässt sich die physiologische *in vivo* Stimulation von T-Zellen durch die *in vitro* Verwendung von anti-CD3/ anti-CD28 – Antikörpern imitieren. Diese in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper erfüllen über Bindung an den TZRK (in Form von CD3) sowie an den kostimulierenden Rezeptor CD28 die „Mindestanforderungen“ eines suffizienten T-Zell - Stimulus unter Umgehung einer Antigenpräsentation. Dies führt im Gegensatz zu einer Antigen-spezifischen Stimulation, zu einer Aktivierung aller T-Zellen innerhalb der Antikörper-behandelten Zellpopulation und kann zu einer besonders guten Sichtbarkeit von Effektormechanismen führen, die innerhalb einer definierten T-Zell – Subpopulation vorherrschen. In der vorliegenden Arbeit ist dieser Effekt zur Untersuchung CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen genutzt worden (vgl. Kapitel 3.2.2.4).

1.2.2 Charakteristika von T-Effektor Zellen

Insbesondere CD4⁺ T-Zellen untergliedern sich in eine Vielzahl definierter Subpopulationen, die sich im Rahmen akuter Immunreaktionen und der immunologischen Gedächtnisbildung entwickeln können. Erkennt eine naive CD4⁺ T-Zelle im Zuge einer akuten Immunreaktion „ihr“ Antigen, kommt es bei zusätzlicher Kostimulation zur Aktivierung und zu einer massiven klonalen Expansion mit Ausbildung eines charakteristischen Zytokinprofils, das neben den exprimierten Oberflächenrezeptoren und

Transkriptionsfaktoren zur Identifizierung der T-zellulären Subpopulation genutzt werden kann (O’Shea and Paul, 2010). Angesichts der besonderen Bedeutung von T_{H1} -Zellen, T_{FH} -Zellen und Tregs im Kontext der Charakterisierung von $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen, werden die differenzierten Subpopulationen von $CD4^+$ T-Zellen im Folgenden fokussiert eingeführt.

T_{H1} -Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-12 und Interferon- γ (IFN- γ) und sind gekennzeichnet durch den Transkriptionsfaktor T-bet, der die Synthese von IFN- γ durch $CD4^+T-bet^+$ T-Zellen induziert. IFN- γ wiederum induziert die Expression von MHC - Molekülen auf APZs, aktiviert B-Zellen, Makrophagen, $CD8^+$ T-Zellen sowie T_{H1} -Zellen im Sinne eines positiven Feedbacks, was die Bekämpfung von intra- und extrazellulären Pathogenen ermöglicht (O’Shea and Paul, 2010). Am Beispiel von IFN- γ im Kontext einer Malaria-Infektion lässt sich die Bedeutung der Balance aus pro- und antiinflammatorischen Elementen gut verdeutlichen. Während hohe IFN- γ – Spiegel im Blut von Mäusen und Menschen während der Frühphase einer Malariainfektion eine protektive Wirkung hinsichtlich eines komplizierten Verlaufs aufweisen (D’Ombra *et al.*, 2008; McCall *et al.*, 2010; King and Lamb, 2015), konnte gezeigt werden, dass die lokale und übermäßige Produktion von IFN- γ in einigen Organen gerade den Weg für einen komplizierten Verlauf im Sinne einer zerebralen Malaria ebnet (Villegas-Mendez *et al.*, 2012; King and Lamb, 2015). Im Falle einer insuffizienten Regulation einer T_{H1} Zell - vermittelten Immunantwort, kann es zu Autoimmunität bzw. überschießenden Immunreaktionen im Zuge akuter Erkrankungen kommen, wie beispielsweise im Rahmen einer *P. falciparum* - Infektion (Sharpe and Pauken, 2017; Harty, 2019).

T_{H2} Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-4 und sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13, was die Aktivität von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie von Mastzellen verstärkt. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung haben T_{H2} Zellen klassischerweise im Rahmen parasitärer Erkrankungen und allergischen Erkrankungen (O’Shea and Paul, 2010; Spolski, Li and Leonard, 2018).

Während sich T_{H1} - und T_{H2} -Zellen in sekundären lymphatischen Organen, in peripheren Geweben und im Blut nachweisen lassen, sind T_{FH} Zellen überwiegend ortsständig in den Lymphfollikeln sekundärer lymphatischer Organe. T_{FH} Zellen exprimieren neben dem Transkriptionsfaktor Bcl6 und dem Chemokinrezeptor CXCR-5 auch in hohem Maße PD-1 (Vinuesa and Cyster, 2011; Andris *et al.*, 2017). Der Chemokinrezeptor CXCR-5 ist essentiell für die Migration in die Lymphfollikel sekundärer lymphatischer Organe (Haynes *et al.*, 2007). Sie differenzieren sich aus naiven $CD4^+$ T-Zellen unter dem Einfluss von IL-6 und IL-21 und setzen ihrerseits IL-21 frei, wodurch naive B-Zellen aktiviert werden und zu

Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen differenzieren können (Avery *et al.*, 2008; Eivazi *et al.*, 2016). Durch PD-1^{-/-} knock out - Versuche konnte gezeigt werden, dass die PD-1 - Signalachse essentiell ist für die Überlebensdauer von T_{FH}-Zellen und ausdifferenzierten Plasmazellen sowie eine suffiziente Zytokinsynthese (Good-Jacobson *et al.*, 2010). T_{FH} Zellen vermitteln wichtige Selektions-, Überlebens- und Reifungssignale (Victoria and Nussenzweig, 2012) und befinden sich dergestalt an der Schnittstelle zwischen T- und B-zellulärer Immunantwort, durch die eine langanhaltende, humorale Immunität generiert werden kann. Umgekehrt steht eine noch nicht gut verstandene, fehlerhafte Funktionsweise von T_{FH} Zellen bzw. ihrer regulierenden Gegenspieler, den Follikulären Regulatorischen (T_{FR}) T-Zellen, im Verdacht, eine langanhaltende humorale Immunität, etwa im Malariakontext, zu behindern (Kurup, Butler and Harty, 2019a).

1.2.3 Regulierende T-Zellpopulationen und Zytokine

Im Rahmen einer balancierten Immunreaktion können sich naive T-Zellen nicht nur zu proinflammatorischen Effektorzellen, sondern *in vitro* unter der Anwesenheit von IL-2 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) bei gleichzeitiger Abwesenheit von IL-6 auch zu induzierten Regulatorische T-Zellen (iTregs) differenzieren (Chen *et al.*, 2003; Lohr, Knoechel and Abbas, 2006). *In vivo* ist die Population der angeborenen Thymus-abgeleiteten (tTregs) gegenüber den peripher induzierten (pTregs) zu unterscheiden, die in dieser Arbeit gemeinsam unter dem Begriff „Tregs“ zusammengefasst werden (Fontenot *et al.*, 2005; Elkord, 2014). Tregs exprimieren auf ihrer Oberfläche neben einigen anderen Oberflächenrezeptoren CD25 und CTLA-4, die zu einem Teil der regulierenden Effektormechanismen von Tregs beitragen. Darüber hinaus exprimieren Tregs den Transkriptionsfaktor FoxP3, der invers mit CD127 korreliert (Liu *et al.*, 2006), sodass Tregs in der vorliegenden Arbeit als CD25⁺CD127⁻ T-Zellen definiert wurden. Während CD25 mit potentiell proinflammatorischen T-Zellen um IL-2 konkurriert und deren Proliferation dadurch vermindert, konkurriert der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4 um die B7-Rezeptoren auf APZs, was die für eine Aktivierung naiver T-Zellen essentielle Kostimulation unterbindet. Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus von Tregs ist die Sekretion von IL-10, das neben der Regulation der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine auch zur Entstehung von Tregs aus naiven T-Zellen im Sinne einer positiven Feedbackschleife beiträgt (Couper, Blount and Riley, 2008; Hsu *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu IFN- γ oder IL-4, ist IL-10 nicht kennzeichnend für eine bestimmte T-Zell-Subpopulation,

sondern kann potentiell von einer Vielzahl an Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sezerniert werden. Es kann daher als zellpopulationsunabhängiger Mechanismus zum Ausgleich pro-inflammatorischer Effekte im Sinne eines negativen Feedback-Loops interpretiert werden (Couper, Blount and Riley, 2008; Saraiva and O'Garra, 2010).

Demgegenüber zeichnet sich die regulierende Zellpopulation der Regulatorischen T-Zellen Typ 1 (Tr1-Zellen), die interessanterweise FoxP3⁻ ist und damit nicht zu den klassischen Tregs gehört, durch ein besonders hohes Synthese- und Sezernierungspotenzial von IL-10 aus. Tr1-Zellen sind CD4⁺ Gedächtnis - T-Zellen, die im Kontext verschiedener infektiologischer und autoimmuner Herausforderungen (Bacchetta *et al.*, 1994; Głobińska *et al.*, 2018; Roncarolo *et al.*, 2018) eine wichtige regulierende und toleranzinduzierende Rolle spielen. Sie werden durch die Anwesenheit von IL-10, insbesondere durch IL-10 von dendritischen Zellen, induziert (Wakkach *et al.*, 2003; Roncarolo *et al.*, 2018). Identifizierbar sind Tr1 Zellen neben dem FoxP3-unabhängigen IL-10 - vermittelten Regulationspotential durch die Oberflächenexpression des Koinhibitors LAG-3 (vgl. Kapitel 1.3.3) sowie der Integrin alpha-2 Untereinheit CD49b (Gagliani *et al.*, 2013; Roncarolo *et al.*, 2018). Begleitend exprimieren Tr1-Zellen charakteristischerweise PD-1 in hohem Maße, sodass die Frage einer möglichen Zugehörigkeit der hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen zur Population der Tr1-Zellen im Laufe dieser Arbeit diskutiert werden wird.

1.3 Koinhibitorische Rezeptoren

Neben zellulären und Zytokin-abhängigen Mechanismen gibt es eine dritte Kategorie regulierender Faktoren, die im Zuge einer Immunreaktion zur immunologischen Balance beiträgt und im Zentrum dieser Arbeit steht. Dies ist die Gruppe der koinhibitorischen Rezeptoren (Koinhibitoren). Sie umfasst eine ganze Reihe unterschiedlicher Rezeptoren, von denen in der vorliegenden Arbeit allen voran *Programmed Cell Death-1* (PD-1) untersucht und charakterisiert wurde. Die Identifizierung von Koinhibitoren auf einer Vielzahl pro- und anti-inflammatorischer Effektorzellen als induzierbare, dynamische Gegenspieler zu pro-inflammatorischen Faktoren im Rahmen einer Immunreaktion, hat innerhalb der letzten 30 Jahre ein immenses Forschungsfeld eröffnet. Die Erforschung der Beteiligung von Koinhibitoren, insbesondere von PD-1 und CTLA-4, an der (Dys-) Regulation der Immunreaktion im Rahmen autoimmuner, onkologischer und infektiöser Erkrankungen ist ein gutes Beispiel für die Erfolge immunologischer Forschung. Diese hat

seit einigen Jahren nicht nur unter dem Schlagwort der „Checkpointinhibitoren“ Eingang in zahlreiche onkologische Therapieleitlinien erhalten, sondern führte 2018 auch zur Verleihung des Nobelpreises für Medizin an die Erstbeschreiber von PD-1 und CTLA-4, James P. Allison und Tasuku Honjo (Lenzen-Schulte, Martina; Grunert, 2018). Trotz dieser ermutigenden Entwicklung, führen viele immun-onkologische Therapieregime zu keiner langfristigen Remission und können in Einzelfällen schwere Autoimmunerkrankungs-ähnliche Nebenwirkungen verursachen, die zu neuen klinischen Herausforderungen führen und die Notwendigkeit eines besseren Verständnis koinhibitorischer Rezeptoren aufzeigen (Braun *et al.*, 2020). Vor diesem Hintergrund und mit Blick auf die Relevanz koinhibitorischer Rezeptoren über den onkologischen Kontext hinaus, ist in dieser Arbeit der Versuch gemacht worden, eine phänotypische, funktionelle und mechanistische Charakterisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen aus dem Blut gesunder Menschen durchzuführen. Dazu sind weitere Koinhibitoren (CTLA-4, LAG-3, Tim-3), die in unterschiedlichen immunologischen Settings mit PD-1 koexprimiert werden (Attanasio and Wherry, 2016), vor dem Hintergrund der Frage einer möglichen Koexpression auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Blut gesunder Menschen untersucht worden.

1.3.1 PD-1

Der Koinhibitor PD-1, auch CD279, gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie (Ig-SF). Als koinhibitorischer Rezeptor entfaltet PD-1 durch Interaktion mit einem seiner beiden Liganden (PD-L), *Programmed Death Ligand-1* (PD-L1) und *Programmed Death Ligand-2* (PD-L2), eine regulatorische Wirkung (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). PD-1 wird im gesunden Organismus auf naiven T-Zellen kaum exprimiert, aber in der Frühphase einer Immunreaktion auf aktivierten Immunzellen hochreguliert (Agata *et al.*, 1996; Chemnitz *et al.*, 2004). Dieser Effekt ist am besten bei T-Zellen bzw. den T-zellulären Subformen untersucht. Darüber hinaus wird PD-1 aber auch auf anderen Zellarten, wie B-Zellen, NK-Zellen, einigen myeloiden Zellpopulationen (Makrophagen, Dendritischen Zellen (DZ)) sowie einigen Tumorzelllinien aktivierungsabhängig exprimiert (Agata *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2002; Francisco, Sage and Sharpe, 2010; Riella, 2012). Während PD-L1 (auch B7-H1 oder CD274) konstitutiv auf einer Vielzahl von hämatopoetischen Zellen (T- und B-Zellen, APZ) und nicht-hämatopoetischen Geweben (z.B. Endothel und pankreatische Langerhans-Inseln) exprimiert wird, ist PD-L2 (auch B7-DC oder CD273) vor allem im Rahmen von Entzündungen auf APZs nachweisbar. Bei beiden PD-1-Liganden lässt sich eine deutliche Zunahme der Expression bei Beteiligung der

Liganden-exprimierenden Zellen an einer Entzündungsreaktion induzieren. IFN- γ induziert in besonderem Maße PD-L1. Darüber hinaus werden beide PD-1-Liganden ebenfalls von einigen Tumorzelllinien exprimiert, was bereits seit einigen Jahren als Therapieansatz im Rahmen onkologischer Therapieverfahren genutzt wird (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2016; Dyck and Mills, 2017).

Der Kontext, in dem die PD-1 – Signalachse (und andere Koinhibitoren) betrachtet wird, ist essentiell für das Verständnis möglicher pathophysiologischer und therapeutischer Anknüpfungspunkte. Während eine Signalmindering der PD-1-Signalachse häufig zu einer verbesserten Kontrolle infektiöser und onkologischer Erkrankungen führen kann (Barber *et al.*, 2006a; Lazar-Molnar *et al.*, 2008; Phares *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2017), liegt in der verminderten PD-1:PD-L vermittelten Signaltransduktion im Rahmen von Autoimmunerkrankungen gerade ein möglicher Pathomechanismus (Attanasio and Wherry, 2016). Die molekularen Mechanismen, mittels derer die PD-1-Signalachse ihre regulatorische Funktion ausübt, sind nur teilweise verstanden und beziehen sich zu großen Teilen auf Studien zu T-Zellen. Bekannt ist, dass PD-1 ein aus 288 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein ist, das eine extrazelluläre Domäne mit einer Immunglobulin-ähnlichen (*Ig-like*) variablen Domäne (*IgV*) besitzt (Keir *et al.*, 2008). Der zytoplasmatische Rezeptoranteil enthält ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) und ein *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM). Interagiert PD-1 mit einem seiner Liganden, werden diese beiden Thyrosinreste phosphoryliert, was die Bindung von Thyrosin-Phosphatasen, wie *Homology 2 Domain Containing Phosphatase 2* (SHP2), induziert. So gebundenes SHP2 ist in der Lage, intrazelluläre, proinflammatorische Signalkaskaden zu inhibieren, die durch die Aktivierung des TZR und von CD28 induziert werden. In der Summe führen diese PD-1-vermittelten Signalalterationen zu weniger T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Überleben sowie zu einer veränderten Zytokinausschüttung (Chemnitz *et al.*, 2004; Nikolaos Patsoukis, Julia Brown, Victoria Petkova, Fang Liu, Lequn Li, 2012; Yokosuka *et al.*, 2012). Während diese molekularen Befunde erklären können, wie die PD-1-Signalachse regulatorisch auf die Zelle wirkt, die PD-1 oder seine Liganden exprimiert (zellintrinsisch), ist unklar, ob und wie die Expression von PD-1 einer Zelle auch regulatorisch auf andere Immunzellen, im Sinne eines Treg-ähnlichen, zellextrinsischen Mechanismus wirkt.

1.3.2 CTLA-4

CTLA-4 gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie und wird auf aktivierten T-Zellen und konstitutiv auf FoxP3⁺ Tregs exprimiert (Rudd, Taylor and Schneider, 2009). Der Koinhibitor liegt zu 90% in intrazellulären Vesikeln vor und wird TZR- und CD28-aktivierungsabhängig mittels Exozytose an die Zelloberfläche mobilisiert und exprimiert (Linsley *et al.*, 1996). Die genauen Mechanismen der Endo- und Exozytose sind nur teilweise verstanden (Shiratori *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1999), jedoch wird der fortwährende Wechsel zwischen Oberflächenexpression und Internalisation als dynamischer Regulationsmechanismus der CTLA-4-Funktion interpretiert. Die regulierenden, CTLA-4-assoziierten Effekte entfaltet der Rezeptor, in dem er als Homodimer oberflächlich exprimiert wird. Die Effekte lassen sich in zellintrinsische- und extrinsische Mechanismen unterteilen. Intrinsische Mechanismen beinhalten die Rekrutierung und Manipulation von intrazellulären Signalmolekülen, die in anti-inflammatorische Signalkaskaden eingebunden sind, wie die Serin/ Threonin Phosphatase PP2A, SHP-2 und Ubiquitin-Ligasen (Rudd, Taylor and Schneider, 2009). Extrinsische Mechanismen sind im Sinne einer kompetitiven Bindung an CD80 und CD86 mit einer höheren Avidität als CD28 untersucht, was die B7-Rezeptor-vermittelten, kostimulierenden Signale im Rahmen der T-Zellaktivierung unterbindet (Walunas, Bakker and Bluestone, 1996; Collins *et al.*, 2002; Egen, Kuhns and Allison, 2002). Auch die „mechanische“ Entfernung der genannten B7-Rezeptoren im Sinne einer trans-Endozytose ist beschrieben (Qureshi *et al.*, 2011). Auf Grundlage dieser Mechanismen kommt es zu einer Hemmung des Zellzyklus mit Verminderung der IL-2-Sekretion- und Rezeptor-Expression, zu einer geringeren Sensitivität gegenüber der CD28-abhängigen Zellaktivierung sowie zu einer verminderten Proliferation (Krummel and Allison, 1996). Als wichtiger Faktor der Induktion peripherer Toleranz ist CTLA-4 inzwischen ein wichtiges Zielmolekül zum pathophysiologischen Verständnis autoimmuner, infektiologischer und onkologischer Erkrankungen geworden, was im Rahmen verschiedener onkologischer Erkrankungen bereits die therapeutische Manipulation von CTLA-4 ermöglicht hat (Rowshanravan, Halliday and Sansom, 2017).

1.3.3 LAG-3

LAG-3 (auch CD223) ist ein koinhibitorischer, transmembranöser Rezeptor, der eng mit dem costimulatorischen Rezeptor CD4 verwandt ist (Triebel *et al.*, 1990). LAG-3 ist bei naiven T-Zellen größtenteils intrazellulär lokalisiert und wird etwa 24 Stunden nach Zellaktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert. Seine regulatorische Funktion entfaltet

LAG-3 in räumlicher Assoziation zum TZRK. Während die genauen molekularen Mechanismen noch Forschungsgegenstand bleiben, ist bereits beschrieben, dass die zytoplasmatische Rezeptordomäne drei interindividuell hochgradig konservierte Regionen aufweist, von denen das KIEELE-Motiv essentiell für die regulierende Wirkung von LAG-3 auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen ist (Workman, Dugger and Vignali, 2002). Genau wie CD4, bindet auch LAG-3 an MHC-II, allerdings mit einer höheren Affinität und Avidität (Baixeras *et al.*, 1992). Ähnlich wie CTLA-4 bindet auch LAG-3 seinen potentiell zur Stimulation von T-Zellen geeigneten Liganden, MHC-II, um die nachfolgende Zellaktivierung zu supprimieren. Die Expression von LAG-3 konnte bislang auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie auf plasmoiden DZs gezeigt werden (Baixeras *et al.*, 1992; Huard *et al.*, 1994; Kisielow *et al.*, 2005; Workman *et al.*, 2009). Zudem wird LAG-3 auch auf Tregs exprimiert und trägt zum regulierenden Potential bei, was anhand einer verminderten Treg-abhängigen Regulationsfähigkeit in LAG-3-defizienten (LAG-3^{-/-}) Mäusen gezeigt werden konnte (Huang *et al.*, 2004). Im *Non Obese Diabetic* (NOD)-Maus – Modell, anhand dessen der Diabetes Typ 1 erforscht wird, zeigten mittels anti-LAG-3-Antikörper manipulierte Mäuse ein früheres Auftreten mit schwererem Verlauf der Erkrankung (Bettini *et al.*, 2011). Auch im onkologischen und infektiologischen Kontext bleibt LAG-3 aufgrund seiner regulierenden Eigenschaften Forschungsgegenstand. So wird LAG-3 beispielsweise vermehrt auf CD4⁺ T-Zellen im Rahmen durch *P. falciparum* verursachten Malariainfektion exprimiert und zudem mit PD-1 koexprimiert, wobei eine Antikörper-vermittelte LAG-3- und PD-L1 – Inhibierung zu einer verbesserter T-Zell-Funktion und Parasiten-Kontrolle führte (Butler *et al.*, 2012). Dazu passend konnte auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe eine vermehrte LAG-3- (und Tim-3-) Expression auf CD4⁺ T Zellen im Rahmen einer Malariainfektion mit leichtem klinischem Verlauf detektiert werden (Abel *et al.*, 2018).

1.3.4 Tim-3

Tim-3 (auch CD366) ist ein koinhibitorisches Molekül, das zur Tim-Rezeptorfamilie gehört, zu der im menschlichen Organismus mit Tim-1 und Tim-4 noch zwei weitere Rezeptoren gehören. Exprimiert wird der Rezeptor auf Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen, DZs, Mastzellen) sowie auf aktivierten und ausdifferenzierten Zellen des adaptiven Immunsystems, z.B. CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, Tregs (Hastings *et al.*, 2009; Anderson, Joller and Kuchroo, 2016). Verschiedene Studien deuten auf eine immunregulatorische Rolle von Tim-3 hin. So führte einerseits eine antikörpervermittelte

Tim-3-Inhibierung im Tierversuch zu einer hyperakut-exazerbierten Experimentell-Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) durch eine überschießende Makrophagen-Aktivität (Monney *et al.*, 2002) und andererseits die Applikation von gelöstem Tim-3 zu einer überschießenden T-Zell-Aktivität mit Hypersekretion von IFN- γ und ausbleibender Entwicklung einer suffizienten peripheren Toleranz (Sabatos *et al.*, 2003). Tim-3 scheint also die T_H1-zelluläre Immunantwort zu regulieren. Dazu passt, dass CD8⁺ T-Zellen von Mäusen, die mit dem Lymphozytäre Choriomeningitis – Virus (LCMV) infiziert sind, weniger T_H1-abhängige Zytokine, wie IL-2, TNF- α und IFN- γ , sezernieren (Jin *et al.*, 2010). Interessanterweise fanden Jin *et al.* eine besonders eingeschränkte Zytokinsuppression bei T-Zellen, die PD1 und Tim-3 koexprimierten. Möglicherweise induzieren verschiedene Rezeptoren die Funktionen von Tim-3, in jedem Fall sind mehrere Liganden identifiziert. Der am häufigsten zitierte Ligand in diesem Zusammenhang ist das C-Typ Lectin Galactin-9, das in Verbindung mit Tim-3 zu einer Suppression der T_H1-Zell-Antwort und zum Zelltod führt (Zhu *et al.*, 2005).

1.3.5 Differenzierung von T-Effektorzellen

Nach der Aktivierung einer T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle, kommt es zur Proliferation des T-Zell – Klons sowie zur Differenzierung in T-zelluläre Subpopulationen. Ist die Noxe erfolgreich bekämpft worden, kommt es zur sogenannten Kontraktionsphase, in der ein Großteil der entstandenen T-Effektorzellen in den programmierten Zelltod eintritt, wobei ein kleiner Teil dieser antigenspezifischen T-Zellen erhalten bleibt. Diese sogenannten Gedächtnis T-Zellen (*Memory T cells*; T_{MEM} Zellen) verbleiben im Vergleich zu den naiven T-Zellen, von denen sie abstammen, in größerer Zahl im Körper, erreichen eine breitere Verteilung im Körper und können im Falle einer erneuten Konfrontation mit demselben Antigen schneller T-Effektorfunktionen ausüben, um eine zügige Kontrolle über die Noxe zu bekommen (Masopust and Schenkel, 2013).

Gelingt es nicht das Antigen wirksam zu bekämpfen und bleibt der Stimulus dadurch dauerhaft (chronisch) erhalten, kann es zum Phänomen der T-Zell – Erschöpfung (*T cell exhaustion*) kommen. Erschöpfte T-Zellen (*exhausted T cells*; T_{EX} Zellen) sind überwiegend im Kontext chronisch-infektiöser und onkologischer Erkrankungen beschrieben. Die überwiegende Mehrheit der Studien bezieht sich zudem auf CD8⁺ T-Zellen, obwohl dieser Zustand auch bei CD4⁺ T-Zellen vorkommt (E. John Wherry and Kurachi, 2015). T_{EX} Zellen exprimieren eine Vielzahl an Koinhibitoren, wobei die Expression des Koinhibitors PD-1 ein wesentliches Merkmal von T_{EX} Zellen ist, der neben den anderen, häufig

koexprimierten Koinhibitoren CTLA-4, LAG-3 und Tim-3, zu den am besten untersuchten Rezeptoren in diesem Zusammenhang zählt. T_{EX} Zellen zeichnen sich durch ein vermindertes Proliferationspotential sowie ein von nicht-erschöpften T-Zellen unterscheidbares Zytokinprofil auf Grundlage eines veränderten Transkriptoms aus (Crawford *et al.*, 2014). Charakteristischerweise kommt es bei CD4⁺ T_{EX} Zellen zu einer verminderten Synthese von IL-2, IFN- γ und TNF- α und gleichzeitig zu einer vermehrten Synthese von IL-10 und IL-21 (Wherry, 2011; Crawford *et al.*, 2014). Ein Teil der Effektorfunktionen von T_{EX} Zellen bleibt jedoch erhalten, weswegen dieser Zustand als funktioneller Kompromiss zwischen der Bekämpfung einer Noxe und dem Schutz des Organismus vor langfristigen immunpathologischen Prozessen interpretiert wird. Während die Schwächung der T-Effektorantwort dergestalt ein physiologischer Mechanismus im Sinne des Wirts ist, kann dieses Phänomen ebenfalls von Erregern oder Tumorzellen „vereinnahmt“ und induziert werden zum Schutz vor Abwehrmechanismen. T_{EX} Zellen im Rahmen bestimmter Krankheitsbilder zu identifizieren kann daher interessant sein, da sich ihr T-Effektorniveau und damit ihre Fähigkeit ein Antigen zu eliminieren durch medikamentöse Inhibierung der exprimierten Koinhibitoren verbessern lassen kann (Attanasio and Wherry, 2016; Catakovic *et al.*, 2017; Jubel *et al.*, 2020).

1.4 Malaria

Obschon der eigentliche Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen aus dem Blut gesunder Menschen liegt, ist ihr Ausgangsbefund (Mackroth *et al.*, 2016; Abel *et al.*, 2018) und die daraus resultierende Fragestellung (vgl. Kapitel 1.5) im Rahmen der Erforschung von CD4⁺ T-Zellen im Verlauf einer Malariaerkrankung entstanden. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit eine exemplarische Phänotypisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und Tregs eines Malariaerkrankten integriert (vgl. Kapitel 1.5 und 4.3.5). Im Folgenden soll daher ein Überblick über die Malariainfektion sowie die Rolle von CD4⁺ T-Zellen im Rahmen einer Malariaerkrankung gegeben werden.

1.4.1 Epidemiologie und Klinik

Malaria ist eine der häufigsten, infektiösen Erkrankungen weltweit und wird durch einzellige Parasiten aus der Gattung der Plasmodien ausgelöst. 2019 erkrankten 229 Millionen Menschen an Malaria, von denen 409.000 Menschen verstarben. Die größte Gruppe innerhalb der Verstorbenen weltweit stellen Kinder unter 5 Jahren dar, wobei die Plasmodienart *P. falciparum* weltweit am häufigsten zu einem letalen Verlauf führt (World Health Organization, 2020).

Zur Übertragung von Malariaerregern kommt es durch den Stich einer weiblichen Anopheles-Mücke. Hierdurch gelangen Plasmodium-Sporoziten aus den Haut- und Unterhautschichten über die Blutstrombahn in die Leber, wo sie Hepatozyten infizieren und sich vermehren und differenzieren. Dieser Teil der Infektion wird als „Leberphase“ bezeichnet, dauert mehrere Tage an und verläuft ohne klinische Beschwerden. Als vereinzelte Merozoiten oder als Parasitenverband im Merosom gelangen die Plasmodien schließlich zurück in die Blutstrombahn, infizieren Erythrozyten, vermehren sich dort und sorgen erst in dieser zweiten Phase der Erkrankung, der „Blutphase“, für klinische Symptome.

Die klinische Manifestation einer Infektion mit *P. falciparum* kann mild verlaufen mit periodischem oder kontinuierlichem Fieber, allgemeinem Krankheitsgefühl und unspezifischen Symptomen, wie gastrointestinalen oder respiratorischen Beschwerden. Es kann zu einem Ikterus kommen, laborchemisch kann sich eine milde, meist normochrome, normozytäre Anämie zeigen. Ein schwerer Verlauf manifestiert sich anhand von Bewusstseinsbeeinträchtigung bis hin zu Koma (z.B. als Ausdruck einer zerebralen Malaria), einer

metabolischen Azidose, schwerer Anämie, Hypoglykämie, akutem Nierenversagen und/oder akutem Lungenversagen. Die Prognose einer unbehandelten, schweren Malariainfektion ist schlecht (Bartoloni and Zammarchi, 2012).

Im dicken Tropfen, dem Standard-Diagnostikum einer Malariainfektion, können sich bei leichten Verläufen frühe Formen der von Merozoiten befallenen Erythrozyten (Trophozoiten) zeigen, während sich in hohem Maße von Merozoiten befallene Erythrozyten als Zeichen der stattgehabten intrazellulären Vermehrung (Schizonten) eher selten darstellen lassen. Dem gegenüber treten Schizonten bei schweren Verlaufsformen einer *P. falciparum* – Malariainfektion gehäuft auf.

1.4.2 CD4⁺ T-Zellen im Rahmen einer Malariainfektion

Zur Kontrolle einer Malaria-Infektion sind die zelluläre und humorale Immunantwort essentiell. An der Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, sowie innerhalb des adaptiven Immunsystems zwischen T- und B-zellulärer Immunantwort, befinden sich CD4⁺ T-Zellen. Eine adäquate Aktivierung und Differenzierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen (und CD8⁺ T-Zellen) ist durch den komplexen Lebenszyklus von Plasmodien, der sich zunächst in der Leber und dann in Erythrozyten und damit in äußerst tolerogenen Geweben abspielt, erschwert und führt zu einer großen Vielfalt differenzierter CD4⁺ T-Effektorzellen, deren Zusammenspiel erst langsam verstanden wird. Das *Priming* naiver T-Zellen geschieht überwiegend in der Blutphase der Erkrankung, da Plasmodien zunächst vom tolerogenen Milieu der Leber, von der initial geringen Parasitenlast sowie von der insgesamt kurzen Verweildauer in der Leber profitieren. Dies führt im Zuge einer Erstinfektion zu einer ungenügenden initialen Immunantwort. Da Erythrozyten keine MHC-Moleküle exprimieren, wird ein Großteil der Immunantwort zudem erst nach der Lyse der Erythrozyten induziert, was klinisch mit Fieberschüben und den zuvor beschriebenen Symptomen einhergehen kann.

Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende DZ. Die Antigenerkennung sowie ein spezifisches, IL-12-, IL-6- und IL-21 – geführtes Zytokinmilieu tragen zu einer Differenzierung zu T_{H1} Zellen und T_{FH}-Zellen bei (Götz *et al.*, 2017; Salles *et al.*, 2017). Die T_{H1} Zell – vermittelte vermehrte Sekretion von IFN- γ potenziert die Aktivierung von Makrophagen, was zu einer vermehrten Synthese von TNF- α und zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, die Plasmodien-toxisch wirken. IFN- γ ist ein Beispiel für die Wichtigkeit der Balance einer akuten Immunantwort. In murinen und humanen Studien konnte eine protektive Wirkung eines frühen, erhöhten IFN-

γ -Serumspiegels hinsichtlich der Ausbildung von schweren Verläufen gezeigt werden (Luty *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2005; D’Ombrain *et al.*, 2008; McCall *et al.*, 2010). Im fortgeschrittenen Verlauf potenziert IFN- γ die Immunreaktion gegen sequestrierte infizierte Erythrozyten im Rahmen einer zerebralen Malaria jedoch und trägt dergestalt zur Pathophysiologie eines schweren Verlaufs bei (Steege *et al.*, 2009a; Hafalla *et al.*, 2012; Villegas-Mendez *et al.*, 2012). Charakteristika eines schweren Verlaufs sind eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort sowie die Sequestrierung von infizierten Erythrozyten in den Kapillaren der Zielorganen. Hierdurch kommt es bei der zerebralen Malaria nicht nur durch den Gefäßverschluss, sondern auch durch die lokale Inflammation mit Verletzung der Blut-Hirn-Schranke zu schweren neurologischen Ausfällen bis hin zum Koma (Ryg-Cornejo *et al.*, 2016a). Die genauen Ursachen für milde bzw. schwere Verläufe von *P. falciparum* - Infektionen sind ungenügend verstanden. Dass die humorale Immunantwort dabei eine wichtige Rolle spielt, konnte anhand des passiven Serumtransfers von klinisch-immunen Erwachsenen zu schwer erkrankten Kindern gezeigt werden, der zur rapiden Besserung der klinischen Beschwerden führte (Cohen, McGregor and Carrington, 1961; McGregor, 1964). Allerdings kommt es bereits innerhalb von Wochen bis Monaten ohne erneute Antigenexposition durch die Generierung von kurzlebigen Plasmazellen zu einem Verlust der humoralen Immunantwort (Crompton *et al.*, 2010; Ryg-Cornejo, Ly and Hansen, 2016). Zudem kommt es bei Menschen, die häufig an einer Malariainfektion erkranken zur Ausbildung von atypischen Gedächtnis B-Zellen, die eine Vielzahl an Koinhibitoren exprimieren und dergestalt phänotypische und funktionelle Merkmale aufweisen, die mit dem Erschöpfungsphänomen von T-Zellen (vgl. Kapitel 1.3.5) vergleichbar sind. Hinsichtlich der Frage nach der Entstehung einer dysfunktionalen humoralen Immunantwort hat die Rolle der T_{FH}-Zellen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

T_{FH}-Zellen aktivieren im Keimzentrum sekundärer lymphatischer Organe B-Zellen und induzieren über die Sekretion von IL-21 und IL-4 die Reifung und den B-zellulären Antikörper-Klassenwechsel, was letztlich die humorale Immunantwort ermöglicht. Dabei exprimieren T_{FH}-Zellen die Aktivierungsmarker *inducible costimulator* (ICOS) und PD-1, die jeweils essentiell sind für die Migration und Differenzierung von T_{FH}-Zellen sowie die Reife-Induktion ihrer B-zellzellulären Partnerzellen. Im Rahmen einer akuten Malariainfektion kommt es zur Proliferation von CD4⁺CXCR-5⁺PD-1⁺ T_{FH}-Zellen, das Auftreten von CD4⁺CXCR-5⁺PD-1⁺(Bcl6⁻) T_{FH}-Zellen nach überstandener Infektion ist, ähnlich wie bei vielen Viruserkrankten, Ausdruck einer Differenzierung zu Gedächtnis T_{FH}

Zellen (Hale *et al.*, 2013; Ryg-Cornejo *et al.*, 2016a; Zander *et al.*, 2017; Kurup, Butler and Harty, 2019b). Die Expression von PD-1 auf CXCR-5⁺ T_{FH}-Zellen korreliert mit einer regelrechten Aktivierung, Differenzierung und Expansion sowie mit einer intakten Interaktion zwischen T_{FH}- und B-Zellen im Rahmen einer akuten Immunantwort. Im Zuge einer chronischen Plasmodien-Exposition hingegen scheint die Expression von PD-1 und weiteren Koinhibitoren, wie LAG-3, mit einer Beeinträchtigung der Proliferation und Funktion von T_{FH}-Zellen einherzugehen, was die regelrechte Ausbildung einer langanhaltenden, sterilen Immunität durch funktionsfähige Gedächtnis B-Zellen behindert (Butler *et al.*, 2012; Ryg-Cornejo *et al.*, 2016b).

Die Rolle der hier skizzierten T-Zellpopulationen im Rahmen einer Malariainfektion, deren Effektorfunktionen unter der dynamischen Regulation von Koinhibitoren, insbesondere PD-1, stehen, verdeutlicht die Komplexität der Einstellung einer immunologischen Balance. Darüber hinaus dient dieser Hintergrund auch als Einordnung der Relevanz der vorliegenden Arbeit, die versucht durch die Analyse der Rolle von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Blut gesunder Menschen dazu beizutragen, die Rolle von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Kontext vielfältiger immunologischer Herausforderungen besser zu verstehen.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Regulation einer Immunantwort ist von herausragender Bedeutung für den menschlichen Organismus. Dazu dienen neben spezialisierten Immunzellpopulationen und immunsupprimierenden Zytokinen, auch koinhibitorische Rezeptoren, die von verschiedenen Effektorzellen zur zellintrinsic Regulation exprimiert werden können. Im Rahmen einer Malariainfektion mit *P. falciparum* konnte gezeigt werden, dass CD4⁺PD1⁺ T-Zellen in der Lage sind, antigenspezifisch-stimulierte CD4⁺ T-Zellen auf eine zellextrinsische Weise zu regulieren (Mackroth *et al.*, 2016). Hieraus ergibt sich die Fragestellung, ob die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen nicht nur Ausdruck einer zellintrinsic Regulation ist, sondern ob sich CD4⁺ T-Zellen zudem durch die Expression von PD-1 potentiell in der Lage versetzen können, auf Treg-ähnliche Weise andere Immunzellen zu regulieren und damit eine neue, induzierbar-regulatorische Zellpopulation darstellen. Vor diesem Hintergrund ist die extrinsisch-regulatorische Fähigkeit von CD4⁺PD1⁺ T-Zellen aus Vollblutproben gesunder Menschen reevaluiert worden. Zur Aufdeckung eines universellen, induzierbaren und antigenunabhängigen Mechanismus, ist auf eine antigenspezifische Stimulation zugunsten einer CD3/ CD28 – abhängigen, beadbasierten T-Zell - Stimulation zurückgegriffen worden. Um zytokinabhängige, regulierende Mechanismen zu ermitteln, sind die Überstände der Suppressionsassays hinsichtlich der Konzentrationen von IL-2, IL-10, IFN- γ und TNF- α untersucht worden.

In einem zweiten Teil der Arbeit ist eine phänotypische Charakterisierung von unstimulierten CD4⁺PD1⁺ T-Zellen aus dem Vollblut gesunder Menschen zum besseren Verständnis ihres Ursprungs erfolgt. Hierzu ist die Expression weiterer Koinhibitoren (CTLA-4, LAG-3, Tim-3) analysiert worden. Angesichts der Tatsache, dass T_{FH}-Zellen sich durch die Expression von PD-1 auszeichnen, ist zudem der Anteil CXCR-5 exprimierender CD4⁺PD1⁺ T-Zellen und damit der Anteil an T_{FH}-Zellen innerhalb der Population CD4⁺PD1⁺ T-Zellen quantifiziert worden.

Die parallele Anwendung der skizzierten Untersuchungen auf Tregs und CD4⁺ T-Zellen diente der Referenzierung, um die Befunde hinsichtlich des suppressiven Potentials, des Zytokinprofils sowie des phänotypischen Profils von CD4⁺PD1⁺ T-Zellen besser einordnen zu können. Abschließend wurde durch die exemplarische Analyse der Blutprobe eines an Malaria erkrankten Probanden ein Ausblick auf phänotypische Unterschiede zwischen CD4⁺PD1⁺ T-Zellen eines Gesunden und eines mit *P. falciparum* infizierten Menschen gegeben.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Sterile Arbeitsbank „LaminAir HB2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Pipetten	Gilson, Middleton (USA) HTL Warschau (PL) Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe „Pipetus“ Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfe „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg
Vortex „V-1 plus“	Kisker Biotech, Steinfurt
Zentrifuge „Heraeus Multifuge X3R“	ThermoFisher, Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge „5415 C“	Eppendorf, Hamburg Scientific,
CO2-Inkubator „Hera Cell 150“	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Durchflusszytometer „LSRII“	BD Bioscience, Heidelberg
Durchflusszytometer „Accuri C6“	BD Bioscience, Heidelberg
Mikroskop „Axiostar plus“	Zeiss, Oberkochen

2.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Material/ Ware	Hersteller
Safety-Multifly®-Kanüle 21G 200mm lang	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® 9mL LH	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15mL, 50mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5mL, 1,5mL, 2mL)	Eppendorf, Hamburg
Combitips advanced (0,5mL, 2,5mL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Hecht-Assisten, Sondheim

Neubauer Zählkammer (0.1mm x 0.0025mm)	Hecht-Assisten, Sondheim
FACS Röhren mit Deckel	Greiner bio-one, Frickenhausen
SepMate™- 50 Röhren	Stemcell Technologies, Köln
Glasflaschen Schott Duran (250mL, 500mL, 1L)	Schott AG, Mainz
Filter CellTrics 30µm	Sysmex Partec, Görlitz
Sterilfilter (0,22 µm, Stericup & Steritop)	Millipore, Schwalbach Greiner
LS und LD Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Glaspipetten (2mL, 5mL, 10mL, 20mL)	Brand GmbH, Wertheim
Zellkulturplatten „U-Boden und F-Boden“, 96 well	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
³ H-Thymidin	PerkinElmer, Rodgau-Rügesheim
Cohn II (Gemisch aus humanen Immunglobulinen)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACSFlow™ Sheath Fluid	BD Bioscience, Heidelberg
FCS	Biochrom, Berlin
Gentamycin Sulfat	LONZA, Verviers (B)
Hepes Buffer Solution (1 M)	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Freiburg
Humanes Serum A/B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	PAN-Biotech, Aidenbach
RBC Lyse/Fixierung Puffer RPMI	BioLegend, San Diego (USA)
Trypanblau (0,4%) Wright	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-VIVO 15 (Serum frei)	LONZA, Verviers (B)

Tabelle 4: Medien und Puffer

Medien und Puffer	Inhaltsstoffe
PBSS	PBS 1% humanes Serum AB
FACS-Puffer	FACSFlow™ Sheath Fluid 1% FCS
MACS-Puffer	PBS 0,5% humanes Serum AB 2 mM EDTA
cRPMI	RPMI 1640 (ohne L-Glutamin) 0,5% Gentamycin 1% L-Glutamin 2,5% HEPES Buffer Solution 10% humanes Serum AB

2.4 Kits für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 5: Kits für zellbiologische Arbeiten

Kit	Hersteller
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit FoxP3	BD Bioscience, Heidelberg
LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)	BioLegend, San Diego (USA)
MACS CD4 T cell isolation kit human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 6: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antikörper ²	Fluorochrom	Klon
α CD3	APC/Cy7	HIT3a
α CD4	APC	RPA-T4
α CD4	BV510	RPA-T4
α CD25	PE/Cy7	BC96
α CD127	AF488	A019D5
α CTLA-4	PE	L3D10
α LAG-3	APC	3DS223H
α PD-1	PerCP/Cy5.5	EH12.2H7
α TIM-3	BV421	F38-2E2
α CXCR-5	PE-Dazzle	J252D4

2.6 Zusammensetzung der Probanden

Für die Phänotypisierung von CD4⁺ T-Zellen und Tregs mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihres Koinhibitorprofils und des Chemokinrezeptors CXCR-5, sind Vollblutproben von insgesamt 17 Probanden verwendet worden. Ausschlusskriterien der Probanden waren dabei akute Infektionen, Fieber, infektiologische oder immunologische chronische Erkrankungen, wie beispielsweise Immundefizienz, Autoimmunerkrankungen, HIV oder bösartige Erkrankungen. Des Weiteren ist die Einnahme von immunmodulierenden Medikamenten, wie beispielsweise Glucocorticoiden oder Chemotherapeutika, anamnestisch ausgeschlossen worden.

Exemplarisch ist ebenfalls ein an Malaria durch den Erreger *Plasmodium falciparum* erkrankter Proband zur Phänotypisierung mit in den Probandenkreis eingeschlossen worden. Dieser litt an einer febrilen, unkomplizierten Malaria mit einer mittleren Erregerlast von 4279 Plasmodien/ μ l. Aufgrund einer Folge – Blutuntersuchung am Tag 1 nach der initialen

² Die verwendeten Antikörper enthielten allesamt α -humane Epitope.

Vorstellung (Tag 0) in der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin war es möglich, zwei Blutproben des Probanden zu gewinnen, je eine an Tag 0 und Tag 1.

Für die Suppressionsassays ist das Blut von insgesamt drei Probanden untersucht worden. Die Ausschlusskriterien entsprachen den oben beschriebenen Kriterien zum Ausschluss von Probanden zur Phänotypisierung.

Tabelle 7: Probanden zur Phänotypisierung von CD4⁺ T-Zellen und Tregs

Proband	Alter	Geschlecht	Gesundheitsstatus
P1	57	f	gesund
P2	25	f	gesund
P3	26	f	gesund
P4	65	m	gesund
P5	33	f	gesund
P6	35	f	gesund
P7	36	f	gesund
P8	25	m	gesund
P9	47	m	gesund
P10	49	m	gesund
P11	37	f	gesund
P12	40	f	gesund
P13	24	m	gesund
P14	48	f	gesund
P15	49	f	gesund
P16	50	m	gesund
P17	53	m	gesund
P18	40	m	malariaerkrankt

Tabelle 8: Probanden der Suppressionsassays

Proband	Alter	Geschlecht
SP1 ³	31	f
SP2	26	f
SP3	28	m

2.7 Software

Tabelle 9: Software und Anwendungsgebiet

Software	Anwendung
BD FACS DIVA 6.2	Analyse durchflusszytometrischer Daten
Cytobank	Analyse und visuelle Aufbereitung durchflusszytometrischer Daten
GraphPad Prism 7	Analyse und statistische Aufbereitung durchflusszytometrischer Daten

2.8 Ethik

Alle Probanden wurden über das medizinische Procedere und den wissenschaftlichen Kontext aufgeklärt und bezeugten ihre Bereitschaft, Teil unserer Studie zu werden, durch eine schriftliche Einwilligung. Vor Beginn der Studie erfolgte eine Beratung durch die Ethikkommission Hamburg. Eine formelle Ethikgenehmigung ist für Studien mit gesunden Probanden in Hamburg nicht notwendig. Eine Ethikgenehmigung für die T-Zellanalyse von Malariapatienten wurde durch die Ethikkommission Hamburg erteilt (PV 4539).

³ Abk.: „SP“ = Suppressionsassay-Proband

3 Methoden

3.1 Allgemeine Einführung in die zugrundeliegenden Methoden

3.1.1 Blutentnahmen

Sowohl für die Phänotypisierung als auch für die durchgeführten Suppressionsassays wurde Blut von Probanden verwendet. Dieses ist von medizinischem Fachpersonal in heparinisierte Röhrchen abgenommen worden. Während für die Phänotypisierung ein geringes Blutvolumen (< 9mL) ausreichte, wurden für die Suppressionsassays 250mL Vollblut gewonnen.

3.1.2 Zentrifugations- und Kühlungsmanagement

Die Zentrifugation erfolgte grundsätzlich bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten, sofern im Folgenden nicht anders beschrieben. Außerdem wurden isolierte Zellen grundsätzlich auf Eis gelagert und die Anfärbung von Zell-Rezeptoren im Rahmen durchflusszytometrischer Untersuchungen bei Dunkelheit und bei 4°C durchgeführt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahlen

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer und Färbung mit Trypanblau bestimmt. Dazu wurden Aliquots der betreffenden Zellsuspension von 5 – 10µl entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung vermischt. Trypanblau durchdringt die Zellmembran von geschädigten Zellen und bindet als saurer Farbstoff an zytosolische Proteine. Auf diese Weise konnten lebende von toten Zellen differenziert werden. Die Zellzahl wurde bestimmt, indem sie lichtmikroskopisch in drei Quadranten ausgezählt und gemittelt wurde. So konnte unter Einbeziehung von Verdünnung und Kammerfaktor (10^4) die Zellkonzentration der Ziellösung bestimmt werden.

3.1.4 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Zellen oder Beads anhand von Größe, Granularität und Fluoreszenz. In der Summe können Aussagen über Zelltyp sowie über intra- und/ oder extrazellulär exprimierte Rezeptoren getroffen werden. Zur Separation einzelner Zellen wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine dünne Kapillare geleitet. Beim Durchlaufen dieser Kapillare werden die Zellen der Reihe nach von einem Vorwärts- und einem Seitwärtsstreulicht beschossen. Der Grad der

Seitwärtsstreuung korreliert dabei mit der Granularität der Zelle, der Grad der Beugung des Vorwärtsstreulichts mit der Größe der Zelle. Zur weiteren Spezifizierung von Zellpopulationen oder zur Untersuchung eines Zellmerkmals, beispielsweise eines bestimmten Rezeptors, können Zellsuspensionen mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten versetzt werden. Wenn die zugesetzten Antikörper ihre Zielstruktur erkennen und diese binden, ermöglicht der zellenweise Beschuss durch verschiedene Laser mit definierter Wellenlänge die Induktion eines antikörper-spezifischen Fluoreszenzsignal, welches die Verbreitung der Zielstruktur quantifizierbar macht. Auf diese Weise können der Zelltyp und das zelluläre Rezeptorprofil bestimmt werden.

Je nach Ausstattung des verwendeten Gerätes, ist neben der Charakterisierung von Zellen auch die Sortierung derselben anhand definierter Merkmale möglich. Im Rahmen der Analyse von Größe, Granularität und Fluoreszenz erfolgt die Separation einzelner Zellen, indem die Zellsuspension durch Vibration in so kleine Tropfen unterteilt wird, dass in jedem separierten Tropfen nur eine einzige Zelle enthalten ist. So ist es möglich durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Fallrichtung des Tropfens und der in ihm enthaltenen Zelle nach Analyse der Zelleigenschaften in ein bestimmtes Gefäß vorzugeben. Dadurch können beispielsweise Zellen mit einem bestimmten Rezeptorprofil aus einer Gesamtheit von Zellen gezielt heraussortiert werden.

3.2 Konkrete Anwendung der verwendeten Methoden

3.2.1 Ex-vivo-Färbung von Oberflächen- und intrazellulären Rezeptoren

Um das Rezeptor-Profil von CD4⁺ T-Zellen und Tregs zu bestimmen, sind zunächst die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, α CD4_BV510, α CD25_PE-Cy7, α CD127_AF488, α PD-1_PerCP/Cy5.5, α LAG-3_APC und α TIM-3_BV421 und CXCR-5_PE-Dazzle zu 100 μ l EDTA-Blut gegeben worden. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ist der Farbstoff LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain in einer Verdünnung von 1:2000 zu den Zellen gegeben worden. Dieses Gemisch inkubierte 30 Minuten lang. Anschließend wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von 2mL 1x RBC Lysis/Fixation Solution (Biolegend) nach Herstellerangaben lysiert und mit 2mL kaltem FACS-Puffer gewaschen. Zur intrazellulären Anfärbung von CD3 und CTLA-4 wurde das FoxP3 Färbepuffer-Set (eBioscience) nach Herstellerangaben verwendet. Die anschließende Färbung erfolgte mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern α CD3_APC/Cy7 und α CTLA-4_PE. Zur

Prävention unspezifischer Antikörperbindungen, wurden die Zellen vor der intrazellulären Färbung mit Cohn-II im Verhältnis 1:10 für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubierte das Gemisch für 30 Minuten und wurde anschließend zweimal mit 1mL Perm Buffer (eBioscience) gewaschen. Für die Analyse am LSR II wurden die Zellen schließlich in 100µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.1.1 Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit Hilfe der Software „FlowJo X 10.0.7r2“ sowie dem online-Programm „cytoBank“. Dabei wurde zunächst auf alle Lymphozyten, dann auf alle Einzelzellen und schließlich auf alle lebenden Zellen gated. CD4⁺ T-Zellen wurden definiert als CD3⁺CD4⁺. Innerhalb dieser Population wurde dann die Fraktion Regulatorischer T-Zellen, definiert als CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻, gated, und die Rezeptorprofile hinsichtlich der Expression von Koinhibitoren und des Chemokinrezeptors CXCR-5 von T-Zellen und Tregs analysiert (s. Abbildung (Abb.) 1).

Für die Gate-Definitionen der Zielmarker (PD-1, CTLA-4, LAG-4, Tim-3, CXCR-5, CD25, CD127) wurden *fluorescence minus one* – Färbungen (FMO) durchgeführt. In einer FMO werden alle verwendeten Fluorochrome verwendet, außer dem zu definierenden Fluorochrom/ Antikörper-Komplex. Das Fluoreszenzspektrum einer FMO resultiert also aus der Summe aller verwendeten Marker. Die Grenze des Definitionsgate eines Zielmarkers einer FMO beginnt in dem Bereich, in dem keine Fluoreszenz der übrigen Marker mehr detektiert wird. Dergestalt wird das Gate des Zielmarkers gegenüber den Fluoreszenzspektren der übrigen Marker sowie gegenüber spektralen Überschneidungen abgegrenzt.

3.2.2 Durchführung der Suppression Assays

Vor dem Hintergrund der Frage, ob CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in der Lage sind, aktivierte CD4⁺ T-Zellen in ihrer Proliferationsaktivität zu inhibieren, ist es nötig gewesen, eine ganze Reihe verschiedener Zellpopulation und Subpopulationen zu isolieren. Folgende Zellpopulationen wurden isoliert: Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs*), CD4⁺ T-Zellen, CD4⁻ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-Zellen (Tregs). Die Zellpopulationen wurden teils durch ein Bead-basiertes Verfahren separiert, teils mittels FACS-Analyse- und Sortierung, wie im Folgenden erläutert wird.

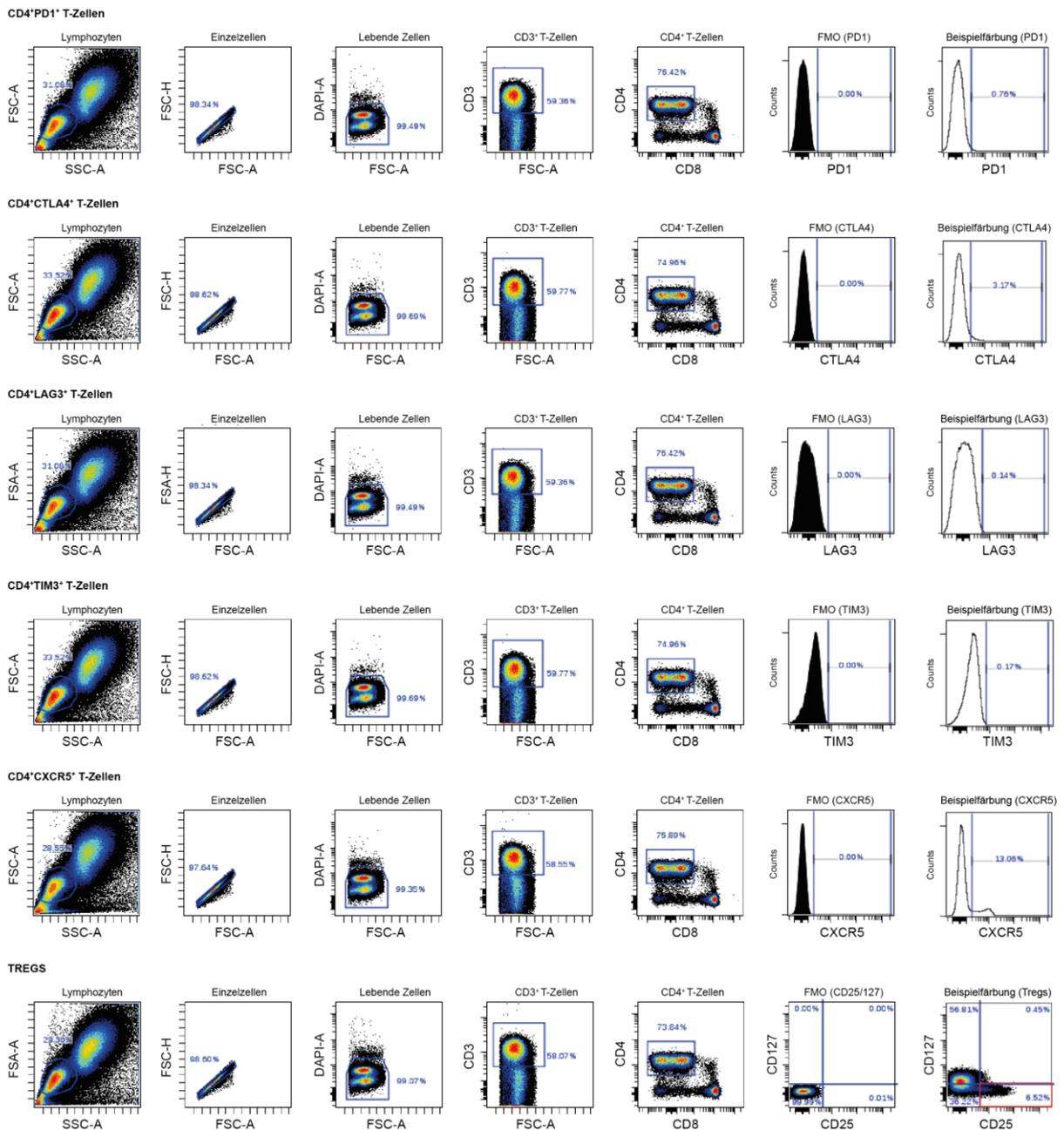


Abbildung 1: Veranschaulichung der verwendeten Gating-Strategie mit Darstellung der Gate-Definitionen anhand von FMO-Färbungen.

Darstellung der Definition der Koinhibitor-Gates der analysierten oberflächlichen (CD4, PD-1, LAG-3, Tim-3; CXCR-5, CD25, CD127) und intrazellulären (CD3, CTLA-4) Rezeptoren anhand von FMO-Färbungen (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Die Beschriftung über den einzelnen Dotplots, im Plot linksaußen beispielsweise „Lymphozyten“, beschreibt den Inhalt des im Plot gesetzten Gates. Äußerst rechts ist jeweils eine beispielhafte Färbung dargestellt, die auf Grundlage der dargestellten Gatingstrategie sowie der definierten Koinhibitor-Gates zustande gekommen sind.

3.2.2.1 Isolation von PBMCs aus peripher gewonnenem Blut

Als Grundlage der Suppression Assays diente eine Vollblutspende von 250mL von gesunden Probanden, die in Heparinröhrchen abgenommen und in 50mL Falcon-Tubes mit steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) 1:1 verdünnt wurde. Von diesem Blut-PBS-Gemisch wurden maximal 35mL abpipettiert und in mit 15mL Ficoll-Lösung bestückte Sepmate-Tubes gegeben. Dieses Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 1200g zentrifugiert. Der sich bildende Überstand, der neben Blutplasma auch PBMCs enthielt, wurde vorsichtig dekantiert und mit cRPMI auf insgesamt 50mL aufgefüllt. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit cRPMI bei 1750rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, bevor die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung ermittelt werden konnte.

3.2.2.2 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs durch Bead-basierte Zellseparation

Für die Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus den bis dato isolierten PBMCs ist das CD4⁺ *T cell isolation Kit* (Miltenyi Biotec) zur Hilfe genommen und nach Herstellerangaben verwendet worden. Bei diesem Verfahren werden PBMCs mit biotinylierten Antikörpern angefärbt, die gegen verschiedene Oberflächenrezeptoren gerichtet sind (CD8a, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD132, TcR γ/δ , Glycophorin A), nicht aber gegen CD4. In einem zweiten Schritt werden α -Biotin Antikörper hinzugegeben, die an magnetische Mikrobeads gekoppelt sind und an alle vormals applizierten und zelloberflächlich gebundenen Antikörper binden. Lässt man diese Zellsuspension durch eine MACS (*Magnetic Cell Separation*) - Säule laufen, die in einen Magneten eingespannt ist, werden alle mit Mikrobeads assoziierten (CD4⁻) Zellen in der Säule gesammelt, während alle nicht mit Antikörpern bzw. Mikrobeads gebundenen (CD4⁺) Zellen passieren und in einem separaten Röhrchen gesammelt werden können. Durch Trennung von MACS-Säule und Magneten und Spülung der MACS-Säule, können zudem alle CD4⁻ Zellen separiert aufgefangen werden. Zur weiteren Verwendung wurde die Zellkonzentration beider Zellpopulationen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und anschließend zentrifugiert und resuspendiert. Zuvor wurde die CD4⁺ T-Zell-Suspension in eine kleine Fraktion CD4⁺ T-Zellen geteilt, die im Verlauf als Kontrolle verwendet wurde und eine größere Fraktion CD4⁺ T-Zellen, die durch Anfärbung und Sortierung weiter spezifiziert wurde.

3.2.2.3 Färbung und Sortierung der CD4⁺ T-Zell-Subpopulation mittels FACS

Nachdem bereits PBMCs, CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen isoliert werden konnten, wurde in einem nächsten Schritt der größte Teil der CD4⁺ T-Zell Population dazu verwendet, CD4⁺PD-1⁺ und CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen anzufärben und im Rahmen einer FACS-Analyse- und Sortierung zu separieren. Dazu wurde die CD4⁺ T-Zell-Suspension zentrifugiert und in 1ml kaltem PBS resuspendiert. Die folgenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden der CD4⁺ T-Zell-Suspension zugegeben: CD4_APC-Cy7, CD25_PE-Cy7, CD127_AF488, PD-1_PerCP-Cy5.5, CTLA4_PE. Parallel dazu wurden FMOs angelegt (vgl. Kapitel 3.2.1.1), welche zur Definition der Grenzen der Gates in der später folgenden Software-Analyse dienen, auf Grundlage derer die Zellseparation erfolgte. Dazu wurden aus der vormals gewonnenen PBMC-Suspension Aliquots zur Färbung der FMOs entnommen, wobei für jedes verwendete Fluorochrom eine Probe angelegt wurde, in der alle Fluorochrom-Antikörper-Aggregate enthalten waren, außer dem zu definierenden Fluorochrom-Antikörper-Aggregat. Auf Basis der so angesetzten Antikörper-Fluorochrom-spezifischen Negativproben, wurden nach der Färbung der Zellsuspensionen und vor dem Zell-Separationsvorgang die für die Zellseparation nötigen Gates definiert (s. Abb. 1). Alle Zellsuspensionen inkubierten nach Zugabe der Antikörper bei 4°C für 30 Minuten, wurden anschließend mit 10mL PBS gewaschen, zentrifugiert und mit 500µl PBS resuspendiert. Zur Verringerung von Verstopfungen der feinen Nadel des FACS-Gerätes, wurde die CD4⁺ T-Zell-Suspension durch die Passage eines zuvor mit 1mL PBS befeuchteten Filter (CellTrics 30µm) von Zelltrümmern- und Aggregaten befreit. Anschließend wurde der Filter mit 1mL PBS gespült. Alle Suspensionen und Flüssigkeiten, die den Filter im Rahmen der Aufreinigung passierten, folgten lediglich der Schwerkraft und wurden ohne weiteren Druck appliziert, um eine optimale Filtrierung mit geringst möglichem Zellschaden zu erreichen. Die so aufgereinigte Suspension wurde auf zwei Röhrchen zu je 1mL zur weiteren Prozessierung via FACS aufgeteilt.

Die Analyse und Sortierung der Zellsuspensionen erfolgte an einem FACS Aria (BD) – Gerät. Zunächst wurde die Reinheit der via MACS isolierten CD4⁺ T-Zellen geprüft. Ab einem Anteil von 80% an CD4⁺ T-Zellen wurde von einer hochkonzentrierten CD4⁺ T-Zell-Population ausgegangen. Dann wurden die FMOs eingelesen und anhand dieser die Gates für PD-1⁺ und PD-1⁻ T-Zellen sowie für Tregs gesetzt. Durch Definition dieser Gates konnten die genannten drei Zellpopulationen in mit 1mL cRPMI vorbefüllte Falcon-Röhrchen sortiert werden. Die Zellzahl aller separierten Zellpopulationen wurde mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung auf 1×10^6 Zellen/mL titriert.

3.2.2.4 Kultivierung und Stimulation der Zellpopulationen

Im Rahmen der Versuchsanordnung wurden unterschiedliche Versuchsreihen und Kontrollen in einer 96-Rundbodenplatte unmittelbar nach der Sortierung der Subpopulationen in Kultur genommen. Um die proliferations-suppressive Wirkung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf CD4⁺ T-Zellen zu evaluieren, bedurfte es der vormaligen Stimulation der CD4⁺ T-Zellen. Die Stimulation erfolgte mittels anti-CD3/ anti-CD28-Beads (Dynabeads, Thermo Fisher).

Die Ziel-Intensität der Stimulation wurde auf Grundlage von Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe (Mackroth *et al.*, 2016) auf einen Zielkorridor zwischen 5.000 und 15.000 *counts per minute* (cpm) festgelegt. Zur Ermittlung des erforderlichen Verhältnisses von Beads zu CD4⁺ T-Zellen, erfolgte ein Titrationsassay, im Rahmen dessen die resultierende Stimulation aus verschiedenen Verhältnisse von Beads : CD4⁺ T-Zellen evaluiert wurde. Es zeigte sich, dass ein Verhältnis von 1:10 (= 2,5 x 10³ Beads : 2,5 x 10⁴ CD4⁺ T-Zellen) über eine Stimulationsdauer von 72 Stunden bis zum Zusatz von ³H-Thymidin die gewünschte Stimulationsintensität gewährleisten konnte. In der Versuchsanordnung bildete die Population der stimulierten 2,5 x 10⁴ CD4⁺ T-Zellen die Referenzpopulation, auf die alle potentiell immunregulierten Kokulturen (CD4⁺ T-Zellen + CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs) und Kontrollen bezogen wurden. Zum Grad der Proliferation dieser Population ins Verhältnis gesetzt wurden folgende vier Kokulturen: (1) 2,5 x 10⁴ stimulierte CD4⁺ T-Zellen + 2,5 x 10⁴ CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, (2) 2,5 x 10⁴ stimulierte CD4⁺ T-Zellen + 1,25 x 10⁴ CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, (3) 2,5 x 10⁴ stimulierte CD4⁺ T-Zellen + 2,5 x 10⁴ Tregs sowie (4) 2,5 x 10⁴ stimulierte CD4⁺ T-Zellen + 1,25 x 10⁴ Tregs. Während also stets 2,5 x 10⁴ CD4⁺ T-Zellen appliziert wurden, wurde das Verhältnis der jeweils kokultivierten Zellpopulation, bestehend aus CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs, um einen möglicherweise dosisabhängigen suppressiven Effekt evaluieren zu können, variiert. Dabei wurde stets mit 2500 Beads stimuliert, unabhängig von der Gesamtzellzahl im Well.

Zusätzlich wurden einige Kontrollen angelegt. Um den Einfluss der Zellzahl auf das Proliferationspotential von CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden 5 x 10⁴ CD4⁺ T-Zellen je mit 2,5 x 10³ und 5 x 10³ Beads, also im Verhältnis 1:10, inkubiert. Zur Evaluation des proliferativen Potentials von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wurden 2,5 x 10⁴ CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen zusammen mit 2,5 x 10⁴ Beads inkubiert. Für den Ausschluss einer Suppression des Proliferationspotentials von CD4⁺ T-Zellen durch den Sortierungsvorgang wurden 2,5 x 10⁴ CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen mit 2,5 x 10⁴ Beads inkubiert. Alle stimulierten Ansätze wurden stets auch unstimuliert in Kultur genommen. Angesetzt wurden stets Triplikate, wenn dies durch

die Gesamtzellzahl möglich war. Die Zellsuspension der einzelnen Wells setzte sich zusammen aus den kultivierten Zellen sowie dem Kulturmedium cRPMI, womit das Gesamtvolumen jedes Wells auf 200µl aufgefüllt wurde.

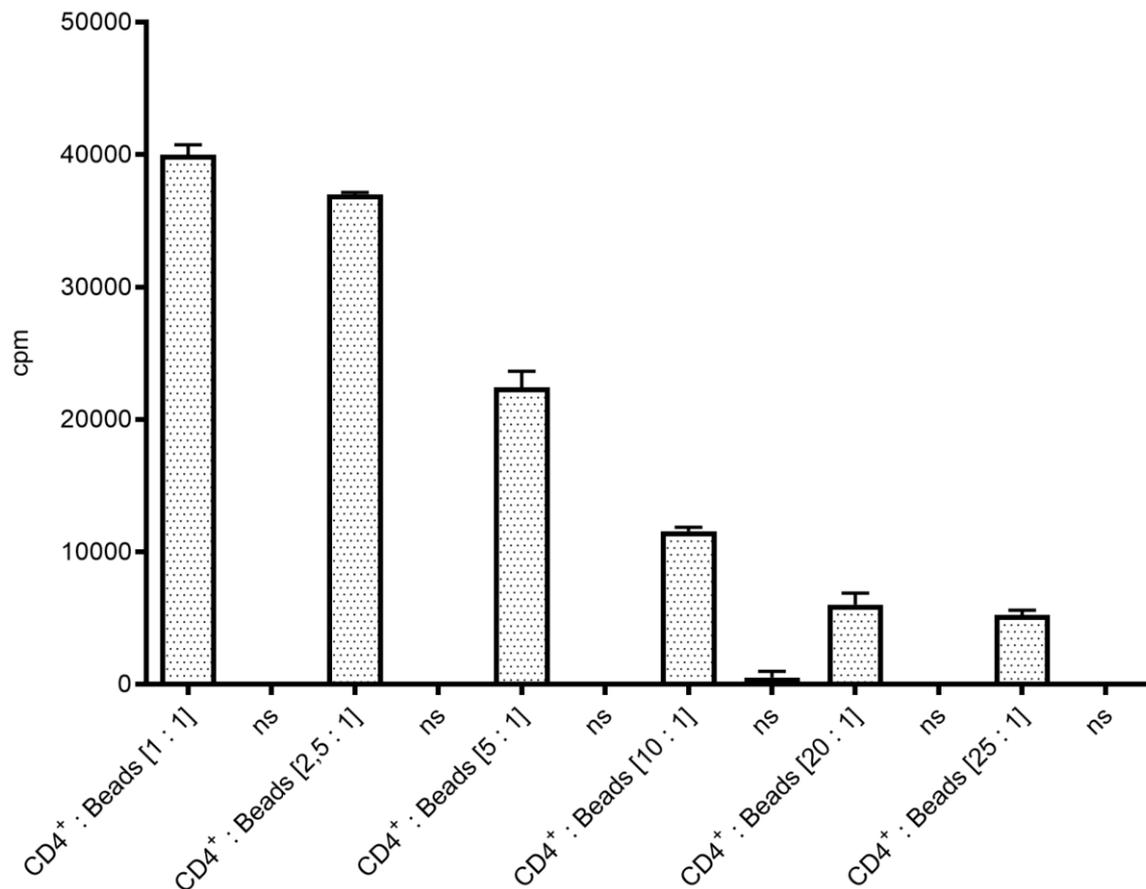


Abbildung 2: Titrationsassay zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Beads zu CD4⁺ T-Zellen. Zur Evaluation einer geeigneten Stimulation von CD4⁺ T-Zellen wurden aus peripherem, humanem Blut PBMCs isoliert und durch immunomagnetische Zellseparation eine reine CD4⁺ T-Zell-Population separiert. Anschließend wurden CD4⁺ T-Zellen zu je 25.000 pro Well mit einer unterschiedlichen Menge an stimulierenden anti-CD3/ anti-CD28-Beads für 90 und für 120 Stunden kultiviert. Bei den wechselnden Verhältnissen von CD4⁺ T-Zellen zu Beads („CD4⁺ : Beads“; das jeweilige Verhältnis ist in eckigen Klammern aufgeführt) variierte also stets nur die Menge der Beads. Zur Messung der Proliferation fügten wir nach 72 Stunden ³H-Thymidin hinzu. Angesetzt wurden stets Triplikate. Die Abbildung zeigt, dass ein Verhältnis von 10 : 1 (CD4⁺ T-Zellen : Beads) mit einer Stimulationsdauer von 90 Stunden die gewünschte Proliferation induziert (Graph mit einer Stimulationsdauer von 120 Stunden nicht gezeigt).

3.2.2.5 Messung der Proliferation durch Zugabe von ³H-Thymidin

Um die Proliferation und eine mögliche Suppression derselben messen zu können, wurde der Zellansatz nach 72 Stunden Inkubation für 18 Stunden mit 1 µCi/mL mit ³H-Thymidin gepulst. ³H-Thymidin wird im Rahmen der Zellteilung in die neu entstehenden DNA-Stränge eingebaut, sodass die szintillatorische Messung der Radioaktivität mit der Entstehung neuer DNA und damit der Zellteilung in der untersuchten Suspension korreliert. Nach Pulsation der Zellen wurden die Zellen über einen Zellulosefilter geerntet und die Radioaktivität bzw. die chromosomale Verarbeitung des ³H-Thymidin mit einem Szintillator gemessen. Die Einheit der Radioaktivität wurde in *counts per minutes (cpm)* angegeben.

3.2.2.6 Bestimmung des Zytokinprofils der untersuchten Zellpopulationen

Im Rahmen des Suppressionsassays sind nach 72 Stunden vor Zugabe der ³H-Thymidin-Suspension 80µl der Suspensionsüberstände einiger Wells entnommen und auf eine frische 96-Well-Platte übertragen worden, um diese auf das vorherrschende Zytokinprofil untersuchen zu können. Nachdem die Zellkulturüberstände abgenommen worden waren, wurden diese bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des Zytokinprofils der einzelnen Überstände erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt und konnte mit Hilfe des Kits „*LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)*“ entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt werden.

3.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Statistiksoftware GraphPad Prism 7. Die Signifikanzunterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt notiert: * = $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$. Im Falle fehlender Signifikanz wurde dies zu Übersichtszwecken nicht notiert.

4 Ergebnisse

Auf Grundlage der Befunde von Mackroth *et al.*, 2016, ist in der vorliegenden Arbeit das regulatorische Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen hinsichtlich stimulierter CD4⁺ T-Zellen mittels ³H Thymidin – Proliferationsassays evaluiert worden. Ergänzend ist das Zytokinprofil in den Überständen der Zellkulturplatten bezüglich der Konzentrationen von IL-2, IL-10, IFN- γ und TNF- α untersucht worden.

Zur Beleuchtung der Frage nach dem Ursprung bzw. dem Kontext der Entstehung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Blut gesunder Menschen, sind ruhende CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen phänotypisch hinsichtlich der Koexpression weiterer Koinhibitoren untersucht worden. Da sich follikuläre T-Helferzellen (CD4⁺CXCR-5⁺PD-1⁺) durch die Expression von PD-1 auszeichnen, ist außerdem ihr Anteil innerhalb der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen untersucht worden.

4.1 Untersuchung des regulatorischen Potentials humaner CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gesunder Menschen

Bei Patienten, die akut an einer Malaria durch den Erreger *P. falciparum* erkrankten, konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von Malaria-Erkrankten vermehrt PD-1 exprimieren und dass CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen erkrankter Probanden *in vitro* in der Lage sind, die Proliferation aktivierter CD4⁺ T-Zellen zu hemmen (Mackroth *et al.*, 2016). Da die Funktion zellulärer Effektormechanismen in hohem Maße kontext- bzw. antigenabhängig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch eine antigenunabhängige, Bead-basierte *in vitro* Stimulation von zuvor isolierten CD4⁺ T-Zellen überprüft, ob die Fähigkeit von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen stimulierte CD4⁺ T-Zellen zu regulieren, induzierbar ist.

Zur Messung des suppressiven Potentials von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf stimulierte CD4⁺ T-Zellen, sind PBMCs aus dem Blut von drei gesunden Probanden verschiedenen Alters und Geschlechts isoliert worden. Nachdem die CD4⁺ T-Zell-Population aus den vormals isolierten PBMCs mittels magnetischer Zellseparation isoliert wurde, ist diese im Verlauf aufgereinigt und mit Fluorochrom-Antikörper-Konjugaten angefärbt worden, sodass nach der anschließenden Sortierung folgende Zell-Subpopulationen in unterschiedlichen Konstellationen miteinander in Kultur genommen werden konnten: CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Regulatorische T-Zellen (vgl. Kap. 3.2.2, s. Abb. 3). Alle in Kultur genommenen Zell-Suspensionen sind bei ausreichender Zellzahl in Triplikaten angesetzt worden. In allen drei Versuchen zeigte sich eine Proliferation der stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Den Referenzwert für die Proliferation

bzw. deren Suppression bildeten die Proben mit $2,5 \times 10^4$ stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Der Grad der Proliferation ist durch die Zugabe von 3H -Thymidin nach 72 Stunden und eine 18 Stunden später erfolgte, scintillatorische Messung der Radioaktivität der Proben quantifiziert worden.

4.1.1 Ergebnisse der Suppressionsassays

Die Bead-basierte Induktion einer Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen gelang nach vorab erfolgter Titration einer geeigneten Stimulationsdosis (s. Abb. 2) bei allen drei Probanden. Bei allen drei durchgeführten Suppressionsassays konnte darüber hinaus eine verminderte Proliferation in den Wells detektiert werden, in denen stimulierte $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen gemeinsam in Kultur genommen wurden. Die Suppression der Proliferation durch $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen war dabei bei einem von drei Versuchen signifikant dosisabhängig, d.h. signifikant effektiver in den Wells, in denen $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:1 kultiviert wurden, als in den Wells, in denen ein Verhältnis von 1:0,5 vorlag. Eine tendenzielle Dosisabhängigkeit zeigte sich zwar ebenfalls in den übrigen beiden Suppressionsassays, hier zeigte sich im ungepaarten t-Test jedoch keine Signifikanz. Im Vergleich dazu zeigte sich in den Wells mit einer Kokultivierung von stimulierten $CD4^+$ T-Zellen und Tregs im Verhältnis 1:1 und 1:0,5 in zwei von drei Versuchen eine signifikante dosisabhängige Suppression der Proliferation $CD4^+$ T-Zellen. Die Suppression durch Tregs war in zwei von drei Versuchen signifikant effektiver als die Suppression durch $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen, im dritten Versuch war kein signifikanter Unterschied des suppressiven Potentials zwischen den beiden regulatorischen Zellpopulationen feststellbar.

Die Proliferationsrate in den Wells mit $2,5 \times 10^4$ stimulierten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen lag in den drei Experimenten zwischen 8% und 27% der Referenzproliferationsrate der stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Bei den Tregs lag das eigene proliferative Potential zwischen 1% und 2% der Referenzproliferationsrate der stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. Ein Teil der Referenzproliferation, also der einfach applizierten und stimulierten $CD4^+$ T-Zellen, kommt also aus der $CD4^+PD-1^+$ T-Zell-Population selbst. In den Wells mit Applikation der doppelten Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen zeigte sich keine Suppression der Proliferation, sodass nicht von einer Suppression allein durch eine erhöhte Zellzahl ausgegangen werden kann. Eine Suppression der Proliferation durch den Sortierungsvorgang konnte durch das ausgeprägte Proliferationspotential in der Gruppe der stimulierten $CD4^+PD-1^-$ T-Zellen ausgeschlossen werden (s. Abb. 3).

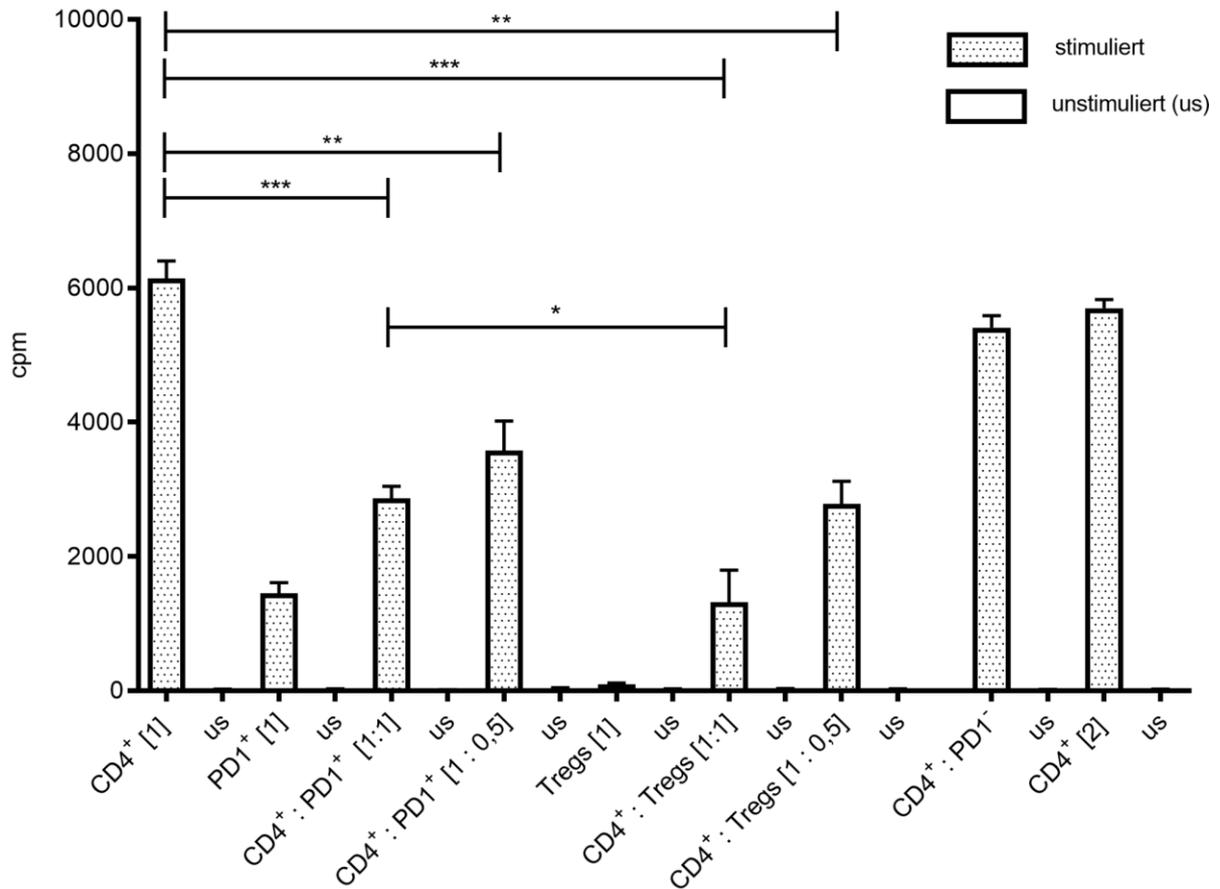


Abbildung 3: Evaluation des proliferations-supprimierenden Potentials von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf stimulierte CD4⁺ T-Zellen.

Nachdem aus peripher gewonnenem Vollblut humaner Spender PBMCs isoliert wurden, konnten durch immunomagnetische Zellseparation CD4⁺ von CD4⁻ T-Zellen getrennt werden. Durch weitere Zellseparation mittels FACS-Sortierung konnten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-Zellen (Tregs) isoliert werden. In verschiedenen Wells konnten so je $2,5 \times 10^4$ CD4⁺ T-Zellen (1) ohne weitere Zellpopulationen (CD4⁺ [1]), (2) mit derselben Menge CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (CD4⁺ : PD1⁺ [1:1]) oder (3) der Hälfte an CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen pro $2,5 \times 10^4$ CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ : PD1⁺ [1:0,5]) angesetzt werden. Als Kontrollen dienten (1) Wells mit doppelter Menge an stimulierten CD4⁺ T-Zellen zum Ausschluss einer Suppression der Proliferation von stimulierten CD4⁺ T-Zellen durch eine erhöhte Zellzahl im Well, (2) Wells mit stimulierten PD-1⁺ T-Zellen (PD-1⁺ [1]) zur Evaluation des proliferativen Potentials von PD-1⁺ T-Zellen und (3) Wells mit CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen und stimulierten CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:1 (CD4⁺ : PD-1⁻ [1:1]) zum Ausschluss einer Suppression der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen durch den Sortierungsvorgang. Die Stimulation erfolgte für 90 Stunden, wobei zur Messung der Proliferation nach 72 Stunden ³H-Thymidin zugesetzt wurden. Angesetzt wurden bei ausreichender Zellzahl stets Triplikate. Das hier beispielhaft dargestellte Experiment zeigt die Mittelwerte der Triplikate sowie die Standardfehler. Die Signifikanzniveaus sind mittels ungepaartem t-Test berechnet worden.

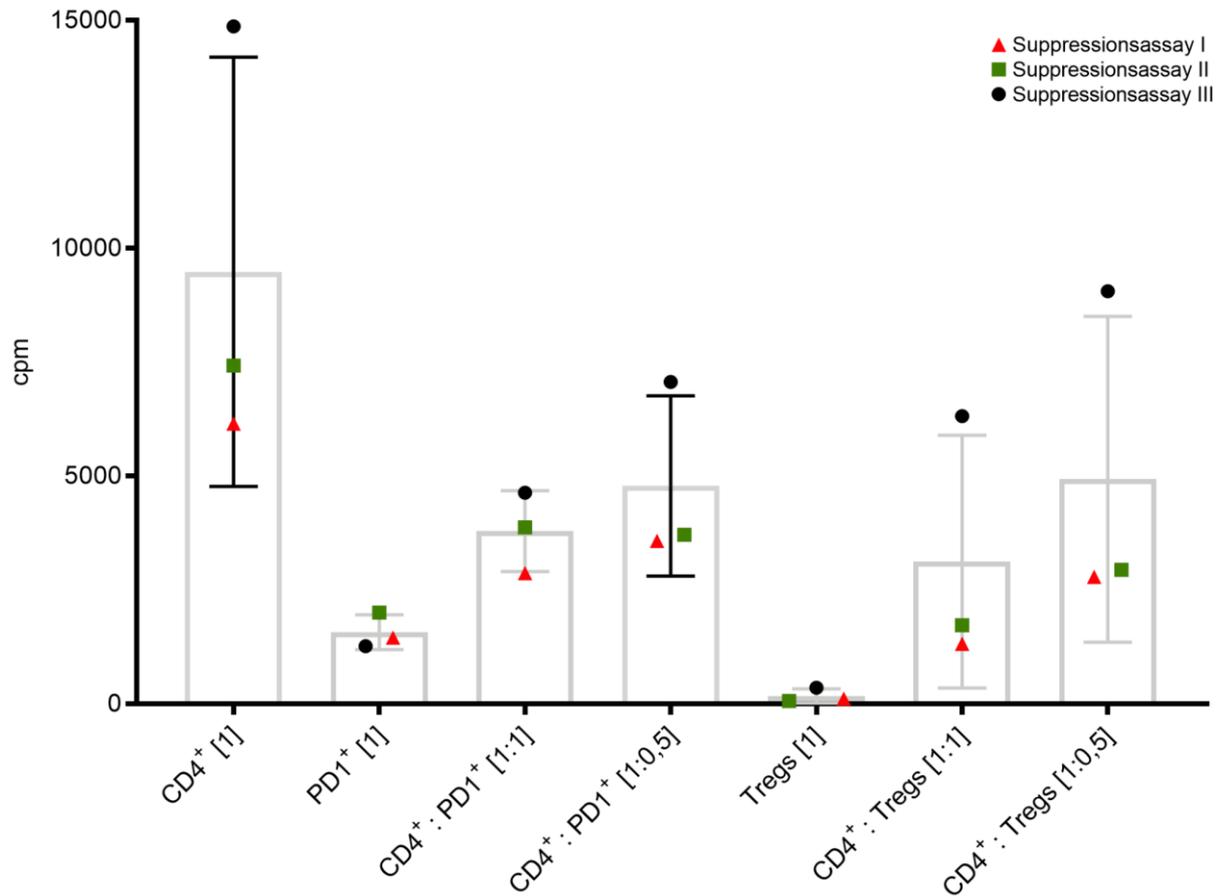


Abbildung 4: Darstellung der Proliferation der (ko-)kultivierten Populationen aller drei durchgeführten Suppressionsassays.

Das Diagramm zeigt die drei unabhängig voneinander durchgeführten Suppressionsassays, wobei auf der y-Achse der Grad der Proliferation in counts per minute (cpm) angegeben ist. cpm sind Ausdruck der scintillatorischen Messung der Proben, nachdem diese mit dem radioaktiven ³H-Thymidin gepulst wurden und korrelieren mit dem Grad der Proliferation der auf der x-Achse aufgeführten T-Zell-Populationen. Die T-Zell-Populationen sind jeweils nach ihrem Rezeptorprofil benannt und sind durch einen Doppelpunkt getrennt, wenn zwei unterschiedliche Populationen in demselben Well kokultiviert wurden. In eckigen Klammern aufgeführt ist das Vielfache der verwendeten Zellzahl einer Populationen, wobei [1] = 25.000 Zellen bedeutet. Alle Wells sind mit 2500 Beads stimuliert worden. Ersichtlich ist, dass eine Kokultivierung von CD4⁺ : CD4⁺ PD-1⁺ T-Zellen im Vergleich zur Referenzpopulation der CD4⁺ T-Zellen zu einer Verminderung der Proliferation führt, wobei sich der proliferationshemmende Effekt je stärker manifestiert, desto größer die Population CD4⁺ PD-1⁺ T-Zellen im Verhältnis zu CD4⁺ T-Zellen ist. Derselbe dosisabhängige Effekt zeigt sich bei CD4⁺ T-Zellen, die zusammen mit Tregs in Kultur genommen wurden.

4.2 Zytokinkonzentrationen in Assoziation zu immunregulatorischen T-Zellen im Vergleich

Aus dem Blut gesunder, humaner Spender isolierte CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen sind in der Lage, die Proliferation stimulierter CD4⁺ T-Zellen *in vitro* zu hemmen. Um zytokinabhängige Mechanismen aufdecken zu können, ist das Zytokinprofil in den Überständen der für die Suppressionsassays verwendeten Zellkulturen mittels Bead-basiertem Immunoassay (LEGENDplex™, Biolegend) analysiert worden. Aufgrund des Malaria-spezifischen Kontextes dieser Arbeit wurden dabei insbesondere die T_H1-abhängigen Zytokine untersucht. Die Konzentrationsangaben werden im Folgenden als Median (M) angegeben, wobei die größte und die kleinste gemessene Konzentration für das jeweils gemessene Zytokin dahinter in runden Klammern aufgeführt wird (M = X pg/ml (*min. Wert* – *max. Wert* pg/ml)).

4.2.1 Das Zytokinprofil von stimulierten CD4⁺ T-Zellen, die mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Regulatorischen T-Zellen in Kultur genommen wurden

Die IL-2-Konzentration zeigte sich innerhalb der Wells mit nur einer stimulierten Zellpopulation unterschiedlich ausgeprägt. Während sie sich innerhalb der stimulierten CD4⁺ T-Zell-Population in zwei von drei Suppressionsassays deutlich erhöht zeigte (M = 138 pg/ml (0 - 210 pg/ml)), zeigte sie sich innerhalb der stimulierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nur mäßig erhöht (M = 33 pg/ml (23 - 37 pg/ml)). Die stimulierte Population der CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen wies mit einer medianen Konzentration von 283 pg/ml (220 - 324 pg/ml) eine etwa doppelt so hohe Zytokinkonzentration auf, wie die Referenzpopulation der stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Gegenüber der Referenzpopulation nahm die IL-2-Konzentration innerhalb der kokultivierten Populationen von CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (CD4⁺/ PD-1⁺ T-Zellen; M = 54 pg/ml (2 - 67 pg/ml)) bzw. CD4⁺ T-Zellen und Tregs (CD4⁺/ Tregs; M = 24 pg/ml (24 – 182 pg/ml)) um 61% bzw. 83% deutlich ab (s. Abb. 5).

TNF- α zeigte sich innerhalb der Population der stimulierten CD4⁺ T-Zellen bzw. der CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen tendenziell leicht erhöht (M = 4 pg/ml (0 - 47 pg/ml) bzw. M = 44 pg/ml (2 - 54 pg/ml)). Innerhalb der CD4⁺/ PD-1⁺ T-Zellen – Wells und der CD4⁺/ Tregs T-Zellen zeigten sich die Werte in der Zusammenschau reduziert (M = 9 pg/ml (0 - 9 pg/ml) und M = 1 pg/ml (0 - 18 pg/ml)). Die Kontrollgruppe der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen zeigte eine ebenfalls verhaltene TNF- α – Sekretion (M = 1 pg/ml (0 - 9 pg/ml)).

Die Konzentration von IL-10 zeigte sich innerhalb der stimulierten CD4⁺ T-Zell-Population schwach erhöht (M = 27 pg/ml (0 - 53 pg/ml)) und in den Wells mit stimulierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen kaum nachweisbar (M = 4 pg/ml (3- 15 pg/ml)). In den Wells der stimulierten CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen zeigte sich eine im Verhältnis zur Referenzpopulation ähnliche IL-10-Konzentration (M = 25 pg/ml (7 - 26 pg/ml)). Im Vergleich zur Referenzpopulation zeigte sich die IL-10-Konzentration in den CD4⁺/ PD-1⁺ T-Zell- bzw. den CD4⁺/ Tregs-Wells (M = 9 pg/ml (0 - 13 pg/ml) bzw. M = 6 pg/ml (3 - 10 pg/ml)) um 67% bzw. 78% gemindert (s. Abb. 5).

Die mit Abstand höchste Konzentration innerhalb der untersuchten Zytokine entfiel auf IFN- γ , das in der Referenzpopulation der CD4⁺ T-Zellen im Median mit 1945 pg/ml (0 - 2729 pg/ml), in den Wells mit stimulierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Median mit 294 pg/ml (198 – 383 pg/ml) und in der Population der CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen im Median mit 2546 pg/ml (2543 – 3818 pg/ml)) nachweisbar war. Dagegen erschien der Wert in den Wells mit CD4⁺/ PD-1⁺ T-Zellen (M = 455 pg/ml (13 - 1174 pg/ml)) bzw. CD4⁺/ Tregs (Median = 558 pg/ml (149 – 665 pg/ml)) deutlich reduziert, nämlich jeweils um über 70% (s. Abb. 5).

In den Kontroll-Wells, bestehend aus einfach kultivierten, unstimulierten CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen kam es jeweils zu keinerlei Zytokinnachweis.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Kokultivierung von CD4⁺ T-Zellen mit einer der beiden immunregulatorischen Zellpopulationen (CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, Tregs) mit einer Reduktion der IL-2-, IL-10- und IFN- γ – Konzentration korrelierte, während sich die Konzentrationen von TNF- α in Abhängigkeit zur Kokultivierung mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs jeweils nur in einem von drei Suppressionsassays reduziert zeigte.

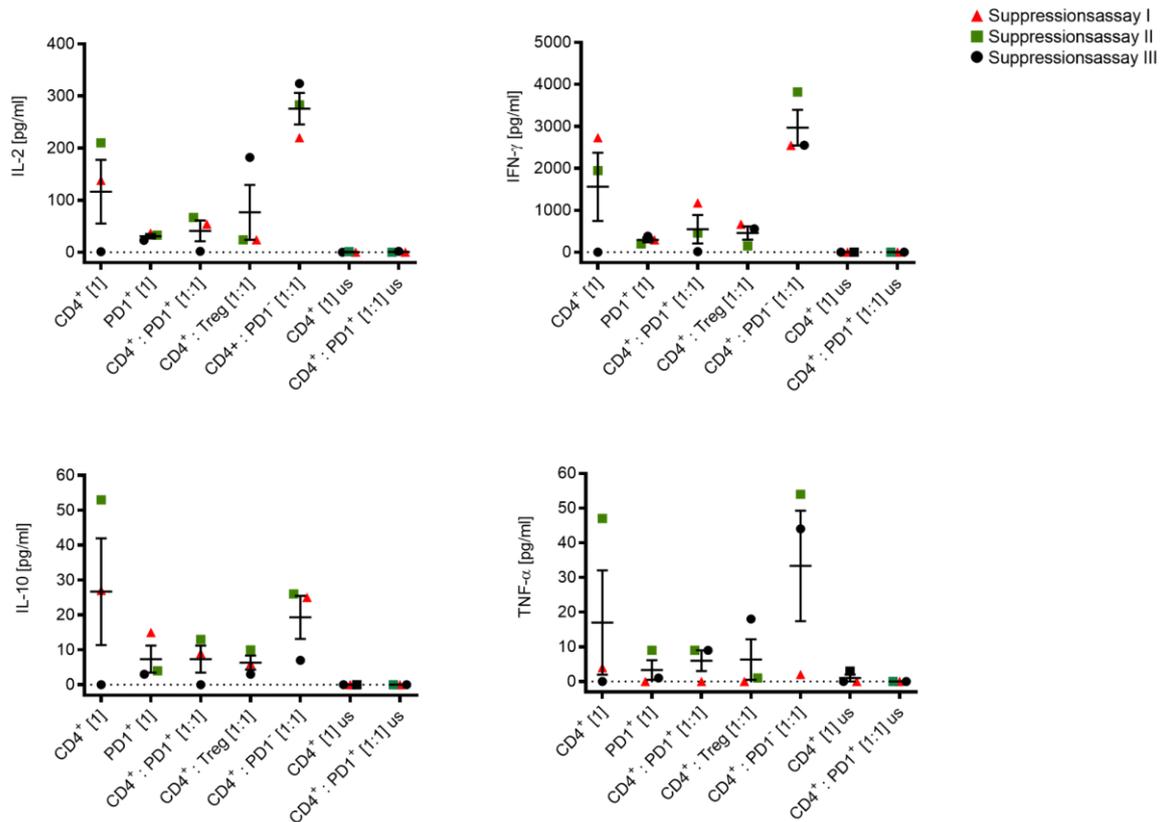


Abbildung 5: Konzentration von IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-10 in den Zellkulturüberständen der durchgeführten Suppressionsassays mittels Bead-basiertem Immunoassay nach 72 stündiger Stimulation.

Analysiert wurden die Überstände stimulierter Mono- und Kokulturen, bestehend aus CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen sowie aus CD4⁺T-Zellen und CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen (CD4⁺: CD4⁺PD-1⁻), CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (CD4⁺: PD-1⁺), und CD4⁺ T-Zellen und Tregs (CD4⁺: Tregs). Die ermittelte Zytokinkonzentration im Überstand stimulierter CD4⁺ T-Zellen diente als Referenzkonzentration, auf die die in den Kokulturen ermittelten Zytokinkonzentrationen bezogen wurden, um PD-1-Rezeptor- bzw. Treg-spezifische Zytokinprofile herauszuarbeiten. Die Wells mit den unstimulierten (us) Populationen, bestehend aus CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen sowie die Kokultur CD4⁺: PD-1⁺ T-Zellen dienten als Kontrollen, um einen Zytokinprofil-modulierenden Effekt allein durch die *in vitro* Inkulturnahme einer Zellpopulation auszuschließen. Die Analyse der kokultivierten CD4⁺: CD4⁺PD-1⁻ Population diente zudem dem Ausschluss einer Suppression der Zytokinausschüttung allein durch den Umstand einer Kokultivierung zweier Zellpopulationen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durchflusszytometrisch, wobei die Konzentration zunächst anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity, MFI*) ermittelt wurde. Anhand einer assay- und zytokinspezifischen Standardkurve ließen sich jeweils die aufgeführten Zytokinkonzentrationen [pg/ml] errechnen.

4.3 Das koinhibitorische Rezeptor-Profil von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen humaner, gesunder Spender

Die Population der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ist im Rahmen einer Malariainfektion *in vitro* in der Lage, auf eine zellextrinsische Weise regulatorische Funktionen gegenüber aktivierten CD4⁺ T-Zellen auszuüben (Mackroth *et al.*, 2016). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, geht die Kokultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender ebenfalls mit einer Verminderung des proliferativen Potentials antigenunabhängig stimulierter CD4⁺ T-Zellen einher (s. Abb. 3). Dieser Effekt korreliert mit einer verminderten IL-2-, IL-10- und IFN- γ - und (teils verminderten) TNF- α – Konzentration in den betreffenden Wells (s. Abb. 5).

Um die regulatorische Population der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen besser zu charakterisieren und Aufschluss über koinhibitorische Rezeptoren zu bekommen, die mit PD-1 zusammen auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden, wurden ruhende CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen von gesunden Probanden hinsichtlich der Koexpression von CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 phänotypisiert. Die Ergebnisse wurden dem Rezeptorprofil von CD4⁺ T-Zellen und Tregs von ebenfalls gesunden Probanden gegenübergestellt, um PD-1-assoziierte Besonderheiten und Gemeinsamkeiten im Koexpressionsprofil zu ermitteln.

Da eine erhöhte Expression von PD-1 auf T_{FH}-Zellen vorbeschrieben ist (vgl. Kap. 1.2.2), stellte sich die Frage, wie groß der Anteil von T_{FH}-Zellen innerhalb der CD4⁺ PD-1⁺ T-Zellen ist. Die Ergebnisse werden als Median (M) dargestellt, zusätzlich werden der höchste und niedrigste gemessene Wert der relativen Expression angegeben (M = x pg/ml (min. Wert – max. Wert pg/ml)).

4.3.1 Expression und Koexpression von Koinhibitoren auf humanen CD4⁺ T-Zellen

Als Ausgangspunkt für die phänotypische Charakterisierung von CD4⁺PD-1⁺ Zellen wurde zunächst die Expression von Koinhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen bestimmt, wie beispielhaft in Abb. 7 dargestellt ist. Die zugrunde liegende Gatingstrategie wird in Abb. 6 deutlich.

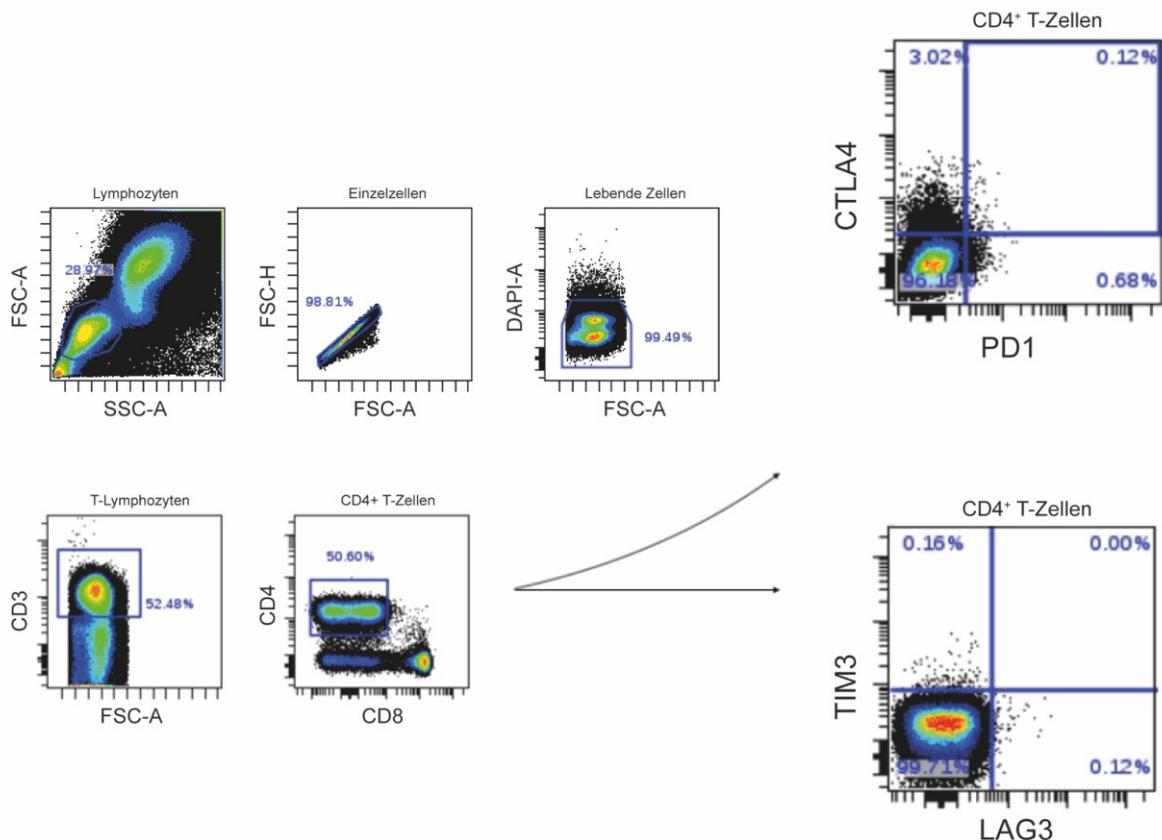


Abbildung 6: Exemplarische Färbung der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 auf CD4⁺ T-Zellen.

Gezeigt ist die exemplarische Färbung einer Vollblutprobe eines gesunden Probanden mit der verwendeten Gating-Strategie. Nach dem auf Lymphozyten gated wurde, wurden Dubletten und abgestorbene Zellen im weiteren Gating-Prozess ausgeschlossen. Anschließend wurde die gewünschte T-Zell-Population mittels CD3- und CD4-Positivität selektiert. Von hier wurde auf die zu analysierenden Koinhibitoren gated. Die Lesart der Abbildung entspricht Abb. 1, aus der auch die Definition für die hier verwendeten Gates hervorgeht. Im dargestellten Beispiel liegt die Expression von LAG-3 und Tim-3 innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population knapp über 0,1%, während die PD-1 - Expression bei 0,7% liegt und damit etwa dem Median der erhobenen Stichprobe (0,72%) entspricht. CTLA-4 wird im Beispiel mit 3,02% am häufigsten auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert. CD4⁺PD-1⁺CTLA-4⁺ T-Zellen, also die T-Zell-Population im oberen rechten Quadranten des CTLA4/ PD1 – Dotplots ((CD4⁺) PD1⁺CTLA-4⁺), machen im gezeigten Beispiel mit 0,12% nur einen kleinen Anteil aller CD4⁺ T-Zellen aus. Zur weiteren Charakterisierung CD4⁺PD1⁺ T-Zellen wurde diese Zellpopulation noch mal gesondert phänotypisiert (s. Abb. 8).

Während PD-1, LAG-3 und Tim-3 im Mittel auf unter 1% der untersuchten Zellen exprimiert wurden, betrug die Expression von CTLA-4 mit durchschnittlich 3,1% (M = 2,6 (1,8 – 5,4%)) ein Vielfaches der anderen Rezeptoren. PD-1 wurde auf 0,7% (0,1 – 1,7%) aller CD4⁺ T-Zellen exprimiert. LAG-3 (M = 0,1% (0,01 – 1,9%)) und Tim-3 (M = 0,2% (0,04 – 9,68%)) wurden noch seltener exprimiert (s. Abb. 6 und 7).

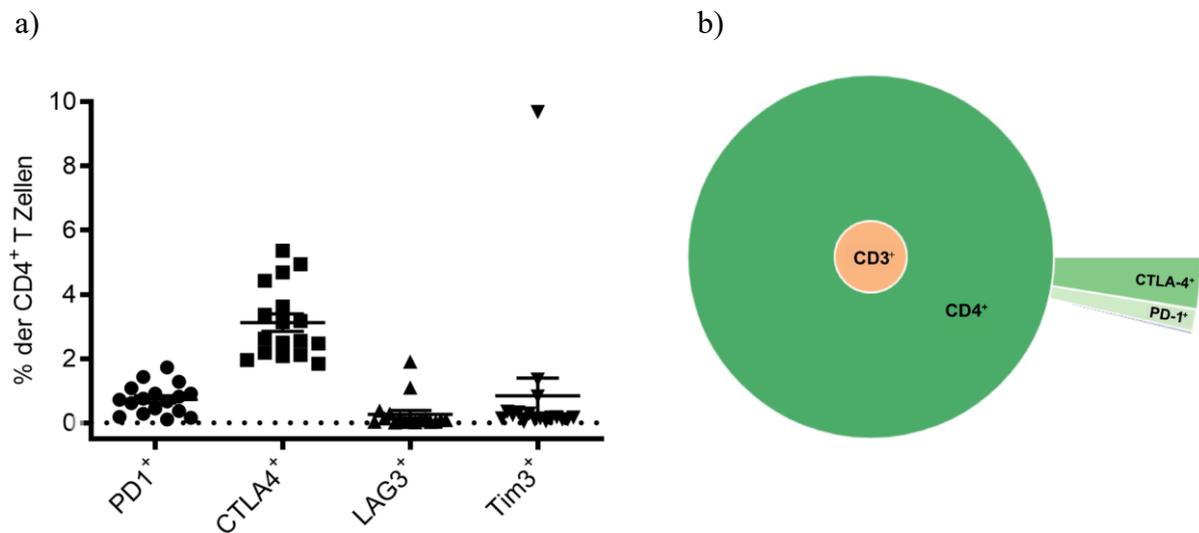


Abbildung 7: Darstellung der Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen.

a) Vollblut von 17 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit oberflächlicher Färbung von PD-1, LAG-3 und Tim-3 sowie intrazellulärer Färbung von CTLA-4 auf CD4⁺ T-Zellen. Die relative Expression bezieht sich auf die Gesamtheit aller CD4⁺ T-Zellen. **b)** Exemplarische Darstellung des Rezeptorprofils von CD4⁺ T-Zellen eines Probanden. Die Abbildung soll das Verhältnis der relativen Expression der Koinhibitoren in Bezug aufeinander repräsentieren. CTLA-4 wird deutlich häufiger exprimiert als PD-1. Die Expression von LAG-3 und Tim-3 ist kaum nachweisbar auf CD4⁺ T-Zellen von gesunden Menschen.

4.3.2 Koexpression von Koinhibitoren auf humanen CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen

Zur genaueren Bestimmung des Rezeptorprofils von CD4⁺PD-1⁺ Zellen wurden diese auf die Koexpression weiterer Koinhibitoren untersucht. Die PD-1-Expression auf CD4⁺ T-Zellen gesunder Menschen war gering (M = 0,7% (0,1 – 1,7%); s. Abb. 7). Die Koexpression von LAG-3 und Tim-3 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen war ebenfalls geringgradig ausgeprägt (M(LAG-3) = 0,6 (0 – 2,3%); M(Tim-3) = 0,4 (0 – 20,5%); s. Abb. 8 und 9). Auffallend war die Koexpression von CTLA-4 auf CD4⁺PD-1⁺ Zellen, die sich im Median mit 16,1% (7,8 – 26,7%) vergleichsweise hoch darstellte. Eine Koexpression mehrerer Koinhibitoren (> 2) auf CD4⁺ T-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

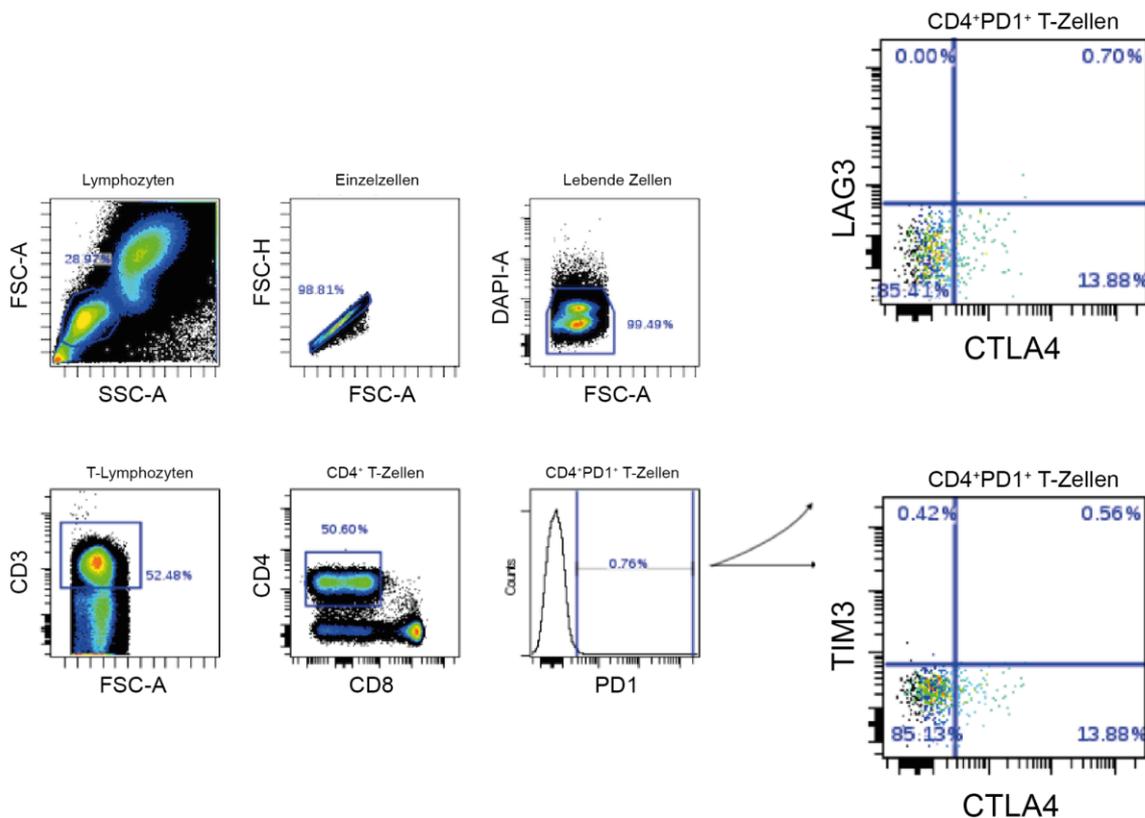
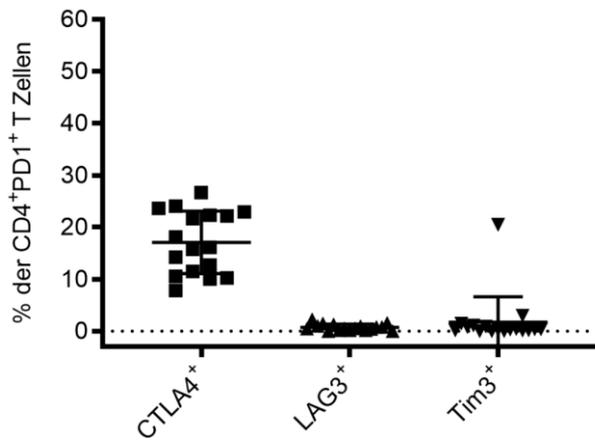


Abbildung 8: Darstellung der Charakterisierung von CD4⁺PD1⁺ T-Zellen hinsichtlich der Koexpression weiterer Koinhibitoren anhand einer exemplarischen Färbung.

Zu sehen ist die Färbung einer Vollblutprobe eines gesunden Probanden mit einer Gating-Strategie, die der auf Abb. 6 ausgeführten Strategie entspricht. Im Beispiel dargestellt ist, dass es mit Ausnahme von CTLA-4 zu keiner nennenswerten Koexpression von Koinhibitoren kommt. CTLA-4 hingegen wird auf 13,9% aller CD4⁺PD1⁺ T-Zellen exprimiert (vgl. Abb. 9).

a)



b)

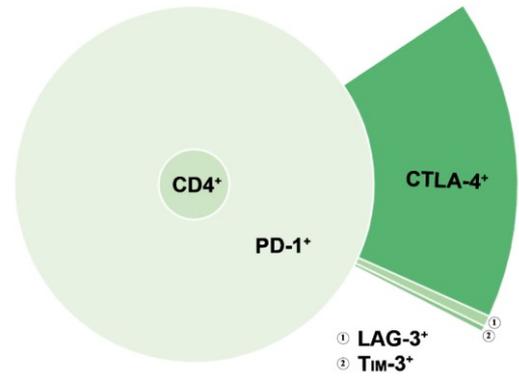


Abbildung 9: Darstellung der Expression von Koinhibitoren auf PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen.

a) Vollblut von 17 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit oberflächlicher Färbung von PD-1, LAG-3 und TIM-3 sowie intrazellulärer Färbung von CTLA-4. Die relative Expression der hier dargestellten Koinhibitoren (CTLA-4, LAG-3, Tim-3) bezieht sich auf die Gesamtheit aller CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen. LAG-3 bzw. Tim-3 werden im Median auf 0,6% (0-2,3%) bzw. auf 0,4% (0 - 20,5%) aller CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimiert. CTLA-4 wird im Median auf 16,1% (7,8 – 26,7%) aller CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimiert. **b)** Visualisierung der prozentualen Verteilung von Koinhibitoren auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen anhand einer exemplarischen Färbung. Die Grafik zeigt, dass LAG-3 und Tim-3 nur auf einer sehr kleinen Anzahl von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimiert wird, wohingegen deutlich mehr CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen CTLA-4 koexprimieren.

4.3.3 Expression von Koinhibitoren auf humanen Regulatorischen T-Zellen

Als Referenzpopulation, der die Phänotypisierungsdaten von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gegenübergestellt werden können, wurden Tregs phänotypisiert. Die Population der Tregs macht im Durchschnitt einen Anteil von 5% an der Gesamtpopulation aller CD4⁺ T-Zellen aus (M = 4,34% (2,38 – 7,76%). Auf Tregs liegt die Expression von PD-1 im Median bei 0,1% (0 – 0,53%) und beträgt damit etwa ein Viertel der PD-1-Expression auf CD4⁺ T-Zellen. Eine weiterführende Analyse der Koexpression weiterer Koinhibitoren auf Tregs, die bereits einen Koinhibitor exprimieren, ist aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht erfolgt. Die Expression von CTLA-4 auf Tregs liegt im Median bei 27% (18,4 – 49%), die Expression von LAG-3 (M = 0,3% (0,1 – 2,4%)) und Tim-3 (M = 0,2 (0 – 6,5%)) deutlich darunter (s. Abb. 10 und 11).

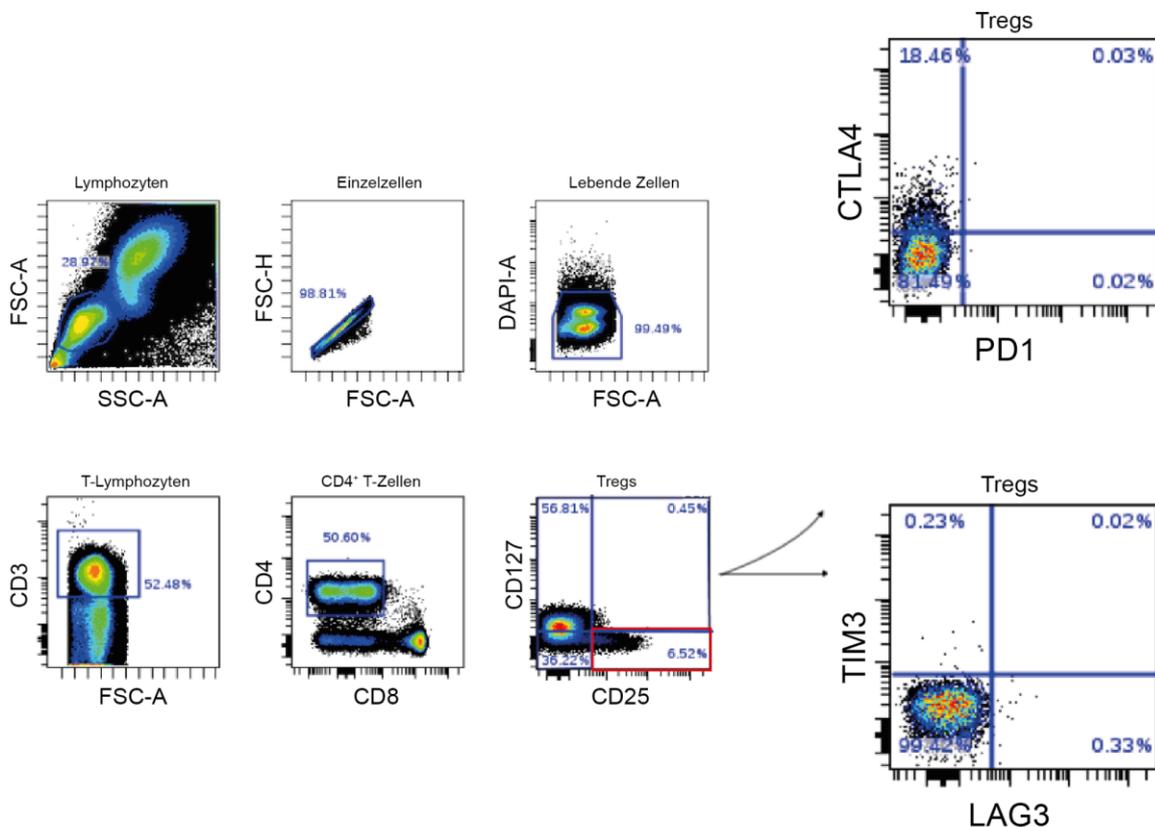


Abbildung 10: Exemplarische Färbung von Regulatorischen T-Zellen hinsichtlich der Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3.

Zur Erläuterung der abgebildeten Gatingstrategie, s. Abb. 6. Darüber hinaus zu sehen ist die Färbung von Koinhibitoren auf Regulatorischen T-Zellen, die als CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-Zellen (rechter unterer Quadrant im entsprechenden Dotplot) definiert sind. Während PD-1, LAG-3 und Tim-3 jeweils auf weniger als 0,3% aller Tregs exprimiert werden, wird CTLA-4 im gezeigten Beispiel auf 18,5% aller Tregs exprimiert.

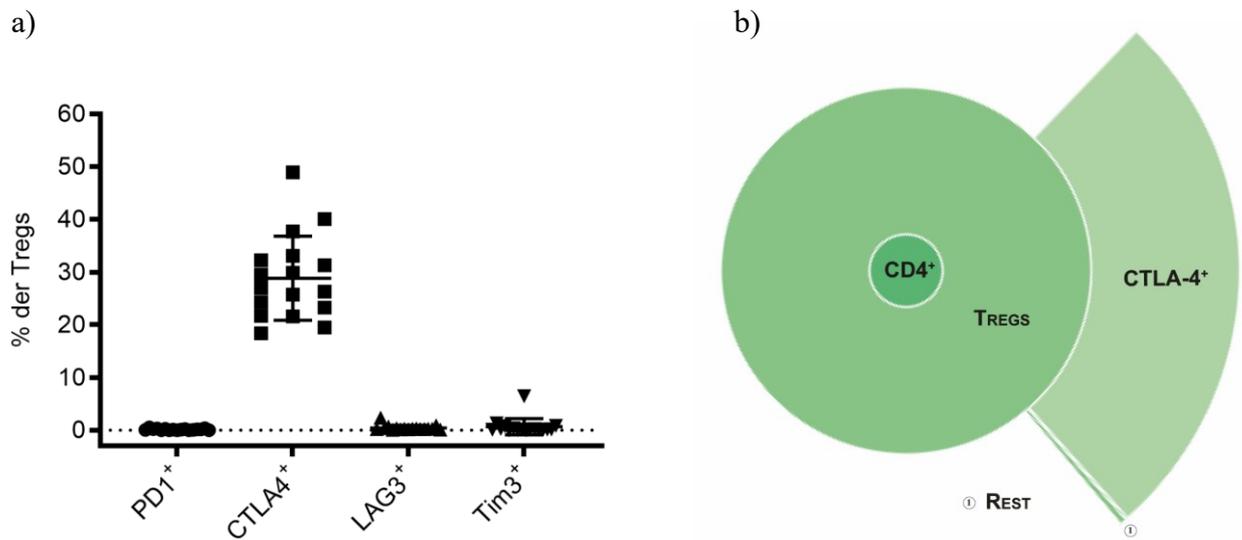


Abbildung 11: Darstellung des Koinhibitorprofils Regulatorischer T-Zellen.

a) Vollblut von 17 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit oberflächlicher Färbung von PD-1, LAG-3 und Tim-3 sowie intrazellulärer Färbung von CTLA-4 auf CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-Zellen (Tregs). Die relative Expression bezieht sich auf die Gesamtheit aller Tregs. **b)** Exemplarische Darstellung des Rezeptorprofils von Tregs eines Probanden. Die Abbildung soll das Verhältnis der relativen Expression der Koinhibitoren in Bezug aufeinander repräsentieren. Zu sehen ist, dass CTLA-4 in hohem Maße auf Tregs exprimiert werden, während die übrigen untersuchten Koinhibitoren (Rest) kaum exprimiert werden.

4.3.4 Anteil von T_{FH}-Zellen an der Population humaner CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen

T_{FH}-Zellen sind eine weitere CD4⁺ T-Helferzell-Subpopulation, die essentiell ist im Rahmen der Aktivierung und Differenzierung naiver B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (Law *et al.*, 2020). Der oberflächlich exprimierte Chemokinrezeptor CXCR-5 kann gemeinsam mit PD-1 als definierender Populationsmarker herangezogen (vgl. Kapitel 1.2.2). Zur Ermittlung des Anteils von T_{FH}-Zellen an der Population ruhender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wurde daher die Population CXCR-5 – exprimierender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ermittelt.

Der Anteil von CXCR-5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen liegt im Mittel bei 31%, was einer deutlichen Anreicherung von T_{FH}-Zellen innerhalb der Population der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gegenüber der Population CD4⁺ T-Zellen entspricht, innerhalb derer T_{FH}-Zellen durchschnittlich 13% ausmachen (s. Abb. 12 und 13).

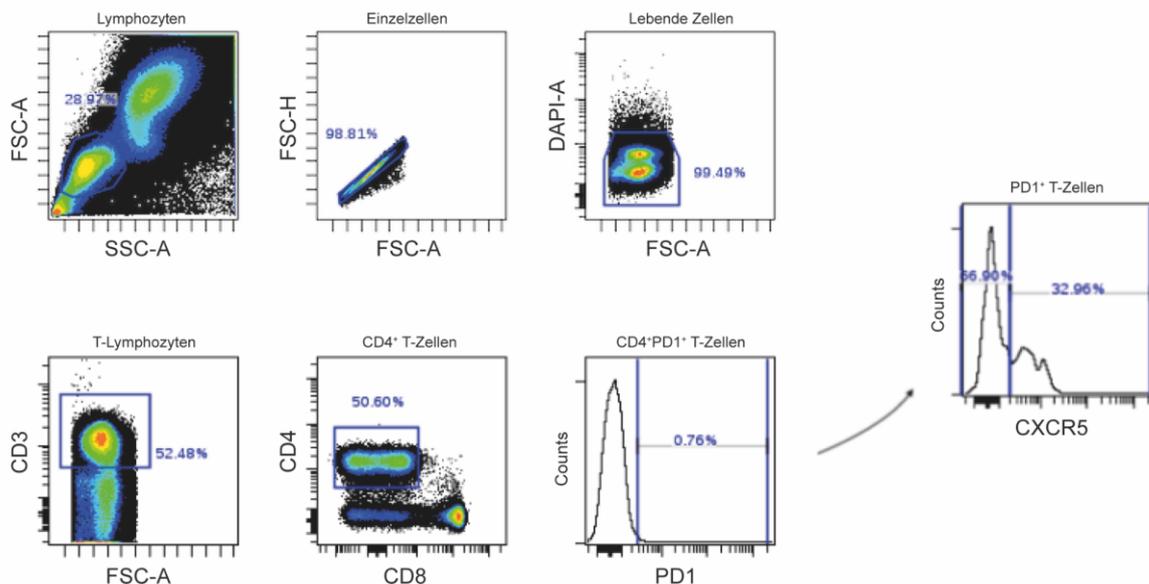


Abbildung 12: Gatingstrategie zur Identifikation von T_{FH} – Zellen innerhalb CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen.

Zunächst wurde nach dem in Abb. 1 skizzierten Gatingschema verfahren, um CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen zu identifizieren. Anschließend wurde die Population der CXCR-5⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen bestimmt. Mit der Identifizierung CD4⁺CXCR-5⁺ T-Zellen ist analog verfahren worden (Abb. nicht gezeigt). Der Anteil von T_{FH}-Zellen an CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen macht im gezeigten Beispiel 33% (gegenüber einem Gesamtdurchschnitt von aus 31%) aus.

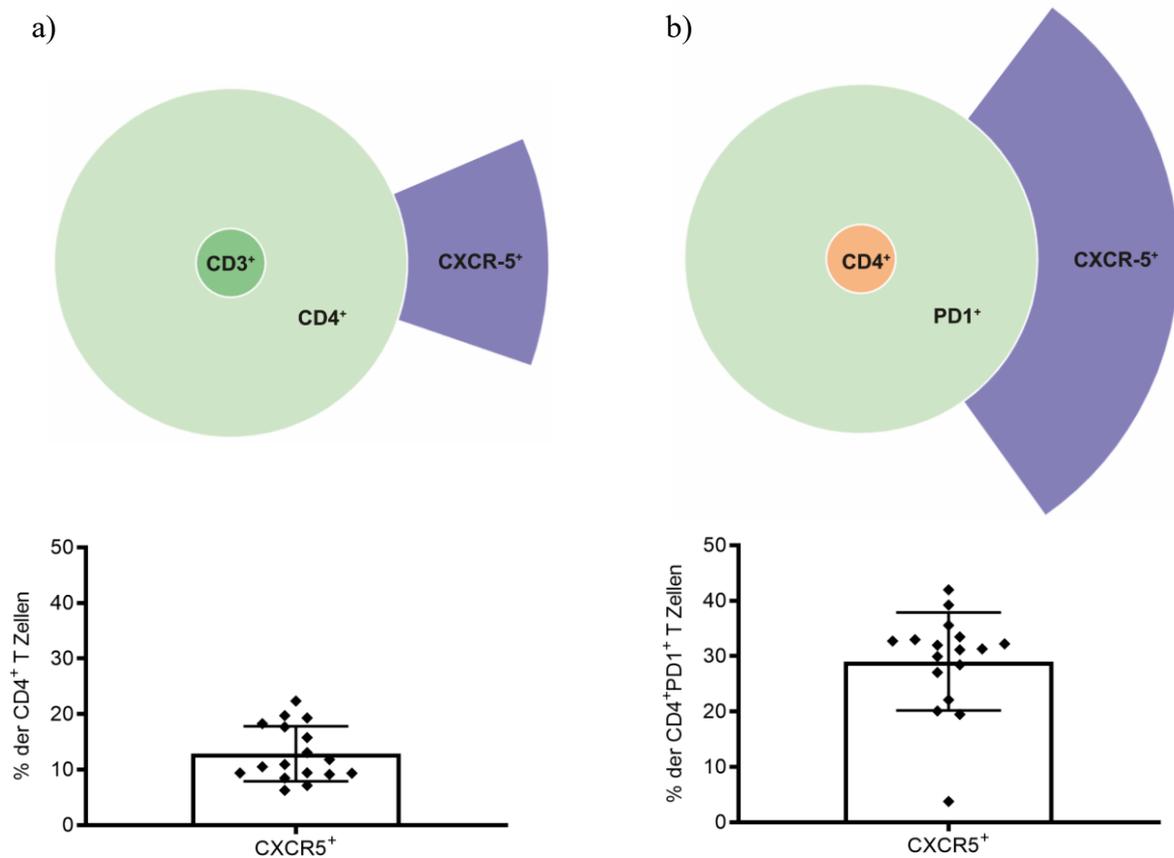


Abbildung 13: Darstellung des Anteils von T_{FH} - Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen sowie innerhalb $CD4^+PD1^+$ T-Zellen.

Vollblut von 17 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit oberflächlicher Färbung von PD-1 und CXCR-5 zur Bestimmung des Anteils von (a) T_{FH} – Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen sowie (b) innerhalb der $CD4^+PD1^+$ T-Zellen. Im oberen Teil der Abbildung befindet sich jeweils eine exemplarische Darstellung des Anteils von (a) T_{FH} – Zellen innerhalb von $CD4^+$ T-Zellen sowie (b) innerhalb $CD4^+PD1^+$ T-Zellen als Sunburst-Diagramm. Der korrespondierende Graph befindet sich jeweils darunter.

Zusammengefasst zeigte die Phänotypisierung von $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen, $CD4^+$ T-Zellen und Tregs eine sehr geringe Expression von LAG-3 und Tim-3. PD-1 wurde nicht auf Tregs und von $CD4^+$ T-Zellen spärlich exprimiert. CTLA-4 wurde in allen untersuchten Populationen häufiger exprimiert als die übrigen Koinhibitoren. Neben einer relativ geringen CTLA-4 – Expression auf $CD4^+$ T-Zellen (3%; von denen sich wiederum 44% den Tregs zuordnen ließen; Daten nicht gezeigt) und einer erwartungsgemäß hohen Expression auf Tregs (29%), zeigte sich eine unerwartet hohe Koexpression von CTLA-4 auf $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen (17%). Von diesen CTLA-4 – exprimierenden $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen ließen sich lediglich 6% den Tregs zuordnen (Daten nicht gezeigt). Etwa ein Sechstel der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen exprimierten also CTLA-4 neben PD-1. Ein Drittel der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen ließ sich den T_{FH} -Zellen zuordnen.

4.3.5 Exemplarische Koinhibitoren-Färbung eines mit *P. falciparum* infizierten Patienten

Um die Dynamik der Veränderung in der Koinhibitorexpression auf CD4⁺ T-Zellen im Kontext einer Malariainfektion zu demonstrieren und darüber hinaus einen Eindruck davon zu bekommen, inwiefern sich der Anteil von CXCR-5⁺ T-Zellen an CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen im Rahmen einer unkomplizierten Malariainfektion ändert, wurde exemplarisch das Vollblut eines Probanden analysiert.

Der Patient stellte sich mit einer akuten, unkomplizierten Malariainfektion durch *P. falciparum* an zwei aufeinander folgenden Tagen in der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Instituts in Hamburg vor. Leider stellte sich bei der Auswertung der Blutproben des Patienten heraus, dass die CD4 – Rezeptorfärbung versagt hatte (s. Abb. 14).

Es erfolgte die augenblickliche Nachfärbung der Proben, die keinerlei Verbesserung des Ergebnisses brachte. Auch die Aufarbeitung der zweiten Blutprobe einen Tag später, zeigte keinerlei angefärbte CD4⁺ T-Zellen, wobei eine HIV-Infektion des Patienten ein Ausschlusskriterium zur Aufnahme in eine Studie gewesen wäre. Angesichts dessen ließe sich neben einem technischen Fehler beispielsweise auch über eine Punktmutation der Rezeptorbindungsstelle spekulieren, an die der anti-CD4 – Antikörper normalerweise bei menschlichen T-Zellen bindet. In der Folge wurde eine behelfsweise Gatingstrategie für CD4⁺ T-Zellen unter der Annahme versucht, dass es sich um ein technisches Problem handelt und die Population der CD4⁺ T-Zellen in der untersuchten Blutprobe des Malariapatienten enthalten sind. Für die Erfassung dieser vermuteten CD4⁺ T-Zellen wurde ein Gate auf den Bereich der CD8⁻ T-Zellen gezogen (s. Abb. 15a). Die so eingeschlossenen, mutmaßlich CD4⁺ und sicher CD8⁻ T-Zellen werden im Folgenden kurz CD8⁻ T-Zellen genannt. Zur Untermauerung dieses Vorgehens wurden bereits analysierte Proben auf zweierlei verschiedene Art gegatet: Zum einen mittels der behelfsweisen Gatingstrategie, die in den Abbildungen 14 und 15a veranschaulicht ist, und zum anderen mittels der regelrechten Gatingstrategie. Die erneute Untersuchung der gesunden Blutproben mit der behelfsweisen Gatingstrategie für CD4⁺ T-Zellen mit einem Gate auf CD8⁻ und CD4⁺ T-Zellen erbrachte im Wesentlichen die gleichen Phänotypisierungsergebnisse hinsichtlich der Expression von Koinhibitoren und dem Chemokinrezeptor CXCR-5 zeigten, wie mit einem regulären CD4 - Gate (vgl. Abb. 15b und c).

Aufgrund der Knappheit der zur Verfügung stehenden Malaria-infizierten humanen Blutproben sowie der Nebenrolle der durchflusszytometrischen Untersuchung einer humanen Malaria-Blutprobe im Design dieser Arbeit, ist die Probe trotz dieser

Ungenauigkeiten verwendet worden. Die folgenden Ergebnisse sind angesichts dessen als exemplarischer Ausblick auf die Dynamik der Koinhibitor- und CXCR-5 - Expression auf $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ T-Zellen von Gesunden zu verstehen. Die Ergebnisse werden unter der Annahme gezeigt, dass sich die Population der $CD4^+$ T-Zellen im erweiterten Gate auf $CD8^-$ T-Zellen verbirgt und haben daher eine eingeschränkte Aussagekraft.

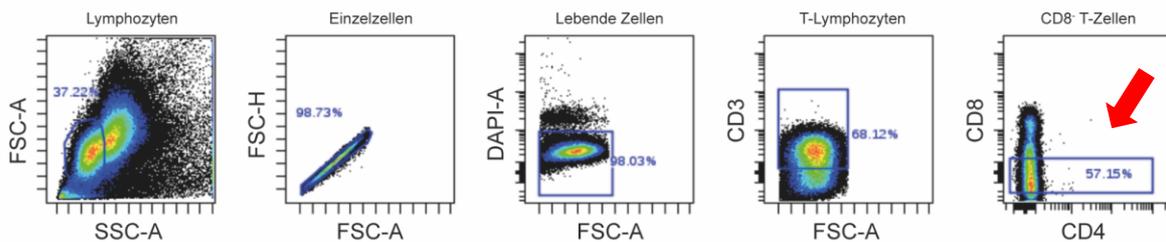


Abbildung 14: Veranschaulichung der zugrundeliegenden Gatingstrategie anhand der Färbung des malaria-infizierten Blutes vom Tag der Erstvorstellung des Patienten.

Technisch ist bei der Aufarbeitung und Färbung der mit *P. falciparum* infizierten Blutprobe vorgegangen worden, wie bei der Phänotypisierung der gesunden Vollblutproben (vgl. Abb. 1 und 6). Wie im äußerst rechten Dotplot zu sehen ist, mißlang die Anfärbung $CD4^+$ T-Zellen, wobei eine HIV-Infektion im Vorfeld der Probenakquise ein Ausschlusskriterium gewesen wäre. Der mit dem Pfeil gekennzeichnete Dotplot zeigt die nicht-vorhandene $CD4^+$ T-Zell-Population, anstelle derer auf die Population der $CD8^-CD4^-$ T-Zellen unter Einschluss der formell nicht vorhandenen $CD4^+$ gefärbten T-Zellen ($CD8^-$) gegatet wurde.

4.3.5.1 Evaluation einer behelfswisen Gatingstrategie zur Auswertung der fehlgefärbten Malariaprobe

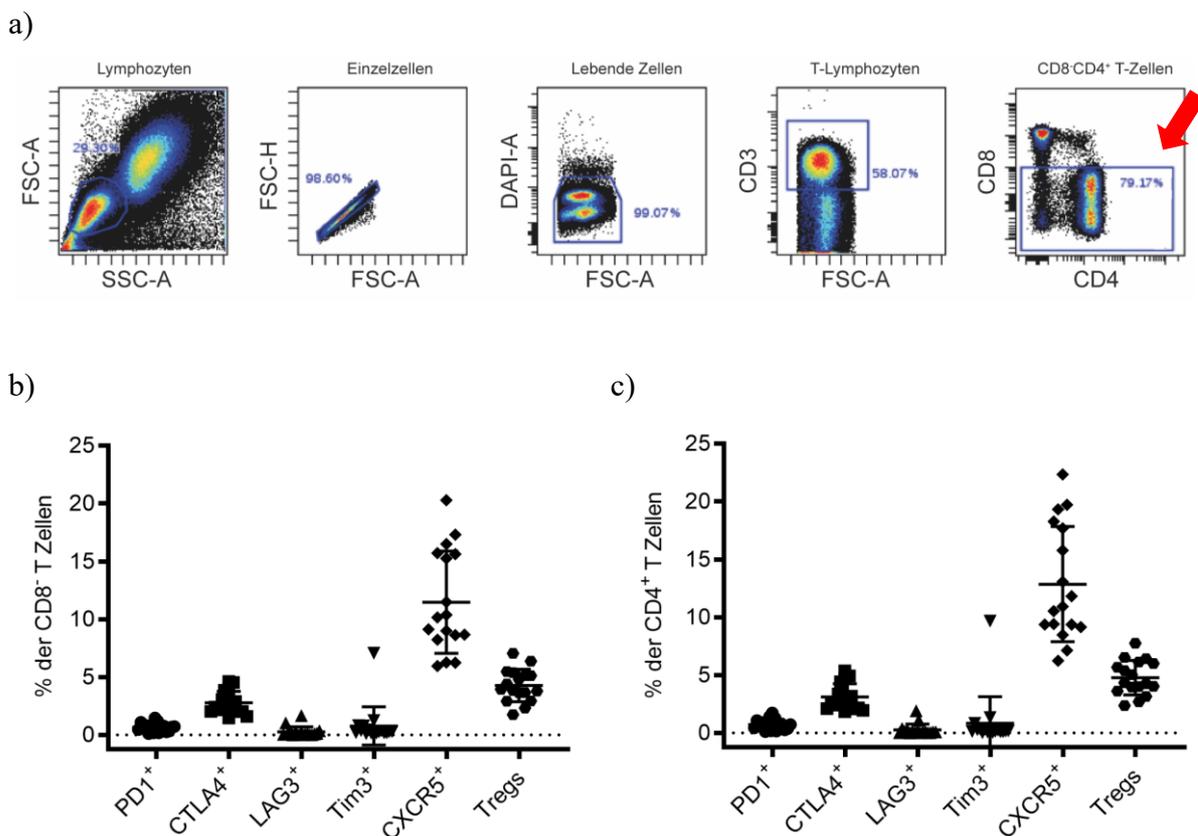


Abbildung 15: Gegenüberstellung des Rezeptorprofils von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf Grundlage der 17 Blutproben von Gesunden zur Evaluation der Interpretierbarkeit der fehlgefärbten Malaria-Blutprobe.

Darstellung von jeweils 17 Vollblut-Proben, die bereits als Grundlage für die Phänotypisierung von CD4⁺ T-Zellen, PD-1⁺ T-Zellen und Tregs humaner gesunder Probanden in den vorangegangenen Kapiteln dienten (s. Kap. 4.3.1). **a)** Behelfswise Gatingstrategie einer regelrecht gefärbten Vollblutprobe eines Gesunden zur Evaluation der Interpretierbarkeit von Phänotypisierungsdaten auf Grundlage von CD8⁺ T-Zellen. Nach dem Gating auf Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zelle und T-Zellen nach bekanntem Schema (vgl. Abb. 1), ist das Gate, das eigentlich CD4⁺ T-Zellen identifizieren soll, so groß angelegt worden, dass auch CD8⁻CD4⁺ T-Zellen mit in das Gate für CD4⁺ T-Zellen eingeschlossen wurden (durch roten Pfeil gekennzeichnetes Gate). Auf diese Weise wurde die bei der fehlgefärbten Malariaprobe verwendete Gatingstrategie und der Umstand des Einschusses von CD8⁻CD4⁺ T-Zellen in das Gate für CD4⁺ T-Zellen simuliert, um den so bedingten Grad der Verfälschung der Phänotypisierungsergebnisse abschätzen zu können. **b)** Expression von Koinhibitoren und dem Chemokinrezeptor CXCR-5 auf CD8⁺ T-Zellen sowie Quantifizierung des Anteils an Tregs innerhalb der Population CD8⁺ T-Zellen. Die zugehörige Gatingstrategie ist der Strategie nachempfunden, die auch bei der fehlgefärbten Malariaprobe angewendet wurde (s. Abb. 14 und 15a). Das CD4-unabhängige Gating entsprach der in Abb. 1 dargestellten Gatingstrategie. **c)** Die Abbildung basiert auf den Daten, die bereits in diesem Kapitel gezeigt wurden (Kap. 4.3.1. – 4.3.4) und dient hier lediglich der direkten Gegenüberstellung.

Um zu testen, wie sehr die Phänotypisierungsergebnisse hinsichtlich der Expression von Koinhibitoren und CXCR-5 auf CD8⁻CD4^{+/+} T-Zellen von den bereits erhobenen, regelrecht gefärbten- und gegateten Ergebnissen auf CD4⁺ T-Zellen (vgl. Kap. 4.3.1. – 4.3.4) abweichen, wurde die behelfsweise Gatingstrategie der regelrechten Gatingstrategie gegenübergestellt und verglichen, ob sie in der Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden vergleichbare Ergebnisse liefert. Der Grad der Abweichung der Phänotypisierungsdaten unter Verwendung der unterschiedlichen Gatingstrategien diente als Rationale für die Entscheidung für oder gegen die Verwendung der fehlgefärbten Malariaprobe.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, weichen die Daten nur marginal voneinander ab. Das könnte beispielsweise durch den normalerweise nur geringen Anteil der CD8⁻CD4⁻ T-Zellen an der ausgewerteten Gesamtpopulationen CD3⁺ T-Zellen liegen, der bei den Blutproben der gesunden Spender im Schnitt bei 14% lag. Vor diesem Hintergrund wird die fraglich-fehlgefärbte Malariaprobe im Folgenden ausgewertet und den Ergebnissen der Analyse der Blutproben gesunder Spender als exemplarischer Ausblick der Koinhibitorexpression in einem immunologischen Kontext, in dem bereits ein extrinsisch-regulatorisches Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Dies geschieht mit dem expliziten Verweis auf die Notwendigkeit der Ergänzung und Wiederholung des Versuchs mit einem größerem Stichprobenumfang und auf technisch zweifelsfreier Grundlage.

4.3.5.2 Vergleich der Rezeptorexpression von CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und Tregs eines mit *P. falciparum* infizierten Menschen mit gesunden Menschen

Die PD-1-Expression auf CD4⁺ T-Zellen des Patienten stieg zwischen den beiden Untersuchungspunkten an. Initial betrug sie 0,9% (t0), am Folgetag 2,93% (t1), was eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen von Gesunden bedeutete. Die Expression von PD-1 auf Tregs lag mit 0,9% (t0) bzw. 1,2% (t1) unter der Expressionsrate von Gesunden (2%). CTLA-4 wurde von allen untersuchten Koinhibitoren am häufigsten exprimiert: 6,7% (t0) bzw. 11,2% (t1) aller CD4⁺ T-Zellen, 50,2% (t0) bzw. 48,1% (t1) aller Tregs und 77,4% bzw. 80,3% aller CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimierten CTLA-4.

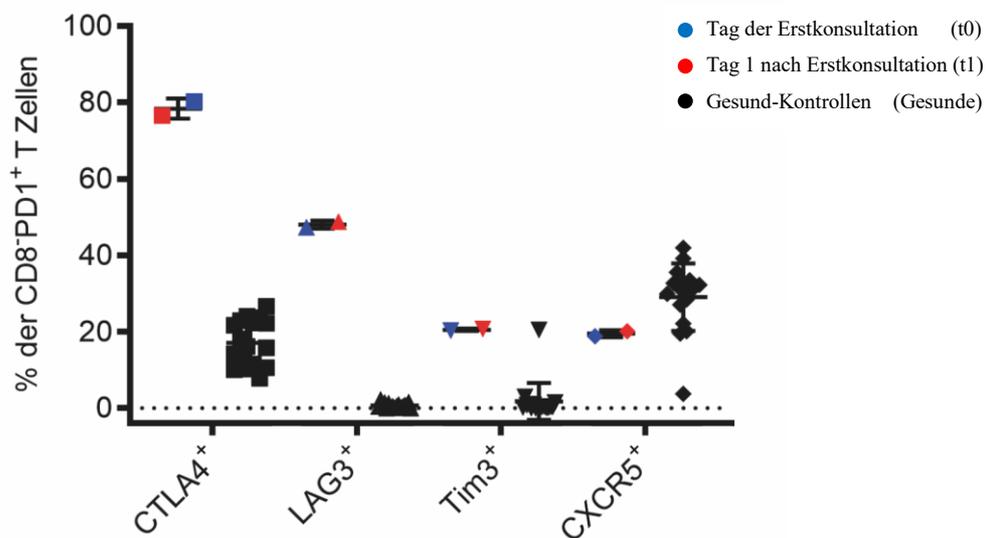


Abbildung 16: Phänotypisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch *P. falciparum* Erkrankten.

Vollblut-Analyse eines Malaria-infizierten Probanden. Das Blut wurde zur durchflusszytometrischen Untersuchung oberflächlich auf die Rezeptoren CD25, CD127, CD4, PD-1, LAG-3, Tim-3 und CXCR-5 gefärbt sowie intrazellulär auf die Rezeptoren CD3 und CTLA-4. Die Gatingstrategie hinsichtlich der Definition CD4⁺ T-Zellen entsprach der in Abb. 14 dargestellte Strategie, d.h. das Gate für CD4⁺ T-Zellen umfasst zusätzlich noch die Quadranten für CD8⁻CD4⁺ T-Zellen (CD8⁻CD4⁺ oder CD4⁺).

Das übrige Gatingschema hinsichtlich der Koinhibitoren, Chemokinrezeptoren und T-Zell-Subpopulationen entsprach der in Abb. 1 skizzierte Strategie. Der Tag der Vorstellung des Patienten in der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Instituts (t0) ist in roten Punkten dargestellt, die Folgekonsultation (t1) am Tag danach in blauen Punkten. Die schwarzen Punkte stellen die Analyse gesunder, humaner Proben dar, die als Kontrollen hinsichtlich der Rezeptor-Expression auf den *P. falciparum* – exponierten T-Zellen dienen. Die Kontrollen sind nach demselben Schema gegatet worden, wie die Malaria-Proben (vgl. Abb. 15a).

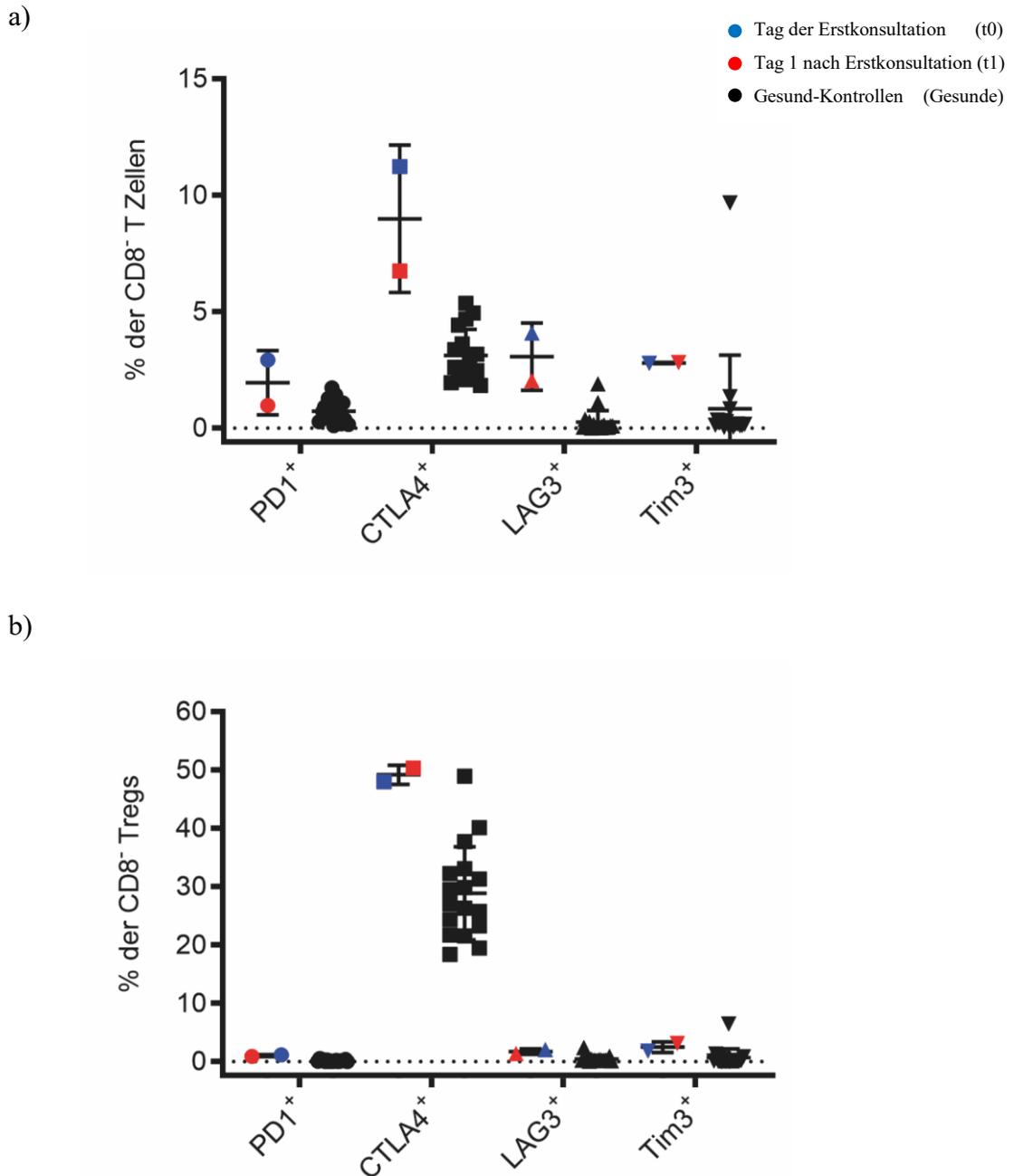


Abbildung 17: Phänotypisierung von CD4⁺ T-Zellen und Tregs eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch *P. falciparum* Erkrankten.

Vollblut-Analyse eines Malaria-infizierten Probanden. Aufarbeitung des Bluts und Gatingschema entsprechen Abb. 15a. Die Phänotypisierung von (a) CD4⁺ T-Zellen und (b) Tregs erfolgte zur Gegenüberstellung der phänotypisierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zell-Population. CD4⁺ T-Zellen und Tregs exprimieren jeweils insgesamt nur mäßig mehr Koinhibitoren im Vergleich zu Gesunden und im Verhältnis zur insgesamt gesteigerten Expressionsrate auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen.

Die LAG-3 – Expression betrug auf CD4⁺ T-Zellen 2% (t0) bzw. 4,1% (t1), auf Tregs jeweils 1,4% (t0) und 2,1% (t1) und auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen 48,7% bzw. 47,3% (vgl. Abb. 16-18). Die Expression von Tim-3 lag an beiden Tagen unverändert bei 2,8% auf CD4⁺ T-Zellen, bei 3,1% (t0) bzw. bei 1,86% (t1) auf Tregs und bei 22% (t0) bzw. 20,3% (t1) auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-5 lag auf CD4⁺ T-Zellen bei 14,7% (t0) bzw. 13,7% (t1) und auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen bei 20,3% (t0) bzw. bei 18,9%.

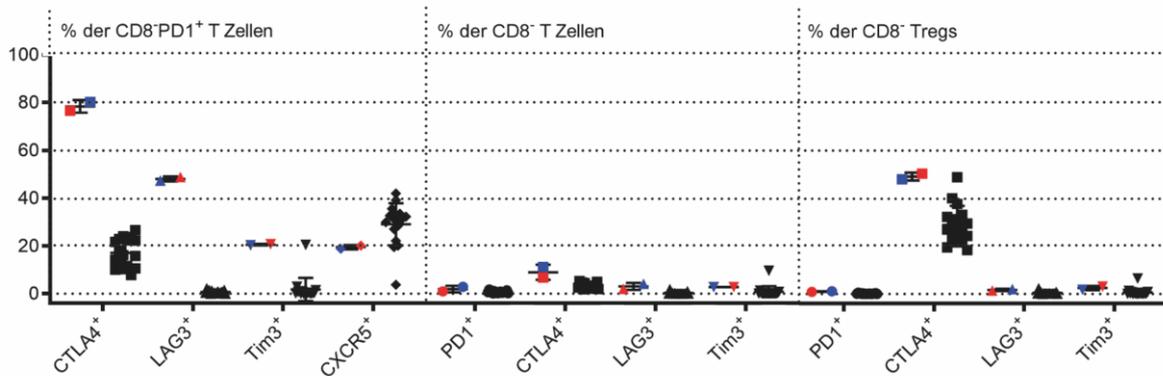


Abbildung 18: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Phänotypisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und Tregs eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch *P. falciparum* Erkrankten. Aufarbeitung des Bluts und Gatingschema entsprechen Abb. 15a. Die *P. falciparum* – assoziierte Zunahme der Koinhibitor (Ko-) Expression fällt auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen besonders deutlich aus (CTLA4 >> LAG3 > Tim3). Demgegenüber imponiert eine leichtgradige Abnahme des Anteils von T_{FH}-Zellen an der CD4⁺PD-1⁺ T-Zell – Population.

Zusammengefasst zeigte sich eine deutliche Zunahme der Koexpression von Koinhibitoren auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen. Besonders fiel dabei die Koexpression von CTLA-4 durch einen Großteil der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf, die einer Steigerung der CTLA-4 – Koexpression um den Faktor 5 entsprach. Interessanterweise entfiel die größte relative Steigerung der Expression auf CD4⁺ T-Zellen und Koexpression auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf LAG-3, nämlich um den Faktor 10 bei CD4⁺ T-Zellen und um den Faktor 60 bei CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen.

Der Anteil von T_{FH} Zellen verringerte sich innerhalb der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen leichtgradig im Vergleich zu einem etwa konstanten Anteil an CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Von Bedeutung ist, dass der Anteil CTLA-4 exprimierender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen innerhalb beider Malariaprobe vergleichbar hoch war, nachdem mittels Boolean Gating-Strategie Tregs aus der Population der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen herausgerechnet wurden (78%; Daten nicht gezeigt), d.h. in der Population CTLA-4 - exprimierender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen sind keine Tregs enthalten.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die regulatorischen und phänotypischen Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gesunder Probanden *in vitro* zu charakterisieren. Es konnte eine extrinsisch-regulatorische Wirkung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf stimulierte CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden, die mit einer Verminderung der Konzentrationen von IL-2, IFN- γ und IL-10 einherging. Ruhende CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wiesen eine vergleichsweise hohe Koexpression von CTLA-4 auf und konnten zu etwa einem Drittel den T_{FH}-Zellen zugeordnet werden. Die Koexpression von CTLA-4 ließ sich anhand einer humanen *P. falciparum* – infizierten Blutprobe in deutlich gesteigerter Form nachvollziehen.

Inwiefern die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen im gesunden, menschlichen Organismus ein Marker für eine physiologische und temporäre Balancierung einer akuten Immunreaktion, ein Ausdruck eines Erschöpfungszustands der betreffenden Zellen oder ein Ausdruck nicht nur einer immunregulierten, sondern auch einer regulierenden Zellpopulation ist, ist aktuell unklar. Darüber hinaus bietet die weitere Charakterisierung CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen – hier geschehen anhand der Analyse des Zytokinprofils sowie der Koexpression weiterer Koinhibitoren und des Chemokinrezeptors CXCR-5 - eine Annäherung an die Frage, ob die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen das alleinige und entscheidende Merkmal zur Erklärung der hier gezeigten Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ist oder ob weitere Faktoren, wie beispielsweise ein distinktes Zytokinmilieu oder die Koexpression weiterer Koinhibitoren, dazu nötig sind. Zur Einordnung der hiesigen Befunde in das bestehende Verständnis von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, werden im Folgenden immer wieder Bezüge zu unterschiedlichen immunologischen Settings und den jeweiligen kontextspezifischen Eigenschaften von PD-1 hergestellt, um daraus Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu der hier charakterisierten Population von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ableiten zu können.

5.1 CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gesunder Menschen können die Proliferation stimulierter CD4⁺ T-Zellen hemmen

In den durchgeführten Suppressionsassays zeigte sich bei allen drei Probanden eine dosisabhängige Suppression der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen, die polyklonal mittels anti-CD3/ anti-CD28 – Beads stimuliert und mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen kokultiviert wurden. Der Effekt war in zwei der drei Assays weniger stark ausgeprägt als bei Kokultivierung von

stimulierten CD4⁺ T-Zellen mit Tregs. In einem von drei Assays zeigte sich eine stärkere Suppression als bei Kokultivierung mit Tregs (s. Abb. 3). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen *in vitro* auch unabhängig vom Malariakontext eine Treg-ähnliche Funktion ausüben können, ohne dabei phänotypische Merkmale von Tregs aufzuweisen. Dies weist darauf hin, dass ein solcher extrinsisch-regulatorischer Mechanismus antigenunabhängig induzierbar ist und auch in anderen immunologischen Settings eine Rolle spielen könnte.

Zur Ermittlung der Ergebnisse ist ein ³H Thymidin – Proliferationsassays verwendet worden. Hierbei wird radioaktives Thymidin im Laufe der S-Phase proliferierender Zellen in die neu entstehende DNA verbaut und dient als Surrogatmarker für die Proliferation innerhalb der entsprechend behandelten Zellpopulation. Da der Einbau des ³H Thymidin in die neu entstehende DNA nicht regelmäßig, sondern zufällig verteilt ist, ist eine Verteilung der radioaktiven Base in der neu synthetisierten DNA denkbar, die nicht 1:1 mit der Zellproliferation korreliert. Darüber hinaus wurde eine mögliche, dosisabhängige Inhibition der DNA-Synthese durch ³H Thymidin diskutiert (Hu *et al.*, 2002). Weniger störanfällig wäre ein Proliferationsassay mit dem Proliferationsfarbstoff eF450, der nicht von der DNA der Zielzellen inkorporiert wird und darüber hinaus die Teilungsschritte der Zielzellpopulation auf Zellebene quantifizierbar macht. Innerhalb der Arbeitsgruppe, aus der heraus diese Arbeit entstanden ist, sind in der Zwischenzeit beide Methoden gegenübergestellt worden, wobei sich die jeweiligen Ergebnisse in ihrer Aussage gleichen (Kaminski, 2017). Da in der vorliegenden Arbeit die gleiche Dosierung und Pulsationsdauer mit ³H Thymidin verwendet wurde, wie bei Mackroth *et al.*, und sich alle drei durchgeführten Assays in ihren Ergebnissen ähneln, können die hier beschriebenen Ergebnisse als belastbar gelten. Eine Über- oder Unterschätzung der suppressiven Eigenschaften von PD-1⁺ T-Zellen lässt sich angesichts der beschriebenen Effekte dennoch nicht gänzlich ausschließen.

Beachtenswert ist außerdem die Proliferationsrate in den Wells mit $2,5 \times 10^4$ stimulierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, die in den drei Experimenten einen Anteil von 8% bis 27% der Referenzproliferationsrate ausmachte. Bei den Tregs lag das eigene proliferative Potential lediglich zwischen 1% und 2%. Ein nicht unerheblicher Anteil der Gesamtproliferation in den Kokulturen mit CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen stammt also von den CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen selbst. Dies zeigt einen dualen Regulationsmechanismus auf, der sich aus einem intrinsisch- und einem extrinsisch-regulierenden Anteil zusammensetzt. Gleichzeitig wird die Potenz des hier beschriebenen extrinsischen Regulationsmechanismus von CD4⁺PD-1⁺

T-Zellen eher noch aufgewertet, da zur Evaluation des extrinsischen Anteils das eigene (intrinsische) Proliferationspotential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen von der Gesamtproliferation in den Wells mit Kokultivierung von CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen abzuziehen ist.

Dass PD-1 ein regulatorisch wirkender Rezeptor und essentiell ist zur Aufrechterhaltung und Einstellung einer Balance aus pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort sowie der peripheren Toleranz, konnte bereits früh anhand von knock-out – Studien gezeigt werden. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben einen autoimmunen Phänotyp bei PD-1 – depletierten Mäusen, die innerhalb von 14 Monaten histopathologische Korrelate einer Glomerulonephritis sowie Arthritiden aufwiesen. Die Autoren beschrieben über unterschiedliche Mausstämme hinweg den klinischen und histopathologischen Befund einer Erkrankung, die dem Systemischen Lupus Erythematoses ähnelte, der bis heute als Prototyp autoimmuner Erkrankungen gilt (Nishimura *et al.*, 1999; Chockalingam *et al.*, 2003). Demgegenüber zeigen CTLA-4 - defiziente Mäuse eine rasch voranschreitende lymphoproliferative Erkrankung, die nach wenigen Wochen tödlich verläuft (Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 1995). Vergleichbare Ergebnisse zeigten Treg-depletierte Mäuse, die ebenfalls nach wenigen Wochen im Rahmen einer rasch voranschreitenden lymphoproliferativen Erkrankung verstarben. Die klinischen und dynamischen Unterschiede zwischen PD-1 - defizienten und CTLA-4- bzw. Treg-defizienten Mäusen weisen darauf hin, dass PD-1 einen zwar essentiellen, aber weniger potenten Einfluss auf die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz hat, als CTLA-4 bzw. Tregs. Eingeschränkt werden muss, dass dies die Perspektive auf den (murinen) Organismus im Ganzen ist. Feiner nuancierte, lokal begrenzte oder kontextabhängige extrinsisch-regulierende Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wären nichtsdestotrotz denkbar. Tatsächlich ähneln die hier vorgelegten Ergebnisse denen von Mackroth *et al.*, 2016, die im Kontext einer humanen Malariainfektion eine extrinsisch-regulatorische Wirkung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf CD4⁺ T-Zellen zeigen konnten, nachdem *in vitro* mit *Plasmodien*-infizierten Erythrozyten (iRBC) stimuliert wurde. Dieselben CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen waren nicht in der Lage, CD4⁺ T-Zellen zu regulieren, die mittels Tetanus Toxin oder CMV stimuliert wurden, was auf einen antigenspezifischen Mechanismus hindeutet.

Demgegenüber untersuchten Che *et al.*, 2010, im HIV-Zellkulturmodell die Auswirkungen der T-Zell - Stimulation durch DZ, wenn die DZ zuvor mit HIV-1 infiziert worden waren. Sie fanden, dass das Proliferationspotential von T-Zellen, die mit infizierten DZ stimuliert wurden, um 50% einbrach. Darüber hinaus führte die Kokultivierung dieser vermindert

proliferierenden T-Zellen mit einem neuen Ansatz aus infizierten oder nicht infizierter DZ und naiven T-Zellen zu einer Suppression der naiven T-Zellen, und zwar unabhängig vom HIV-Status der verwendeten DZ. Die Zellkulturüberstände wiesen keine vermehrten Konzentrationen von IL-10 oder TGF- β als lösliche Regulatoren auf, dafür zeigte sich eine verminderte IL-2 - Konzentration gegenüber den Ansätzen ohne die supprimierende T-Zellpopulation. Darüber hinaus konnte anhand von Transwell-Experimenten eine Kontaktabhängigkeit des extrinsisch-regulierenden Mechanismus gezeigt werden, was in Einklang steht mit den Transwell-Ergebnissen von Mackroth et al. Auffallend war zudem eine erhöhte Expression von PD-1, CTLA-4 und dem Apoptose-induzierenden Oberflächenrezeptor TRAIL, wobei die Antikörperblockade von PD-1, CTLA-4 und TRAIL zu einer Wiederherstellung des Proliferationspotentials der zuvor supprimierten (und supprimierenden) T-Zellen führte (Che *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu führte die Antikörperblockade von TGF- β , IL10-Rezeptor, CTLA-4 und PD-L1 im Setup von Mackroth et al. nicht zu einer Aufhebung der PD1⁺CD4⁺ T Zell-assoziierten Suppression. Das spricht entweder dafür, dass die Expression des apoptoseinduzierenden Rezeptors TRAIL der entscheidende regulatorische Mechanismus von PD1⁺CD4⁺ T Zellen ist oder dafür, dass es sich bei PD1⁺CD4⁺ T Zellen kontextabhängig und/ oder interindividuell um eine inhomogene Zellpopulation handelt, die durch unterschiedliche Mechanismen regulatorisch wirken kann.

Mackroth et al. und Che et al. zeigten zusammengefasst jeweils eine CD4⁺PD-1⁺ T-Zellpopulation, die in ihren funktionellen Eigenschaften sowie im begleitenden Zytokinprofil den hier charakterisierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen frappierend ähnelt, wiewohl einige Aspekte, wie etwa die Kontaktabhängigkeit, in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. In der Zusammenschau ergibt sich das Bild einer Treg-ähnlichen Population innerhalb der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, die kontextabhängig, antigenspezifisch und kontaktabhängig ein extrinsisch-regulatorisches Potential entfalten kann. Der genaue Zellkontakt-abhängige Mechanismus ist dabei unklar.

Der Aspekt der Kontaktabhängigkeit ist eine interessante Parallele zu einem Teil der Effektormechanismen von Tregs. Ein Beispiel für einen solchen kontaktabhängigen Regulationsmechanismus von Tregs ist die Expression von CTLA-4, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit sowohl auf Tregs als auch auf PD-1⁺ T-Zellen vermehrt dargestellt werden konnte (s. Abb. 9 und 11; Wing *et al.*, 2008). Insofern wäre es denkbar, dass der eigentlich supprimierende Mechanismus von CD4⁺PD1⁺ T-Zellen durch die Koexpression von CTLA-4 vermittelt wird. Zudem wird CTLA-4 auf konventionellen, aktivierten T-

Zellen nach etwa 48 Stunden vermehrt exprimiert, sodass die tatsächliche Expression (und Koexpression auf PD-1⁺ T-Zellen) von CTLA-4 im Rahmen des hier durchgeführten Suppressionsassays wahrscheinlich deutlich über der bereits vermehrten Koexpression von CTLA-4 auf ruhenden T-Zellen liegt. Dies wird untermauert durch die deutliche Zunahme der Koexpression von CTLA-4 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in der exemplarisch phänotypisierten Malariaprobe dieser (vgl. Kapitel 4.3.5) und anderer Arbeiten (Che *et al.*, 2010; Larkin *et al.*, 2015; Mackroth *et al.*, 2016; Abel *et al.*, 2018). Interessanterweise führt die CTLA-4 - abhängige Signaltransduktion bzw. die kompetitive Interaktion mit den CD28 - (und CTLA-4) Liganden, CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2.), ebenfalls zu einer verminderten IL-2 - Konzentration im untersuchten Zellkulturüberstand (Walunas, Bakker and Bluestone, 1996; Walker, 2013), was eine Parallele zu dem Zytokinprofil ist, das sich im Überstand der Kokulturen aus CD4⁺ und CD4⁺PD1⁺ T-Zellen zeigte (vgl. Abb. 5). Zudem sind auch konventionelle CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen in der Lage im Sinne einer zellextrinsischen Regulation immunsupprimierend zu wirken (Wang *et al.*, 2012). Es ist also möglich, dass die Expression von CTLA-4 auch bedeutsam für das extrinsisch-regulierende Potential der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ist. Vor diesem Hintergrund wäre ein symbiotischer Regulationsmechanismus von PD-1 und CTLA-4 denkbar. Hafalla *et al.*, 2012, zeigten in diesem Zusammenhang, dass PD-1 und CTLA-4 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Zuge einer murinen Plasmodien-induzierten zerebralen Malaria deutlich heraufreguliert waren. Nach erfolgter Antikörpertherapie mit anti-CTLA-4 (α -CTLA-4) oder anti-PD-1 – Antikörpern (α -PD-1) *in vivo* zeigten anschließend *in vitro* re-stimulierte CD4⁺ T-Zellen eine deutlich erhöhte IFN- γ – Konzentration im Überstand, was mit den Ergebnissen von Mackroth *et al.*, 2016, und dem hier gezeigten PD-1 – assoziierten Suppressionseffekt von IFN- γ in Einklang zu bringen ist. Sowohl die Blockade der PD-1 – PD-L1 - als auch der CTLA-4 – Signalachse führte zudem zum Auftreten einer zerebralen Malaria in BALB/c – Mäusen, die normalerweise keine zerebrale Malaria entwickeln. Durch Anwendung von anti-PD-1 oder anti-CTLA-4 – Antikörpern jeweils unter vorheriger Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zeigte die Arbeitsgruppe, dass die Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen keinen Effekt auf die proinflammatorische Medikation mit α -PD-1 hatte, wohingegen die proinflammatorische Wirkung von α -CTLA-4 abgeschwächt wurde. Dies deutet auf ein größeres Regulationspotential durch CTLA-4 als durch PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen in diesem Kontext hin und würde eine ergänzende Regulation von CTLA-4 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen erklären.

Dazu passend zeigten Hui et al., 2017, dass die PD-1 – vermittelte zellintrinsic Regulation nicht nur durch die Inhibierung der TZR-Signaltransduktion, sondern auch über die Inhibierung der Signaltransduktion des kostimulierenden Rezeptors CD28 funktioniert (Hui et al., 2017). Demgegenüber reguliert CTLA-4 die Expression von CD28 auf T-Zellen herunter und konkurriert mit auf T-Zellen exprimierten CD28-Rezeptoren um dieselben Liganden in einem extrinsisch-regulierenden Sinne (Walker, 2013; vgl. Kapitel 1.3.2). Diesem Gedanken folgend wäre PD-1 dafür verantwortlich, dass die CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in Monokultur ein vermindertes Proliferationspotential aufweisen, wohingegen CTLA-4 die extrinsisch-regulierende Wirkung in der Kokultur vermittelt. Ebenfalls plausibel vor diesem Konzept der symbiotischen und damit auch potenzierten Wirkung von PD-1 und CTLA-4 ist die Tatsache, dass eine Kombinationstherapie mit Nivolumab (PD-1 – Antikörper) und Ipilimumab (CTLA-4 – Antikörper) im Rahmen der Therapie eines fortgeschrittenen Melanoms einerseits zu einer verbesserten Ansprechrate, andererseits aber auch zu häufigeren und schwereren immunvermittelten Nebenwirkungen führte (Wolchok et al., 2013; Sharpe and Pauken, 2017). Gegen eine entscheidende Beteiligung von CTLA-4 am suppressiven Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen spricht, dass die Suppressionsfähigkeit von PD-1⁺ T-Zellen *in vitro* unter antikörpervermittelter Blockade von CTLA-4 im bereits skizzierten Malariakontext erhalten blieb (Mackroth et al., 2016). Interessant wäre eine dezidierte Reevaluation des regulatorischen Profils von CD4⁺PD-1⁺CTLA-4⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺ T-Zellen die jeweils nur PD-1 oder CTLA-4 exprimieren, um die hier gezeigten Effekte besser zuordnen bzw. einen symbiotischen Effekt der Koexpression beider Koinhibitoren aufdecken zu können.

Abschließend angemerkt werden soll die Beobachtung, dass LAG-3 den relativ gesehen größten Zuwachs der Expression auf CD4⁺ T-Zellen der hier gefärbten, exemplarischen Malariaprobe verzeichnete. Diese Beobachtung deckt sich mit einigen Befunden aus dem akut-infektiologischen und onkologischen Setting (Butler et al., 2012; Abel et al., 2018; Dong et al., 2019). Dies ist interessant, da LAG-3, ähnlich wie CTLA-4, extrinsisch-regulierende Mechanismen auf Tregs vermittelt. Eine Rolle von LAG-3 im Rahmen des extrinsischen Regulationspotentials von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wäre also kontextabhängig ebenfalls denkbar, was in nachfolgenden Studien weitergehend beleuchtet werden sollte.

In der Zusammenschau sind CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in der Lage in Treg-ähnlicher Weise CD4⁺ T-Zellen zu regulieren. Dies deutet auf eine größere Tragweite des regulierenden PD-1 – abhängigen Potentials hin, als bislang angenommen. Inwiefern dabei weitere Faktoren, wie die Koexpression von CTLA-4, eine Rolle spielen, welche molekularbiologischen

Prinzipien zugrunde liegen und welche Konsequenzen dies für die therapeutische Manipulation des PD-1-PD-L – Signalwegs hat, muss in nachfolgenden Studien beleuchtet werden.

5.2 Die Kokultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen mit stimulierten CD4⁺ T-Zellen führt zu einer Suppression von IL-2, IFN- γ und IL-10

Zur Evaluation weiterer Mechanismen der extrinsisch-regulierenden Kapazität von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wurden die Überstände aus den Wells der Suppressionsassays hinsichtlich des vorherrschenden Zytokinprofils untersucht. Im Rahmen des durchgeführten *LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)* wurden die Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-10 untersucht, die sowohl im Malaria-Kontext als auch im Rahmen vieler weiterer immunologischer Herausforderungen entscheidend zu einer balancierten Immunantwort aus pro- und anti-inflammatorischen Komponenten beitragen.

Vorab angemerkt werden soll, dass bei der Auswertung der Ergebnisse ein durchgehend fehlender Zytokinnachweis in der Referenzpopulation von Suppressionsassay III bei ansonsten plausiblen Konzentrationen in den Überständen von Suppressionsassay III im Kontext der übrigen Assays auffiel (s. Abb. 5). Ob es sich hierbei um einen technischen, materiellen Fehler oder um ein tatsächliches immunologisches Phänomen handelt, lässt sich nicht abschließend klären. Die Belastbarkeit und Interpretierbarkeit der Ergebnisse von Suppressionsassay III muss daher in Gänze angezweifelt werden. Im Sinne der *Declaration of Helsinki* sowie aufgrund der plausiblen Konzentrationen von Suppressionsassay III fernab der Referenzpopulation im Kontext der übrigen Assays werden die Ergebnisse von Suppressionsassay III trotzdem gezeigt, auch um sie in der Nachbetrachtung im Zuge nachfolgender Studien besser einordnen zu können. Für die Auswertung und Interpretation werden sie im Folgenden jedoch nicht herangezogen.

Anhand der Ergebnisse der übrigen beiden Zytokinassays lassen sich dennoch interessante Befunde festhalten. Es zeigte sich eine PD-1- und Treg-assoziierte Suppression von IL-2, IFN- γ und IL-10 und damit eine Abnahme von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen. Vor der Einordnung dieses Phänomens einer insgesamt abnehmenden Zytokinkonzentration erfolgt eine einordnende, einzelne Betrachtung der untersuchten Zytokine.

5.2.1 Keine eindeutige PD-1 - assoziierte Modulation von TNF- α

Hinsichtlich der Konzentrationen von TNF- α zeigte sich ein großer Konzentrationsunterschied im Vergleich der beiden Suppressionsassays auf einem insgesamt niedrigen Konzentrationsniveau (s. Abb. 5). Lediglich in Suppressionsassay II ließ sich eine nennenswerte TNF- α - Konzentration detektieren, die dann wiederum in den Wells, in denen PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs kokultiviert wurden, abfiel und in diesem Sinne eine Regulation durch PD-1 vermuten lässt. Eine dezidierte Regulation von TNF- α durch PD-1 ist im Rahmen des Erschöpfungsphänomens vorbeschrieben, hier allerdings im Sinne eines intrinsischen Regulationsmechanismus (E John Wherry and Kurachi, 2015). Bekanntermaßen lässt sich die Funktion von TNF- α nicht eindeutig in die Kategorie pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine einordnen, was die Bewertung einer Regulation von TNF- α als Ausdruck eines pro- oder anti-inflammatorischen Mechanismus' ebenfalls erschwert. Erstmals beschrieben wurde TNF- α im onkologischen Kontext als ein Endotoxin-ähnlicher Faktor, der Tumornekrosen bei Mäusen induzierte (Carswell *et al.*, 1975; Ratner and Clark, 1993). Darüber hinaus ist TNF- α ein Haupt-Effektorzytokin im Rahmen der angeborenen Immunantwort durch Makrophagen (Wajant and Siegmund, 2019). Dem gegenüber stehen zahlreiche Untersuchungen, die TNF- α eine eher regulatorische Rolle zuschreiben, beispielsweise durch die Aktivierung von Tregs (Chen *et al.*, 2007) oder die Apoptose-Induktion in CD8⁺ Cytotoxischen T-Zellen (Zheng *et al.*, 1995). Im Rahmen einer HIV-Infektion korreliert der TNF- α – Spiegel im Patientenblut direkt mit der Viruslast, wohingegen eine Therapie mit anti-TNF – Antikörpern zu einer Reduktion der Viruslast führt, was Ausdruck einer TNF- α – induzierten dysfunktionalen T-Zell – Antwort ist (Nokta *et al.*, 1997; De Pablo-Bernal *et al.*, 2014). Im Rahmen der Untersuchung von Probanden mit chronischer Hepatitis B zeigten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen eine geringere intrazelluläre Anfärbbarkeit von IL-2, IFN- γ und TNF- α nach *in vitro* Stimulation, als CD4⁺PD-1⁻ T-Zellen derselben Probanden. Gleichzeitig ließen sich signifikant mehr Zytokine anfärben durch die Unterbrechung der PD-1 – PD-L1 – Signalachse durch Applikation eines PD-L1-Antikörpers (Dong *et al.*, 2019). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Beyer *et al.*, 2016, die durch murine Transkriptomanalysen von CD4⁺ T-Zellen im Rahmen chronisch-viraler Infektionen zeigen konnte, dass die dauerhafte TNF- α – vermittelte Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Liu *et al.*, 2017) zu einer verminderten Expression der anti-viral wirkenden Zytokine IL-2, IL-21 und IFN- γ führt. Darüber hinaus konnte im Rahmen einer Algorithmus-optimierten Gennetzwerk-Analyse rekonstruiert werden, dass TNF- α bzw. die konsekutiven

Downstream-Signale der TNF- α – Rezeptoren eine wesentliche Rolle einnehmen bei der Expression von PD-1 sowie der Induktion von PD-1 – assoziierten Signalwegen. Dazu passend, zeigten stimulierte CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen von Probanden mit hoher Viruslast und hoher PD-1 Expression *in vitro* eine signifikant verminderte PD-1 – Expression, nachdem mit anti-TNF – Antikörpern behandelt wurde (Beyer *et al.*, 2016). Dies legt eine Regulation der PD-1 – Expression durch TNF- α nahe.

Die Ausgangsfrage, ob die TNF- α – Konzentration im Entzündungsmilieu mit der Expression von PD-1 zusammenhängt, lässt sich also in bestimmten Kontexten unter umgekehrten Vorzeichen bejahen: Anhaltend erhöhte TNF- α – Konzentrationen induzieren die Expression von PD-1. Denkbar wäre angesichts dessen, dass im weiteren Verlauf dieser TNF- α – induzierten Signalkaskade eine PD-1 – vermittelte Regulation weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , zu einer verminderten Immunantwort durch T_H1-Zellen und Zellen der angeborenen Immunantwort führt, was sekundär mit einer verringerten TNF- α – Konzentration im Sinne eines indirekten negativen Feedback-Mechanismus einherginge. Eine direkte regulatorische Wirkung von PD-1 auf TNF- α lässt sich in Zusammenschau der hier gezeigten Befunde sowie der Literaturrecherche nicht postulieren. Im Unterschied zum vorliegenden Setting beschreiben die vorangehend skizzierten Arbeiten durch die intrazelluläre Zytokinfärbung bzw. die Genanalyse von PD-1⁺ T-Zellen die Auswirkungen von PD-1 auf die PD-1 - exprimierenden Zellen selbst (im Sinne einer zellintrinsischen Regulation). Inwiefern PD-1 zu einer Regulation der TNF- α – Synthese von anderen Zellen beiträgt, lässt sich anhand dessen nicht nachvollziehen.

Angesichts der hier ermittelten, wenig eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich einer PD-1 assoziierten Modulation von TNF- α innerhalb der beiden untersuchten Proben, lässt sich ein TNF- α – assoziierter Regulationsmechanismus durch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nicht postulieren. Auch in der Zusammenschau der hier ermittelten Befunde sowie im Kontext der Literaturrecherche ließ sich keine entscheidende Beteiligung von PD-1 an der Regulation der TNF- α – Synthese anderer Zellen im Sinne eines extrinsischen Regulationsmechanismus zeigen.

5.2.2 Verminderung der IL-2 – Konzentration durch Kokultivierung mit PD-1⁺ T-Zellen

Weniger uneindeutig imponieren die gemessenen Konzentrationen von IL-2. Die Reduktion der IL-2 – Konzentration in den Überständen der Referenzpopulation um mehr als die Hälfte korreliert mit einer verminderten Proliferation in den Wells, in denen eine supprimierende

Zellpopulation kokultiviert wurde (s. Abb. 5). Bei Tregs ist ein IL-2-abhängiger Suppressionsmechanismus vorbeschrieben. FoxP3, der Haupttranskriptions-Regulator, formt das Genexpressionsprofil von Tregs, das notwendig ist für die Ausübung der suppressiven Funktionen. Teil der FoxP3-induzierten Merkmale von Tregs ist die Expansion von Tregs als Reaktion auf die Bindung von IL-2, welche zudem notwendig zum Überleben von Tregs ist. Gleichzeitig unterdrückt FoxP3 die eigene Synthese und Sezernierung von IL-2, sodass Tregs auf die IL-2 - Sezernierung durch umgebende Zellen im Sinne eines parakrinen Feedbackmechanismus angewiesen sind. Damit einhergehend ist der kompetitive Verbrauch von IL-2 durch Tregs gegenüber etwaigen T-Effektorzellen durch den hochaffinen IL-2 – Rezeptor CD25. Die Expression von CD25 zusammen mit einer schwachen bzw. fehlenden Expression von CD127 diente in der vorliegenden Arbeit als Definition von Tregs. Im Rahmen der Suppressionsassays wurden daher CD25⁺ T-Zellen innerhalb der PD-1⁺ T-Zellen aussortiert. Ein kompetitiver IL-2 – Verbrauch durch PD-1⁺ T-Zellen mittels CD25 wäre daher nur denkbar durch eine nachfolgende Transkription und Expression von CD25 auf den zum Sortierungszeitpunkt noch naiven T-Zellen. Andererseits setzt die Expression von CD25 eine hohe IL-2 – Konzentration im Entzündungsmilieu voraus (Sereti *et al.*, 2000), sodass ein kompetitiver Verbrauch durch Bindung an CD25, wie bei Tregs, eher unwahrscheinlich erscheint. Dazu passend zeigte sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung von CD4⁺PD-1⁺CTLA-4⁺ T-Zellen eines an *P. falciparum* – Malaria infizierten Menschen keine vermehrte Expression von CD25 (Mackroth *et al.*, 2016). Ein möglicher IL-2 – supprimierender Mechanismus wäre die PD-1 – vermittelte Apoptoseinduktion von IL-2 - sezernierenden Zellen (Ishida *et al.*, 1992), wie nachfolgend in der übergeordneten Einordnung der Zytokinassay-Befunde diskutiert werden wird (s. Kapitel 5.2.4).

5.2.3 Ähnliche Konzentrationsreduktion von IFN- γ und IL-10 in Assoziation zur Kokultivierung mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen

Ein wichtiger pro-inflammatorischer Faktor im Zuge einer Entzündungsreaktion ist IFN- γ . Dieses Zytokin kann im Rahmen einer akuten Infektion von aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen, natürlichen Killerzellen und T_H1 Zellen sezerniert werden und trägt in der Folge zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen bei. Da CD4⁺ T-Zellen eine wesentliche Quelle von IFN- γ im Rahmen einer Malariainfektion sind (Pombo *et al.*, 2002; Muxel *et al.*, 2011; King and Lamb, 2015), im Rahmen derer es zu einem deutlichen Anstieg

der Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen kommt (Butler *et al.*, 2012; Abel *et al.*, 2018), wäre eine CD4⁺PD-1⁺ T-Zell – abhängige IFN- γ -Regulation plausibel. Tatsächlich zeigte der Zytokinassay der vorliegenden Arbeit eine verminderte IFN- γ -Konzentration in den Wells, in denen CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs kokultiviert wurden im Vergleich zur Referenzpopulation. Neben einer reduzierten Konzentration von IFN- γ um den Faktor 3, zeigte sich außerdem eine IL-10 – Reduktion um den Faktor 4. Die Bestimmung von IL-10 als regulierendem Zytokin erfolgte auch vor dem Hintergrund von Arbeiten zu Tr1- Zellen, die sich durch Synthese und Sezernierung von IL-10 in großen Mengen auszeichnen. Tr1-Zellen sind CD4⁺Foxp3⁻ und stellen somit einen regulatorischen Zelltyp dar, der nicht unter den thymalen oder induzierten regulatorischen T-Zellen subsummiert wird (Groux *et al.*, 1997). In Menschen und Mäusen zeichnen sich Tr1-Zellen neben der charakteristischen Expression von CD49b und LAG-3 auch durch die Expression von PD-1 aus (Zeng *et al.*, 2015; Gregori, Goudy and Roncarolo, 2012; Gagliani *et al.*, 2013), was zu der Hypothese führt, dass sich die Population der Tr1-Zellen innerhalb der Population CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen verbirgt und ihnen ihr regulatorisches Potential verleiht. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in stimulierter Monokultur eine deutlich verminderte IL-10 - Konzentration im Überstand aufweisen. Ebenso weist auch die Kokultur aus stimulierten CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (oder Tregs) eine deutlich verminderte IL-10 – Konzentration gegenüber der Referenzpopulation auf, sodass aufgrund des fehlenden Charakteristikums von Tr1 – Zellen einer besonders hohen IL-10-Synthese die zuvor skizzierte Hypothese verworfen werden muss.

Demgegenüber zeigten Mackroth *et al.*, 2016, dass CD4⁺PD-1⁺CTLA-4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit *P. falciparum* - infizierten Erythrozyten sogar vermehrt IFN- γ und IL-10 sezernierten. Bemerkenswerterweise zeigten diese Zellen jedoch eine noch größere IFN- γ - und IL-10 – Synthese, nachdem PD-1- und CTLA-4 – blockierende Antikörper appliziert wurden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass PD-1 vor allem CD4⁺IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinsynthese reguliert, sodass eine IFN- γ - und IL-10 - regulierende Funktion durch die Expression von PD-1 (und/ oder CTLA-4) vermutet werden kann. In der vorliegenden Arbeit deutet die verringerte Konzentration von IFN- γ und IL-10 in den Wells mit lediglich CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen gleichfalls darauf hin, dass die Expression von PD-1 zu einer intrinsischen Verringerung der IFN- γ – und IL-10 – Synthese führt. Interessanterweise scheint aber nicht nur die Syntheseleistung der PD-1 – exprimierenden Zellen herabgesetzt zu werden, sondern auch die der kokultivierten CD4⁺ T-Zellen, was einen regulatorischen Effekt durch CD4⁺ PD-1⁺ T-Zellen hinsichtlich anderer CD4⁺ T-

Zellen nahelegt. Da die Zytokine in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht intrazellulär gefärbt, sondern im Überstand gemessen wurden, ist der Ursprung dieser Zytokine und damit die Frage einer möglichen IFN- γ / IL-10 – Koproduktion- oder Kosuppression nicht zu beantworten, was in gleicher Weise für die übrigen bestimmten Zytokine gilt. Weitere Untersuchungen mittels intrazellulärer Färbungen sowie flankierender Transkriptomanalysen könnten hier genauere Einblicke ermöglichen.

5.2.4 Zytokine der Referenzpopulation büßen nach Kokultivierung mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen oder Tregs insgesamt an Konzentration ein

Bei der übergeordneten Betrachtung der Zytokin-Konzentrationsveränderungen fällt auf, dass alle untersuchten Zytokine, die in der Referenzpopulation in nennenswerter Konzentration nachweisbar waren (IFN- γ , IL-2, IL-10), an Konzentration einbüßten, wenn sie mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen kokultiviert wurden. Interessant ist, dass sich diese Zytokine sowohl den eher pro-inflammatorischen (IFN- γ , IL-2), als auch den anti-inflammatorischen Botenstoffen (IL-10) zuordnen lassen.

Ein Erklärungsansatz ist, dass PD-1 tatsächlich jeweils im Einzelnen an der Regulation dieser Zytokine beteiligt ist, wie oben exemplarisch in unterschiedlichen Kontexten dargestellt. Dabei fällt jedoch auf, dass sich die mechanistischen Beispiele, die beschrieben wurden, überwiegend auf einen zellintrinsischen Mechanismus beziehen, d.h. dass die PD-1 – exprimierende Zelle selber ein durch die PD-1 – Expression verändertes Zytokinprofil aufweist. Wie passt dies mit den hier gezeigten Ergebnissen sowie mit den Ergebnissen von Mackroth et al., 2016 und Che et al., 2010, zusammen, die jeweils CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen beschreiben, die eine extrinsisch-regulierende Wirkung entfalten können?

Eine kürzlich erschienene Studie (Diskin *et al.*, 2020) demonstrierte im *in vivo* Mausmodell im Tumorkontext eine mögliche Rolle der PD-1 – PD-L1 – Signalachse im Rahmen sich gegenseitig regulierender CD4⁺ T-Zellen, die keine Tregs sind. Gezeigt werden konnte, dass die Kokultivierung von polyklonalen *Pd1l*^{+/+} CD4⁺ T-Zellen mit aktivierten CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen jeweils zu einer signifikant verminderten Proliferation mit konsekutivem Tumorprogress, als Ausdruck einer vermehrten Immunsuppression, führten, was den hier gezeigten extrinsisch-regulierenden Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen entspricht. Dass insbesondere Tumorzellen in der Lage sind PD-L1 zu exprimieren, um den Effektormechanismen PD-1⁺ T-Zellen zu entgehen, ist gut untersucht und dient inzwischen als therapeutischer Ansatzpunkt im Rahmen onkologischer Therapieregime mittels PD-L1 –

Antikörpern (Gato-Cañas *et al.*, 2017). Ebenfalls beschrieben ist, dass PD-L1 konstitutiv auf T-Zellen exprimiert wird (Keir *et al.*, 2008), sodass eine Regulation von stimulierten CD4⁺(PD-L1⁺) T-Zellen durch andere, PD-1 exprimierende CD4⁺ T-Zellen anhand der „klassischen“ PD-1 – PD-L1 - Signalachse denkbar wäre. Die in dieser Arbeit gezeigte Regulation von CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wäre im Sinne dieser Hypothese durch die Expression von PD-L1 auf CD4⁺ T-Zellen zu begründen. Ebenfalls denkbar wäre, dass die hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ebenfalls in signifikantem Maße PD-L1 exprimieren und die Referenzpopulation der CD4⁺ T-Zellen im Zuge der Stimulation vermehrt PD-1 exprimiert hat. Letzteres ist sogar wahrscheinlich, da PD-1 ein Aktivierungsmarker ist, der innerhalb von 24 Stunden nach Aktivierung vermehrt exprimiert wird (Chemnitz *et al.*, 2004). Bemerkenswerterweise zeigten Diskin *et al.*, 2020, nicht nur ein vermindertes Proliferationspotential von PD-L1⁺CD4⁺ T-Zellen in der Zellkultur, sondern ebenfalls eine regulierende Wirkung von PD-L1⁺CD4⁺ T-Zellen auf aktivierte T-Zellen im Mausmodell für ein Adenokarzinom des Pankreas sowie bei entsprechenden humanen Pathologieproben. Die hier durch Diskin *et al.* untersuchte (PD-L1⁺CD4⁺ T-Zell -) Population hat also vergleichbare Eigenschaften, wie die hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen.

Auch Hafalla *et al.*, 2012, zeigten im Kontext einer murinen Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA, dass nach fünf Tagen eine deutliche Zunahme der Expression von PD-L1 auf CD4⁺ T-Zellen messbar war, sodass ein vergleichbarer Effekt auch als Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Effekte in Frage kommt. Die beobachtete Regulation würde diesem Gedanken folgend nicht durch PD-1 der hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen erfolgen, sondern durch die Koexpression von PD-L1 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und die Induktion der „klassischen“ PD-1 – PD-L – Signalachse durch Interaktion von CD4⁺PD-1⁺PD-L1⁺ T-Zellen mit den stimulierten CD4⁺ T-Zellen, die aktivierungsabhängig PD-1 exprimieren. Angemerkt werden muss, dass Hafalla *et al.* nicht die Koexpression von PD-L1 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen beschrieben haben, sondern auf der Gesamtheit aller CD4⁺ T-Zellen. Eine tatsächliche Koexpression von PD-1 und PD-L1 mit den zuvor skizzierten hypothetischen Folgen muss also in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Tatsächlich ließen sich die PD-1 – PD-L – vermittelten molekularbiologischen Effekte jedoch mit den experimentell gewonnenen Ergebnissen in Einklang bringen. Die PD-1 – vermittelte Inhibierung des PI3K/AKT – Signalwegs sowie der ERK und PLC γ –

Signalwege führen zu einer verminderten Produktion von IL-2 und IFN- γ , einem verminderten Proliferationspotential sowie zu einem erhöhten Risiko für Apoptose (Jubel *et al.*, 2020). Dergestalt erklärten sich auch die Gemeinsamkeiten in der Betrachtung der PD-1 – assoziierten Effekte der zellintrinsischen und zellextrinsischen Regulationsfähigkeit. Jedoch wirft der Gedanke der gegenseitigen, Treg-unabhängigen Regulation von CD4⁺ T-Zellen anhand der klassischen PD-1 – PD-L – Signalachse die Frage auf, warum die stimulierten CD4⁺ T-Zellen in Monokultur dann nicht auch in der Lage waren sich gegenseitig zu regulieren. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre die Dynamik, mit der PD-1 und PD-L1 exprimiert werden. Während PD-1 innerhalb von 24 Stunden nach Aktivierung zunehmend exprimiert wird (Chemnitz *et al.*, 2004), ist über die Dynamik der PD-L1 - Expression auf CD4⁺ T-Zellen weniger bekannt. Hafalla *et al.*, 2012, stellten im murinen Malariakontext eine vermehrte PD-L1 – Expression auf CD4⁺ T-Zellen nach 5 Tagen fest, wohingegen die Zellen im hier durchgeführten Suppressionsassay für 90 Stunden stimuliert wurden, sodass es möglicherweise noch zu keiner Expression von PD-L1 gekommen ist. Denkbar wäre daher, dass sich die (Ko-) Expression von PD-L1 also auf die Population der bereits CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen beschränkt und daher erst die Kokultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen zu einer Suppression führte. Erwähnt werden muss dem gegenüber, dass Che *et al.*, 2010, in keinem der angesetzten T-Zell – Stimulationsassays eine Expression von PD-L1 auf T-Zellen fanden und dennoch eine CD4⁺ T-Zellpopulation beschreiben konnten, die in der Lage war, die Proliferation stimulierter, naiver CD4⁺ T-Zellen zu regulieren. Außerdem führte die Applikation von anti-PD-L1 – Antikörpern im Setup von Mackroth *et al.* ebenfalls zu keiner Aufhebung der extrinsisch-regulierenden Effekte durch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen. Es scheint noch andere, vielleicht ergänzende Mechanismen zu geben, mittels derer CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen extrinsisch-regulatorisch wirken können. Möglicherweise spielt der beschriebene PD-L1 – abhängige Mechanismus auch nur in bestimmten immunologischen Kontexten eine Rolle. Dass der entscheidende Beitrag der hier sortierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen vielleicht gar nicht in der Expression von PD-1, sondern vielmehr in der Ko-Expression von PD-L1 liegt, ist dennoch eine beachtenswerte Alternativhypothese. Inwiefern die Expression von PD-L1 auf CD4⁺ T-Zellen mittels der hier erfolgten Stimulationsmethode induzierbar ist und auf diese Weise eine Interaktion mit CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ermöglicht, sollte in nachfolgenden Studien geklärt werden.

Die Tatsache, dass sich die Konzentrationen von IFN- γ , IL-2, IL-10 jeweils verringerten, lässt auch die Vermutung zu, dass ein übergeordneter PD-1 – vermittelter Mechanismus zugrunde liegt. Ein solcher übergeordneter Mechanismus wäre beispielsweise die Apoptose-

Induktion in CD4⁺ T-Zellen durch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen. Die PD-1 – assoziierte Verminderung der Zytokinkonzentrationen wäre dann Ausdruck einer insgesamt verminderten Zahl an Zytokin-produzierenden Zellen. Dafür spricht zudem, dass IFN- γ , IL-2 und IL-10 in ähnlichem Maße an Konzentration einbüßten, nämlich jeweils um einen Faktor von 3 – 4. Tatsächlich stand die Entdeckung von PD-1 im Kontext des programmierten Zelltods, welcher eintrat, nachdem murine T-Zell – Hybridome stimuliert wurden. Der programmierte Zelltod gilt bis heute als Teilmechanismus der PD-1 - assoziierten regulatorischen Wirkung (Ishida *et al.*, 1992; Jubel *et al.*, 2020). Neben dieser PD-1 – vermittelten Apoptose im Sinne eines intrinsischen Regulationsmechanismus gibt es auch Hinweise auf Mechanismen der Apoptoseinduktion durch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Sinne einer extrinsisch-regulierenden, zytotoxischen Effektorfunktion, beispielsweise über die vermehrte Sezernierung der zytotoxischen Serinprotease Granzym B oder die Expression der Ektonukleotidase CD39 (Grossman *et al.*, 2004; Takeuchi and Saito, 2017; Abel *et al.*, 2018). Ebenfalls in Betracht gezogen werden muss ein möglicher artifizieller apoptotischer Effekt durch die *in vitro* Kultivierung, der dann jedoch auch bei den Kontrollen zu erwarten wäre.

Neben der Abnahme der Zytokinkonzentrationen fällt zudem auf, dass der Konzentrationsabfall in den Wells mit Kokultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen weniger stark ausgeprägt war, als in den Wells mit Kokultivierung von Tregs. Dazu passend zeigten zwei der drei Suppressionsassays eine geringere regulatorische Potenz der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf das Proliferationspotential der stimulierten CD4⁺ T-Zellen. Nur ein Suppressionsassay zeigte eine mit den Tregs vergleichbare regulatorische Potenz von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, die in der Tendenz sogar noch etwas stärker ausfiel als bei den Tregs (Suppressionsassay III). Eine Ursache für das in diesem Sinne geringere und inhomogene Regulationspotential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Vergleich zu Tregs könnte sein, dass Tregs eine vergleichsweise homogene Zellpopulation sind. Dem gegenüber ist innerhalb der Population der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen von einer weitaus größeren Heterogenität hinsichtlich der enthaltenen Zellpopulationen sowie des funktionellen Profils auszugehen, da PD-1 kein Zellpopulationsmarker ist, sondern ein Aktivierungsmarker verschiedener Zellpopulationen. Der Kontext, in dem PD-1⁺ T-Zellen untersucht werden – und zwar sowohl hinsichtlich der untersuchten Krankheit als auch hinsichtlich der PD-1 - exprimierenden Population – ist also entscheidend hinsichtlich funktioneller und mechanistischer Prinzipien von PD-1⁺ Zellen. So lassen sich PD-1 exprimierende, erschöpfte T-Zellen häufig, aber nicht immer, durch die Blockade des PD-1-Signalwegs „retten“ (Barber *et al.*, 2006b; E. John Wherry and Kurachi,

2015). Ebenfalls schlagen onkologische Immuntherapien, die auf die PD-1 – Signalachse abzielen nicht immer an oder wirken erst suffizient in Kombination mit weiteren Immuntherapieansätzen, wie etwa der Blockade weiterer Koinhibitoren. Dazu kommt es zu seltenen, aber schwerwiegenden Nebenwirkungen durch Immuntherapien, die möglicherweise Ausdruck der Wichtigkeit von PD-1 nicht nur für die Kontrolle einer Immunreaktion im Rahmen eines akuten oder chronischen Geschehens ist, sondern auch für die Aufrechterhaltung einer permanenten peripheren Toleranz durch die Regulation autoreaktiver Immunzellen. Die vielfältigen Aufgaben von PD-1 im Kontext unterschiedlicher Zellpopulationen und immunologischer Settings mit bestimmten funktionellen und mechanistischen Eigenschaften verknüpfen zu können, ist daher eine wichtige Aufgabe künftiger Studien.

5.3 CTLA-4 wird auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen vermehrt koexprimiert

Angesichts dieses unscharfen Verständnisses von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, insbesondere hinsichtlich der Frage nach den mechanistischen Prinzipien ihrer extrinsisch-regulatorischen Fähigkeiten, sind in dieser Arbeit weitere Oberflächenrezeptoren auf ruhenden CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen untersucht worden, die zu den beschriebenen Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen beitragen oder einen Hinweis auf ihren Ursprung liefern könnten.

Die untersuchten Zellpopulationen zeigten eine insgesamt spärliche Expression von Koinhibitoren. Dabei wurde nicht nur PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen kaum exprimiert, auch wurde außer CTLA-4 kein weiterer Koinhibitor vermehrt auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimiert. Dies erscheint wenig überraschend, da die vermehrte Expression von koinhibitorischen Rezeptoren lediglich in Assoziation zu akuten oder chronischen Erkrankungen zu erwarten wäre. Diese Induzierbarkeit bestätigte sich in der exemplarisch gefärbten Malariaprobe (vgl. Kapitel 4.3.5), in der CTLA-4 auf ca. 80% aller CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen exprimiert wurde und in der auch die übrigen Koinhibitoren deutlich vermehrt exprimiert wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe der Gesunden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten zum Koinhibitorprofil von CD4⁺ T-Zellen in einem Malariasetting (Butler *et al.*, 2012; Mackroth *et al.*, 2016; Abel *et al.*, 2018).

Interessant ist vor diesem Hintergrund die vergleichsweise hohe Expression von CTLA-4 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (Mittelwert (d) = 17 %) der gesunden Probanden. Von diesen CTLA-4 exprimierenden CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen ließen sich nur etwa 8% den Regulatorischen T-Zellen zuordnen (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Population der CD4⁺CTLA-4⁺ T-

Zellen waren dies deutlich mehr ($d = 44\%$). Diese Koexpression könnte zu den regulatorischen Fähigkeiten der hier untersuchten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen beitragen, wie zuvor bereits diskutiert wurde.

Die Koexpression von CTLA-4 auf $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen ist im Rahmen zahlreicher immunologischer Herausforderungen vorbeschrieben. Im Rahmen einer humanen *P. falciparum* – Infektion kommt es beispielsweise im Zuge von schwerer Verläufen zu einer deutlichen Zunahme von $CD4^+PD-1^+CTLA-4^+$ T-Zellen (Mackroth *et al.*, 2016; Abel *et al.*, 2018). Vergleichbare Ergebnisse liegen darüber hinaus für eine Ebolavirusinfektion vor (Ruibal *et al.*, 2016). Ebenso exprimierten während einer akuten humanen Puumala Hantavirus - Infektion mehr als 90% der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen auch CTLA-4 und zeigten eine vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern, was die Koexpression von PD-1 und CTLA-4 am ehesten im Licht der Balancierung einer akuten Immunreaktion erklärt. Interessanterweise koexprimierten nach 20 Tagen weniger als ein Drittel der $CD4^+$ T-Zellen PD-1 und CTLA-4 und nach 60 Tagen (und klinischer Rekonvaleszenz) lag die Rate der $CD4^+PD-1^+CTLA-4^+$ T-Zellen so niedrig wie in der nicht-infizierten Kontrollkohorte. Ähnliche Ergebnisse ließen sich für die einfache Expression von PD-1 oder CTLA-4 auf $CD4^+$ T-Zellen zeigen. Dies deutet auf einen relativ schnellen Rückgang der Expression von PD-1 und der Koexpression von PD-1 und CTLA-4 innerhalb von Wochen selbst nach einer schweren akuten Infektion hin (Lindgren *et al.*, 2011). Angesichts dessen scheint ein akut-immunologischer Kontext als Erklärung für die vergleichsweise hohe Koexpression von CTLA-4 auf $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen eher unwahrscheinlich, erklärt aber die insgesamt äußerst geringe Frequenz von $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen im Blut gesunder Menschen.

Zusammengefasst lässt sich die Expression von PD-1 und CTLA-4 sowie die Koexpression beider Rezeptoren als Ausdruck eines potenzierten Regulationsmechanismus im Rahmen akuten und chronischer Erkrankungen einordnen. Darüber hinaus ist die Rolle von CTLA-4 und PD-1 zur permanenten, krankheitsunabhängigen Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz essentiell, beispielsweise im Zuge der Regulation selbstreaktiver Zellen zur Verhinderung von Autoimmunität, wie anhand der zuvor diskutierten knock-out – Studien bereits veranschaulicht werden konnte (vgl. Kapitel 5.1). Angesichts dieser weitläufigen Verbreitung von PD-1 in pathologischen und physiologischen Kontexten, fällt die Einordnung der hier charakterisierten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen schwer.

Eine plausible Erklärung für die Anwesenheit von $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen im Blut gesunder Menschen wäre die Regulation von autoreaktiven Zellen im Rahmen der peripheren Toleranz, die permanent und unabhängig von einem spezifischen Krankheitskontext

aufrecht erhalten werden muss (Fife and Pauken, 2011). Eine weitere mögliche Ursache für die Entstehung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wären persistierende Antigene, wie etwa das Varizella Zoster Virus (VZV) oder das humane Cytomegalovirus (CMV). Tatsächlich zeigte die Untersuchung von CMV-spezifischen CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen vergleichbare Eigenschaften zu den hier nachgewiesenen Charakteristika von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen (Sester *et al.*, 2008), was die hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen am ehesten im Rahmen des Erschöpfungsphänomens erklären würde. Demgegenüber stehen Untersuchungen zur Rolle von CD8⁺PD-1⁺ T-Zellen bei gesunden Menschen, die darauf hindeuten, dass diese der Population den T_{MEM}-Zellen zugerechnet werden können und keine Merkmale von erschöpften T-Zellen aufweisen (Duraiswamy *et al.*, 2011). Einschränkend muss gesagt werden, dass diese CD8⁺PD-1⁺ T-Zellen keine funktionellen Merkmale von T_{EX} Zellen aufwiesen, was neben der CD8-Positivität eine weitere Diskrepanz zu den hier untersuchten Zellen darstellt.

Shimatani *et al.*, 2009, konnten im Mausmodell CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen mit Eigenschaften erschöpfter T-Zellen identifizieren, die sich den T_{MEM}-Zellen zurechnen ließen und sich mit voranschreitendem Alter anreicherten. Dabei wiesen diese Zellen interessanterweise Merkmale von seneszenten Zellen auf (Shimatani *et al.*, 2009). Immunoseneszenz beschreibt ein mit zunehmendem Alter voranschreitendes Phänomen, das mit einer Anreicherung von funktionell beeinträchtigten T_{MEM}-Zellen und terminal differenzierten T-Zellen zu Ungunsten des Repertoires von naiven T-Zellen einhergeht. Diese angereicherten T_{MEM}-Zellen zeigen häufig ein vermindertes Proliferationspotential. Im Gegensatz zur physiologischen Anreicherung von funktionsfähigen T_{MEM}-Zellen im Alter, als Ergebnis einer altersbedingt zunehmenden Zahl an Antigenexpositionen, beschreibt die Immunoseneszenz eine verminderte Reaktionsfähigkeit auf neue Pathogene (als Ausdruck der verminderten Population naiver T-Zellen) sowie eine anhaltende Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , als Ausdruck einer chronischen Stimulation („*Inflammaging*“) (Aiello *et al.*, 2019; Zhao, Shao and Peng, 2020). Diese chronische Stimulation ist ein Resultat aus einer Mischung aus hormonellen, metabolischen und immunologischen Faktoren (Hearps *et al.*, 2012), die neben dem Phänomen des *Inflammaging* zu einer vermehrten Expression von wie PD-1 und CTLA-4 führen kann. Die Expression von PD-1 sowie das verminderte Proliferationspotential stellen eine Parallele zu den hier untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen dar, wohingegen die verminderte Syntheseleistung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine der hier untersuchten Zellen im Gegensatz zu den Charakteristika von seneszenten T-Zellen steht. Zudem liegt das

Durchschnittsalter der in dieser Arbeit untersuchten gesunden Probanden bei 41 Jahren, sodass ein funktioneller Beitrag seneszenter CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nur in geringem Maß zu erwarten wäre. Die Population seneszenter CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen mag also in geringem Maß in der untersuchten Gesamtpopulation enthalten sein, jedoch würden funktionelle Aspekte wahrscheinlich durch die große Mehrzahl nicht-seneszenter T-Zellen überlagert werden. In der Zusammenschau finden sich hinsichtlich der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von PD-1 exprimierenden Zellen in der skizzierten Literatur einige Gemeinsamkeiten, aber auch Diskrepanzen zu den CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen der vorliegenden Arbeit. In Anbetracht des untersuchten Kollektivs der vorliegenden Arbeit, erscheint die Suche des Ursprungs der hier charakterisierten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in einem chronisch-inflammatorischen Setting besonders plausibel. Aufgrund der weiten Verbreitung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Rahmen unterschiedlicher immunologischer Herausforderungen ist zudem davon auszugehen, dass es sich bei der hier charakterisierten T-Zellpopulation wahrscheinlich um eine äußerst heterogene Zellpopulation handelt.

5.4 Etwa ein Drittel der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen können den Follikulären T-Helferzellen zugeordnet werden

Die „Helfer“-Funktion von CD4⁺ T-Zellen besteht unter anderem in der Aktivierung und Modulation der B-zellulären Immunantwort (vgl. Kapitel 1.2.2). Dies geschieht in den Lymphfollikeln sekundärer lymphatischer Organe durch CD4⁺ T_{FH}-Zellen, die sich neben der Expression von CXCR-5 auch durch eine erhöhte Expression von PD-1 auszeichnen. In der vorliegenden Arbeit lassen sich etwa ein Drittel der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen den T_{FH}-Zellen zuordnen, was einer deutlichen Anreicherung gegenüber der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen entspricht, innerhalb derer durchschnittlich 13% den T_{FH}-Zell - spezifischen Chemokinrezeptor exprimierten. Nur ein sehr kleiner Teil der CD4⁺CXCR-5⁺ T-Zellen exprimierte ebenfalls PD-1 (1,5%; Daten nicht gezeigt). Die zusätzliche Expression von PD-1 auf CD4⁺CXCR-5⁺ T-Zellen entspricht einem unterschiedlichen Differenzierungsstadium und kann in Abhängigkeit zu dem begleitenden Transkriptionsfaktor- und Oberflächenrezeptorprofil Ausdruck sowohl eines T-Effektor- als auch des Gedächtnis T-Zell – Stadiums sein (Hale and Ahmed, 2015), wie gleich erläutert werden wird. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass T_{FH}-Zellen innerhalb der Gesamtgruppe der CD4⁺ T-Zellen selten zu identifizieren sind, wohingegen sie innerhalb der Subpopulation der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen einen signifikanten Anteil ausmacht.

Aufgrund des großen Anteils dieser Subpopulation innerhalb $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen wäre eine weitergehende Untersuchung dieser $CD4^+CXCR-5^+PD-1^+$ T-Zellen interessant, auch vor dem Hintergrund der Frage, ob auch diese Subpopulation ein extrinsisch-regulierendes Potential entfalten kann. Locci et al., 2013, konnten mit ihrer Arbeit zeigen, dass PD-1 auf ca. 30% aller $CD4^+CXCR3^-CD45RO^+CXCR-5^+$ T-Zellen von gesunden Menschen exprimiert wurde. Die untersuchten $CD4^+PD-1^+CXCR-5^+$ T-Zellen exprimierten keine Aktivierungsmarker und sie zeigten im Rahmen einer *in vitro* Beobachtungsstudie über 20 Tage ohne Stimulation eine konstante Expression von PD-1 und CXCR-5, was gegen eine transiente PD-1 – Expression spricht. Die Population der $CD4^+PD-1^+CXCR-5^+$ T-Zellen konnte anhand des Nachweises von CCR7 auf der Zelloberfläche sowie anhand funktioneller Antigen-Reexpositionenversuche mit besonders schneller Ausbildung von T_{FH} -Zell – typischen Effektormechanismen im Vergleich zu den Kontrollpopulationen der $CXCR5^-CD4^+$ T Zellen und $PD-1^-CXCR5^+CD4^+$ T Zellen den zentralen Gedächtnis T_{FH} -Zellen gerechnet werden. In der Zusammenschau kommen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich bei $CD4^+CD45RO^+PD-1^+CXCR3^-CXCR5^+$ T Zellen um funktionell unbeeinträchtigte Gedächtnis T_{FH} -Zellen handelt, die in ihrem Genexpressionsprofil, ihrem Zytokinprofil sowie in ihren funktionellen Eigenschaften starke Ähnlichkeit zu regionären Keimzentrum - T_{FH} -Zellen aufweisen (Locci *et al.*, 2013). Aufgrund der Färbung von CXCR3 und CD45RO sind diese Befunde nur bedingt übertragbar auf die hier gezeigten Ergebnisse. CXCR3 ist ein durch $IFN-\gamma$ – induzierbarer Chemokinrezeptor und Aktivierungsmarker, der nach Aktivierung auf einer Vielzahl von Zellen, darunter auch $CD4^+$ T-Effektorzellen, exprimiert wird und ein wichtiger Marker für eine T_H1 -Zell - dominierte Immunantwort ist (Kuo *et al.*, 2018). Da die Blutgewinnung von den Probanden der vorliegenden Arbeit und die anschließende Untersuchung im gesunden, unstimulierten Zustand erfolgte, ist es unwahrscheinlich, dass die hier untersuchten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen CXCR3 exprimieren, auch wenn dies nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Bis zu diesem Punkt können die Ergebnisse von Locci et al. also zu einem gewissen Grad als übertragbar gelten. Aufgrund der Eingrenzung der untersuchten Zellpopulation von Locci et al. auf T_{MEM} -Zellen ($CD45RO^+$) lassen sich die gezeigten Befunde dennoch nicht 1:1 auf die hier untersuchten $PD-1^+$ T-Zellen übertragen. Die Frequenz von T_{MEM} -Zellen hängt stark von Alter, Lebensbedingungen und Vorerkrankungen ab und reicht bei älteren Menschen, die im Mittel die höchste Rate an T_{MEM} -Zellen im Blut haben, nicht über 35% aller T-Zellen hinaus (Farber, Yudanin and Restifo, 2014). Das Durchschnittsalter der hier untersuchten Probanden lag bei 41 Jahren. Dies impliziert, dass sich die hier gezeigten

Ergebnisse überwiegend auf naive T-Zellen beziehen. Nichts desto trotz lässt sich spekulieren, dass $CD4^+PD-1^+CXCR5^+$ T-Zellen nicht naiv sind, da sie den aktivierungsabhängigen Koinhibitor PD-1 exprimieren und dass sie darüber hinaus eher keine akut induzierten Effektorzellen sind, da sie im Blut klinisch gesunder Menschen isoliert wurden. Diesem Gedanken folgend, wären $CD4^+PD-1^+CXCR5^+$ T-Zellen der Gruppe der T_{MEM} -Zellen oder der T_{EX} -Zellen zuzuordnen. Im Gegensatz zu der von Locci et al. untersuchten Population, sind die hier charakterisierten T-Zellen jedoch nicht funktionell unbeeinträchtigt, sondern weisen verminderte Effektorfunktionen auf. Interessanterweise fanden Jean Bosco *et al.*, 2018, dass $CD4^+PD-1^+CXCR5^+$ T_{FH} -Zellen im Kontext einer humanen Tuberkuloseinfektion einen erschöpften Funktionsstatus aufweisen, wobei sich das funktionelle Profil durch Blockade von PD-1 verbessern ließ. Bosco et al., verwendeten zur Selektion der $CD4^+PD-1^+CXCR5^+$ T-Zellen dieselbe Gating-Strategie, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, also ohne vorherige Subdifferenzierung von $CD4^+$ T-Zellen. Im Malaria-Mausmodell zeigte sich der erschöpfte Phänotyp von $CD4^+PD-1^+LAG-3^+$ T-Zellen durch eine antagonisierende Behandlung mittels anti-PD-1- und anti-LAG-3 – Antikörpern rückläufig, wobei gleichzeitig die Population der T_{FH} -Zellen signifikant anstieg (Butler *et al.*, 2012). Die Arbeiten von Bosco et al. und Butler et al. sprechen dafür, dass das Erschöpfungsphänomen auch die Population der T_{FH} -Zellen betreffen kann.

In der Zusammenschau der experimentell gewonnenen Ergebnisse lassen sich ein Drittel der hier charakterisierten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen einer T_{FH} -Zell – Population zuordnen, die Teil einer Gesamtpopulation ist, welche einen erschöpften funktionellen Status aufweist. Es wäre möglich, dass es sich bei der Gruppe der hier identifizierten T_{FH} -Zellen um eine vollfunktionsfähige Subgruppe von Gedächtnis T_{FH} -Zellen innerhalb der Population der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen handelt. Denkbar wäre aber auch, dass die hier identifizierten T_{FH} -Zellen einen ebenfalls erschöpften Phänotyp aufweisen. Eine Differenzierung bezüglich des Funktionsstatus der Subpopulationen innerhalb der hier untersuchten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen ist auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich und daher nachfolgenden Studien vorbehalten.

Die zuvor geschilderten Ergebnisse werfen die Frage auf, wie es zu diesem hohen Anteil von T_{FH} -Zellen innerhalb der charakterisierten Population kommt. Anhand einer Arbeit von Fahey et al., 2011, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der hohe Anteil von T_{FH} -Zellen innerhalb der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen ein Versuch des Immunsystems ist, dem Erschöpfungsphänomen zu entkommen. Diese und andere Autoren stellten im Mausmodell

für chronische Viruserkrankungen fest, dass unter den CD4⁺ T-Zellen insbesondere T_{H1}-Zellen einen erschöpften Phänotyp mit supprimierten Effektormechanismen aufwiesen. Nach 30 Tagen ließ sich jedoch ein Differenzierungsschift innerhalb der CD4⁺ T-Zellen auf Oberflächenrezeptor- und Transkriptionsfaktor-Ebene zu Gunsten von T_{FH}-Zellen und zu Ungunsten von T_{H1}-Zellen verzeichnen. Diese angereicherte Population von T_{FH}-Zellen erwies sich *ex vivo* als vollfunktionsfähig hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen. Dieser Populationschift zu Gunsten der T_{FH}-zellulären Immunantwort im Rahmen chronisch-viraler Erkrankungen lässt sich als immunologischer Strategiewechsel mit dem Ziel einer humoralen Kontrolle der Pathogene angesichts einer insuffizienten Kontrolle durch T_{H1} Zellen interpretieren (Fahey *et al.*, 2011; Crawford *et al.*, 2014).

Der Vorteil dieses Differenzierungsschifts aus Sicht des Wirts lässt sich im Malaria-Mausmodell nachvollziehen, wo dieser im Rahmen schwerer Infektionen nicht gelingt. Hier konnte gezeigt werden, dass schwere Malariainfektionen mit einer verminderten Zahl an reifen T_{FH}-Zellen einhergehen, die sich durch eine geringgradige Expression von CXCR-5 und PD-1 als Ausdruck unreifer T_{FH}-Zellen zeigte. Histologisch ging dies einher mit einer reduzierten Keimzentrum-Formation, was funktionell mit einer fehlenden Plasmazellreife mit konsekutiv fehlender humoraler Immunantwort und fehlender Parasitenkontrolle korrelierte. Auf Zytokinebene führten erhöhte Konzentrationen des T_{H1}-Schlüsselzytokins, IFN- γ , sowie von TNF- α zu demselben histologischen und funktionellen Ergebnis. Die Neutralisierung von IFN- γ und TNF- α hob diese negativen Effekte wieder auf. Auf transkriptioneller Ebene korrelierten diese pathophysiologischen Befunde mit einer relativen Überexpression des T_{H1}-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet gegenüber der Bcl6-spezifischen Genexpression. Bemerkenswert ist dabei, dass die Expression von T-Zellpopulation – übergreifenden Transkriptionsfaktoren im Rahmen der zellulären Plastizität nicht ungewöhnlich ist und der Anpassung der Immunreaktion auf eine dynamische immunologische Herausforderung dient (Dupage and Bluestone, 2016). Jedoch scheint die Überbetonung T_{H1}-spezifischer Gene zu einer funktionellen Beeinträchtigung von T_{FH}-Zellen zu führen, die die humorale Immunantwort beeinträchtigen könnte (Ryg-Cornejo *et al.*, 2016b). Interessanterweise lässt sich dieses Phänomen einer verminderten T_{FH}-Zellpopulation im Rahmen einer akuten, schweren Malariainfektion in der hier exemplarisch durchgeführten Malariafärbung nachvollziehen. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle erscheint die Population der CD4⁺PD-1⁺CXCR-5⁺ T_{FH}-Zellen des Malariapatienten vermindert. Auch wenn über den vorangegangenen und nachfolgenden Verlauf des Patienten nichts bekannt ist, stünde eine Verminderung der T_{FH}-Zellpopulation

in Einklang mit der zuvor geschilderten Arbeit von Ryg-Corneja sowie von Butler et al., 2012. Hierauf aufbauende Studien könnten untersuchen, inwiefern ein mögliches extrinsisches Regulationspotential von $CD4^+PD-1^+CXCR-5^+$ T_{FH} -Zellen zur Suppression anderer T_{FH} -Zellen beiträgt.

Abschließend angemerkt werden soll, dass PD-1 im Rahmen des Erschöpfungsphänomens auf einer Mehrzahl der antigenspezifischen $CD4^+$ T-Zellen exprimiert wird (Brooks *et al.*, 2006; Wherry, 2011). Sollten sich in den hier untersuchten $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen also vermehrt T-Zellen vom erschöpften Typ befinden, würde die hier genutzte Definition von T_{FH} -Zellen ($CXCR-5^+PD-1^+$) in nachfolgenden Arbeiten zur weiteren Charakterisierung von $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen eine zusätzliche Unschärfe bei der Identifikation von Effektor- vs. Gedächtnis T_{FH} -Zellen bedeuten, da PD-1 sowohl ein Differenzierungsmarker von T_{FH} -Zellen ist, als auch ein allgemeiner Erschöpfungsmarker. Für eine weitergehende Analyse wäre die Bestimmung weiterer T_{FH} -Zell-spezifischer Marker, wie ICOS und Bcl6, sowie die Bestimmung von Aktivierungs- und Gedächtnis – assoziierten Markern sinnvoll.

5.5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein extrinsisch-regulatorisches Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf stimulierte CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden. Der Befund einer insgesamt verminderten Zytokinkonzentration von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen im Rahmen der gemeinsamen Kultivierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen, ergab keinen Hinweis auf einen zellkontaktunabhängigen, zytokinvermittelten Mechanismus. Vielmehr wies eine vergleichsweise hohe Expression von CTLA-4 durch ruhende CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auf eine Parallele zu einem extrinsisch-regulierenden Mechanismus hin, wie er auch bei Tregs eine Rolle spielt.

Die deutlich vermehrte (Ko-) Expression von Koinhibitoren im Rahmen der exemplarisch gefärbten humanen Malariablutprobe steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, die im Malaria-Kontext eine extrinsisch-regulatorische Wirkung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nachweisen konnten. Dies verdeutlicht einen möglichen Stellenwert von weiteren Koinhibitoren, insbesondere CTLA-4 und LAG-3, bei der Entfaltung des extrinsisch-regulatorischen Potentials. Überraschend war der Befund, dass etwa ein Drittel der untersuchten CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen der Population der T_{FH}-Zellen zuzuordnen sind.

In der Zusammenschau ergibt sich das Bild einer unscharf umschriebenen Zellpopulation, die, ohne den Tregs zugerechnet werden zu können, ein Treg-ähnliches Regulationspotential besitzt. Die unterschiedliche Potenz, mit der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen in den hier durchgeführten Suppressionsassays regulatorisch wirksam waren sowie die vielfältigen Rollen, in denen PD-1 bereits beschrieben werden konnte, deuten auf eine inhomogene Zellpopulation hin, innerhalb derer weitere, zur Regulation beitragende Faktoren vermutet werden können. Dies steht in Einklang mit dem bisherigen Verständnis von PD-1, nach dem PD-1 eben kein Zellpopulationsmarker, sondern ein zellpopulationsunabhängiger Aktivierungsmarker ist. Vor diesem Hintergrund können die Ergebnisse dieser Arbeit nicht allgemein auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen projiziert werden, sondern müssen in einem spezifischen immunologischen Setting jeweils neu reevaluiert werden. Denn nicht nur der *in vitro* - Kontext verfälscht die gezeigten Immunreaktionen möglicherweise, auch die fehlende antigenspezifische Stimulation der CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen führt zu einer möglicherweise unphysiologischen, artifiziellen Immunantwort.

Mit Blick auf zukünftige Studien wäre es interessant, neben der Phänotypisierung von ruhenden CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auch solche CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen genauer zu charakterisieren, die ein besonders ausgeprägtes extrinsisch-regulierendes Potential haben.

Das wäre eine Möglichkeit, regulatorische Kofaktoren zu identifizieren. Algorithmus-optimierte Gennetzwerk-Analysen sowie die breit angelegte RNA-Sequenzierung bieten komplexe Möglichkeiten über die Untersuchung einzelner Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren hinaus entscheidende Proteine und Signalwege nachvollziehen zu können, die eine extrinsische Regulation ermöglichen oder ihrerseits regulieren.

Ein genaueres Verständnis der physiologischen, anti-inflammatorischen Mechanismen von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen wird dabei helfen die Pathophysiologie immunologischer Herausforderungen besser zu verstehen. Spannend und klinisch relevant wäre die Frage, ob onkologisch erkrankte Individuen, bei denen sich extrinsisch-regulierende CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen nachweisen lassen, ein höheres Risiko für schwerwiegende, immunvermittelte Nebenwirkungen im Falle einer anti-PD-1 – oder anti-PD-L1 – Antikörpertherapie aufweisen. Insofern kann die weitergehende Charakterisierung von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter und sichererer immunmodulatorischer Therapien sein.

6 Zusammenfassung

Zum Erhalt der immunologischen Balance aus pro- und antiinflammatorischen Kräften stehen dem menschlichen Organismus verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Eine anti-inflammatorische Wirkung geht etwa von Regulatorischen T-Zellen aus, aber auch von Zytokinen und Oberflächenrezeptoren, wie dem koinhibitorischen Rezeptor PD-1.

Diese Arbeit steht im Kontext von Studien zum immunsuppressiven Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Rahmen einer humanen Malariainfektion. Hier sind CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen *in vitro* in der Lage das proliferative Potential von antigenspezifischen T-Zellen zu supprimieren. Diese Ergebnisse implizieren einen zellextrinsischen Regulationsmechanismus, was darauf hindeutet, dass es sich bei CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen um eine regulierende T-Zell-Population handelt, die nicht zu den natürlichen Regulatorischen T-Zellen (Tregs) gehört.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit das immunsuppressive Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen außerhalb eines Malaria-spezifischen Kontextes untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen aus dem Blut gesunder Menschen in der Lage sind, das proliferative Potential stimulierter CD4⁺ T-Zellen auf eine Treg-ähnliche Weise zu supprimieren. In nachfolgenden Zytokinassays konnte eine Reduktion der Konzentrationen von IL-2, IFN- γ und IL-10 in den Zellkulturen gezeigt werden, in denen CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen kokultiviert wurden. Zudem erfolgte die Phänotypisierung ruhender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen zur weiteren Charakterisierung dieser Zellpopulation. Es zeigte sich eine vermehrte Koexpression von CTLA4 auf CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen, die sich nicht den Regulatorischen T-Zellen zuordnen ließen. Dafür ließen sich etwa ein Drittel der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen den Follikulären T-Helferzellen zuordnen, was in der Gesamtbetrachtung auf eine große Inhomogenität innerhalb dieser Population schließen lässt.

Zusammengefasst ließ sich das aus dem Malariakontext bekannte extrinsisch-regulatorische Potential von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen auch mit Zellen von gesunden Probanden nachvollziehen. Das spricht dafür, dass dieser Mechanismus auch im Kontext anderer immunologischer Herausforderungen eine Rolle spielt. Dabei scheint die Population ruhender CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen eine inhomogene Zellpopulation zu sein, die sich zu einem erheblichen Anteil den Follikulären T-Helferzellen zuordnen lässt. Ein besseres Verständnis der Eigenschaften von CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Blut gesunder Menschen könnte helfen sie in einem Krankheitssetting besser antizipieren und zielgerichteter untersuchen zu können, was letztlich zu einem sichereren und zielgerichteteren Therapiedesign beiträgt.

6.1 Summary

Various mechanisms are available to the human organism to maintain the immunological balance of pro- and anti-inflammatory forces. An anti-inflammatory effect emanates from regulatory cell populations, such as regulatory T cells, as well as from cytokines and surface receptors, such as the co-inhibitory receptor PD-1.

This work arose from studies on the immunosuppressive potential of CD4⁺PD-1⁺ T cells in the context of human malaria infection. There, CD4⁺PD-1⁺ T cells are able to suppress the proliferative potential of antigen-specific T cells in vitro. These results imply a cell-extrinsic regulatory mechanism, suggesting that CD4⁺PD-1⁺ T cells are a regulatory T cell population that does not belong to the natural regulatory T cells (Tregs).

Against this background, the immunosuppressive potential of CD4⁺PD-1⁺ T cells was investigated outside a malaria-specific context in the present study. It was shown that CD4⁺PD-1⁺ T cells from the blood of healthy humans are also able to suppress the proliferative potential of stimulated CD4⁺ T cells in a Treg-like manner. Subsequent cytokine assays demonstrated a reduction in the levels of IL-2, IFN- γ and IL-10 in the cell cultures in which CD4⁺PD-1⁺ T cells and CD4⁺ T cells were co-cultured. In addition, phenotyping of resting CD4⁺PD-1⁺ T cells was performed to further characterise this cell population. An increased co-expression of CTLA-4 on CD4⁺PD-1⁺ T cells was found, which could not be assigned to the regulatory T cell population. On the other hand, about one third of the CD4⁺PD-1⁺ T cells could be assigned to the follicular T helper cells, which suggests a large inhomogeneity within this population when looking at the CD4⁺PD-1⁺ T cells as a whole.

In summary, the extrinsic regulatory potential of CD4⁺PD-1⁺ T cells known from the malaria context could also be reproduced with cells from healthy volunteers. This suggests that this mechanism also plays a role in the context of other immunological challenges. In this context, the population of resting CD4⁺PD-1⁺ T cells appears to be an inhomogeneous cell population, a significant proportion of which can be assigned to follicular T helper cells. A better understanding of the properties of CD4⁺PD-1⁺ T cells in the blood of healthy individuals could help to better anticipate and target their properties in a disease setting, ultimately contributing to safer and more targeted therapy design.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AKs	Antikörper
Antigenpräsentierende Zellen	APZ
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cpm	counts per minutes
cRPMI	Complete Roswell Park Memorial Institute – Zellkulturmedium
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
d	Durchschnittswert
DZs	Dendritische Zellen
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead Box P3
FSC	Forward scatter
IFN	Interferon
Ig-SF	Immunoglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
iRBC	mit <i>P. falciparum</i> - infizierte rote Blutkörperchen
Koinhibitor(en)	Koinhibitorische(r) Rezeptor(en)
MACS	Magnetic Cell Separation
M	Median
m	Mittelwert
ns	nicht stimuliert
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death – 1 (Rezeptor)
PD-L1/ -2	Programmed Death Ligand-1/ -2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC γ	Phosphoinositide phospholipase C- γ

rpm	Rounds per minute
s	Standardabweichung
SP	Suppressionsassay-Proband
SSC	Side scatter
Tab.	Tabelle
T _{EX} Zellen	Erschöpfte T-Zellen (<i>exhausted T cells</i>)
T _{FH} -Zellen	Follikulären T-Helfer Zellen
T _{FR} -Zellen	Follikuläre Regulatorische T-Zellen
TGF-Beta	Transforming Growth Factor-Beta
T _H	T-Helferzellen
T _{H1}	Typ-1-T-Helferzelle
T _{H2}	Typ-2-T-Helferzelle
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TK	Transkriptionsfaktor
T _{MEM}	Gedächtnis T-Zellen (<i>Memory T cells</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
Tr1-Zellen	Regulatorische T-Zellen Typ 1
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZRK	T-Zell-Rezeptorkomplex
ZM	Zerebrale Malaria

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veranschaulichung der verwendeten Gating-Strategie mit Darstellung der Gate-Definitionen anhand von FMO-Färbungen.	28
Abbildung 2: Titrationsassay zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Beads zu CD4 ⁺ T-Zellen.	32
Abbildung 3: Evaluation des proliferations-supprimierenden Potentials von CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen auf stimulierte CD4 ⁺ T-Zellen.	36
Abbildung 4: Darstellung der Proliferation der (ko-)kultivierten Populationen aller drei durchgeführten Suppressionsassays.	37
Abbildung 5: Konzentration von IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-10 in den Zellkulturüberständen der durchgeführten Suppressionsassays mittels Bead-basiertem Immunoassay nach 72 stündiger Stimulation. ...	40
Abbildung 6: Exemplarische Färbung der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 auf CD4 ⁺ T-Zellen.	42
Abbildung 7: Darstellung der Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf CD4 ⁺ T-Zellen.	43
Abbildung 8: Darstellung der Charakterisierung von CD4 ⁺ PD1 ⁺ T-Zellen hinsichtlich der Koexpression weiterer Koinhibitoren anhand einer exemplarischen Färbung.	44
Abbildung 9: Darstellung der Expression von Koinhibitoren auf PD-1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen.	45
Abbildung 10: Exemplarische Färbung von Regulatorischen T-Zellen hinsichtlich der Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3.	46
Abbildung 11: Darstellung des Koinhibitorprofils Regulatorischer T-Zellen.	47
Abbildung 12: Gatingstrategie zur Identifikation von T _{FH} – Zellen innerhalb CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen.	48
Abbildung 13: Darstellung des Anteils von T _{FH} - Zellen innerhalb der CD4 ⁺ T-Zellen sowie innerhalb CD4 ⁺ PD1 ⁺ T-Zellen.	49
Abbildung 14: Veranschaulichung der zugrundeliegenden Gatingstrategie anhand der Färbung des malaria-infizierten Blutes vom Tag der Erstvorstellung des Patienten.	51
Abbildung 15: Gegenüberstellung des Rezeptorprofils von CD8 ⁻ und CD4 ⁺ T-Zellen auf Grundlage der 17 Blutproben von Gesunden zur Evaluation der Interpretierbarkeit der fehlgefärbten Malaria-Blutprobe.	52
Abbildung 16: Phänotypisierung von CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch <i>P. falciparum</i> Erkrankten.	54
Abbildung 17: Phänotypisierung von CD4 ⁺ T-Zellen und Tregs eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch <i>P. falciparum</i> Erkrankten.	55
Abbildung 18: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Phänotypisierung von CD4 ⁺ PD-1 ⁺ T-Zellen, CD4 ⁺ T-Zellen und Tregs eines akut an einer unkomplizierten Malaria durch <i>P. falciparum</i> Erkrankten.	56

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren.....	19
Tabelle 3: Reagenzien	20
Tabelle 4: Medien und Puffer	21
Tabelle 5: Kits für zellbiologische Arbeiten.....	21
Tabelle 6: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	22
Tabelle 7: Probanden zur Phänotypisierung von CD4 ⁺ T-Zellen und Tregs	23
Tabelle 8: Probanden der Suppressionsassays.....	24
Tabelle 9: Software und Anwendungsgebiet.....	24

10 Literatur

- Abel, A. *et al.* (2018) ‘Differential expression pattern of co-inhibitory molecules on CD4+T cells in uncomplicated versus complicated malaria’, *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-22659-1.
- Agata, Y. *et al.* (1996) ‘Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.’, *International immunology*, 8(5), pp. 765–772. doi: 10.1093/intimm/8.5.765.
- Aiello, A. *et al.* (2019) ‘Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 2247. doi: 10.3389/fimmu.2019.02247.
- Anderson, A. C., Joller, N. and Kuchroo, V. K. (2016) ‘Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation’, *Immunity*. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.001.
- Andris, F. *et al.* (2017) ‘The Transcription Factor c-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 8, p. 480. doi: 10.3389/fimmu.2017.00480.
- Attanasio, J. and Wherry, E. J. (2016) ‘Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease’, *Immunity*. Elsevier Inc., 44(5), pp. 1052–1068. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.022.
- Avery, D. T. *et al.* (2008) ‘IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), pp. 1767–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641314> (Accessed: 15 February 2019).
- Bacchetta, R. *et al.* (1994) ‘High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells’, *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press, 179(2), pp. 493–502. doi: 10.1084/jem.179.2.493.
- Baixeras, E. *et al.* (1992) ‘Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens.’, *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 176(2), pp. 327–37. doi: 10.1084/JEM.176.2.327.
- Barber, D. L. *et al.* (2006a) ‘Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.’, *Nature*, 439(7077), pp. 682–7. doi: 10.1038/nature04444.

- Barber, D. L. *et al.* (2006b) 'Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection'. doi: 10.1038/nature04444.
- Bartoloni, A. and Zammarchi, L. (2012) 'Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria', *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. Catholic University in Rome, p. 201. doi: 10.4084/MJHID.2012.026.
- Bettini, M. *et al.* (2011) 'Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 187(7), pp. 3493–8. doi: 10.4049/jimmunol.1100714.
- Beyer, M. *et al.* (2016) 'Tumor-necrosis factor impairs CD4+ T cell-mediated immunological control in chronic viral infection', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 17(5), pp. 593–603. doi: 10.1038/ni.3399.
- Braun, G. S. *et al.* (2020) 'Side effects of novel cancer immunotherapies', *Nephrologie*. Springer Medizin, 15(3), pp. 191–204. doi: 10.1007/s11560-020-00424-8.
- Brooks, D. G. *et al.* (2006) 'Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo', *Nature Medicine*. NIH Public Access, 12(11), pp. 1301–1309. doi: 10.1038/nm1492.
- Butler, N. S. *et al.* (2012) 'Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection.', *Nature immunology*, 13(2), pp. 188–95. doi: 10.1038/ni.2180.
- Carswell, E. A. *et al.* (1975) 'An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 72(9), pp. 3666–3670. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- Catakovic, K. *et al.* (2017) 'T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy.', *Cell communication and signaling : CCS*. BioMed Central, 15(1), p. 1. doi: 10.1186/s12964-016-0160-z.
- Che, K. F. *et al.* (2010) 'HIV-1 impairs in vitro priming of naive T cells and gives rise to contact-dependent suppressor T cells', pp. 2248–2258. doi: 10.1002/eji.201040377.
- Chemnitz, J. M. *et al.* (2004) 'SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation', *The Journal of Immunology*, 173(2), pp. 945–954. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945.
- Chen, W. *et al.* (2003) 'Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*', *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp. 1875–1886. doi: 10.1084/jem.20030152.
- Chen, X. *et al.* (2007) 'Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion

- and Function of Mouse CD4 + CD25 + T Regulatory Cells ', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 179(1), pp. 154–161. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.154.
- Chockalingam, A. *et al.* (2003) 'Pancarditis as initial presentation of systemic lupus erythematosus', 87, pp. 111–114.
- Cohen, S., McGregor, I. A. and Carrington, S. (1961) 'Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria', *Nature*. Nature, 192(4804), pp. 733–737. doi: 10.1038/192733a0.
- Collins, A. V *et al.* (2002) 'The interaction properties of costimulatory molecules revisited.', *Immunity*, 17(2), pp. 201–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196291> (Accessed: 15 January 2019).
- Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M. (2008) 'IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 180(9), pp. 5771–5777. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
- Crawford, A. *et al.* (2014) 'Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection', *Immunity*. Elsevier, 40(2), pp. 289–302. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.005.
- Crompton, P. D. *et al.* (2010) 'A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(15), pp. 6958–6963. doi: 10.1073/pnas.1001323107.
- D'Ombra, M. C. *et al.* (2008) 'Association of Early Interferon- γ Production with Immunity to Clinical Malaria: A Longitudinal Study among Papua New Guinean Children', *Clinical Infectious Diseases*, 47(11), pp. 1380–1387. doi: 10.1086/592971.
- Diskin, B. *et al.* (2020) 'PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer', *Nature Immunology*. Springer US, 21(4), pp. 442–454. doi: 10.1038/s41590-020-0620-x.
- Dong, Y. *et al.* (2019) 'CD4+ T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B', *BMC Immunology*. BMC Immunology, 20(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12865-019-0309-9.
- Dupage, M. and Bluestone, J. A. (2016) 'Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 149–163. doi: 10.1038/nri.2015.18.
- Duraiswamy, J. *et al.* (2011) 'Phenotype, function, and gene expression profiles of

- programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. NIH Public Access, 186(7), pp. 4200–12. doi: 10.4049/jimmunol.1001783.
- Dyck, L. and Mills, K. H. G. (2017) ‘Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases.’, *European journal of immunology*, pp. 1–15. doi: 10.1002/eji.201646875.
- Egen, J. G., Kuhns, M. S. and Allison, J. P. (2002) ‘CTLA-4: New insights into its biological function and use in tumor immunotherapy’, *Nature Immunology*, 3(7), pp. 611–618. doi: 10.1038/ni0702-611.
- Eivazi, S. *et al.* (2016) ‘Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, pp. 1668–1678. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.083.
- Elkord, E. (2014) ‘Thymus-derived, peripherally derived, and in vitro-induced T regulatory cells’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fimmu.2014.00017.
- Fahey, L. M. *et al.* (2011) ‘Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells’, *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 208(5), pp. 987–999. doi: 10.1084/jem.20101773.
- Farber, D. L., Yudanin, N. A. and Restifo, N. P. (2014) ‘Human memory T cells: Generation, compartmentalization and homeostasis’, *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, pp. 24–35. doi: 10.1038/nri3567.
- Fife, B. T. and Pauken, K. E. (2011) ‘The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance’, *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., 1217(1), pp. 45–59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x.
- Fontenot, J. D. *et al.* (2005) ‘Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3’, *Immunity*, 22(3), pp. 329–341. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.016.
- Francisco, L. M., Sage, P. T. and Sharpe, A. H. (2010) ‘The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity’, *Immunological Reviews*, 236(1), pp. 219–242. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
- Freeman, G. J. *et al.* (2000) ‘Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.’, *The Journal of experimental medicine*, 192(7), pp. 1027–1034. doi: 10.1084/jem.192.7.1027.
- Gagliani, N. *et al.* (2013) ‘Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse

- T regulatory type 1 cells.', *Nature medicine*, 19(6), pp. 739–46. doi: 10.1038/nm.3179.
- Gato-Cañas, M. *et al.* (2017) 'PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity', *Cell Reports*. Elsevier B.V., 20(8), pp. 1818–1829. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.075.
- Głobińska, A. *et al.* (2018) 'Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens', *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. American College of Allergy, Asthma and Immunology, pp. 306–312. doi: 10.1016/j.anai.2018.06.026.
- Good-Jacobson, K. L. *et al.* (2010) 'PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells', *Nature Immunology*, 11(6), pp. 535–542. doi: 10.1038/ni.1877.
- Götz, A. *et al.* (2017) 'Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(49), pp. E10568–E10577. doi: 10.1073/pnas.1708383114.
- Gregori, S., Goudy, K. S. and Roncarolo, M. G. (2012) 'The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2012.00030.
- Grossman, W. J. *et al.* (2004) 'Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells', *Blood*. American Society of Hematology, 104(9), pp. 2840–2848. doi: 10.1182/blood-2004-03-0859.
- Groux, H. *et al.* (1997) 'A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis', *Nature*, 389(6652), pp. 737–742. doi: 10.1038/39614.
- Hafalla, J. C. R. *et al.* (2012) 'The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to *Plasmodium*-induced Acute Immune Pathology', *PLoS Pathogens*. Edited by E. J. Wherry. Public Library of Science, 8(2), p. e1002504. doi: 10.1371/journal.ppat.1002504.
- Hale, J. S. *et al.* (2013) 'Distinct memory cd4+ t cells with commitment to t follicular helper- and t helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection', *Immunity*. Immunity, 38(4), pp. 805–817. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.020.
- Hale, J. S. and Ahmed, R. (2015) 'Memory T follicular helper CD4 T cells', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 16. doi: 10.3389/fimmu.2015.00016.
- Harty, J. T. (2019) 'T cell- mediated immunity to malaria', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 19(July). doi: 10.1038/s41577-019-0158-z.
- Hastings, W. D. *et al.* (2009) 'TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and

- regulates Th1 and Th17 cytokines', *European Journal of Immunology*, 39(9), pp. 2492–2501. doi: 10.1002/eji.200939274.
- Haynes, N. M. *et al.* (2007) 'Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), pp. 5099–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911595> (Accessed: 15 February 2019).
- Hearps, A. C. *et al.* (2012) 'Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function', *Aging Cell. Aging Cell*, 11(5), pp. 867–875. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00851.x.
- Hsu, P. *et al.* (2015) 'IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1', *The Journal of Immunology*, 195(8), pp. 3665–3674. doi: 10.4049/jimmunol.1402898.
- Hu, V. W. *et al.* (2002) '3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis', *The FASEB Journal*, (1). doi: 10.1096/fj.02-0142fje.
- Huang, C.-T. *et al.* (2004) 'Role of LAG-3 in Regulatory T Cells', *Immunity. Cell Press*, 21(4), pp. 503–513. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2004.08.010.
- Huard, B. *et al.* (1994) *Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand, Immunogenetics*. Available at: <http://emedien3.sub.uni-hamburg.de/han/sfx/https/link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00241263.pdf> (Accessed: 17 January 2019).
- Hui, E. *et al.* (2017) 'T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition', *Science. American Association for the Advancement of Science*, 355(6332), pp. 1428–1433. doi: 10.1126/science.aaf1292.
- Ishida, Y. *et al.* (1992) 'Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.', *The EMBO journal*, 11(11), pp. 3887–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010) 'Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 327(5963), pp. 291–5. doi: 10.1126/science.1183021.
- Jean Bosco, M. *et al.* (2018) 'The exhausted CD4+CXCR5+ T cells involve the pathogenesis

- of human tuberculosis disease', *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier B.V., 74, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ijid.2018.06.011.
- Jin, H.-T. *et al.* (2010) 'Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), pp. 14733–14738. doi: 10.1073/pnas.1009731107.
- Jubel, J. M. *et al.* (2020) 'The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 487. doi: 10.3389/fimmu.2020.00487.
- Kaminski, L. (2017) *Untersuchung der suppressiven Eigenschaften von PD-1+CD4+ T-Lymphozyten des Menschen, Masterarbeit.*
- Keir, M. E. *et al.* (2008) 'PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity', *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp. 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- King, T. and Lamb, T. (2015) 'Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria.', *PLoS pathogens*. Public Library of Science, 11(10), p. e1005118. doi: 10.1371/journal.ppat.1005118.
- Kisielow, M. *et al.* (2005) 'Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 35(7), pp. 2081–2088. doi: 10.1002/eji.200526090.
- Krummel, M. F. and Allison, J. P. (1996) 'CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 183(6), pp. 2533–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676074> (Accessed: 16 January 2019).
- Kuo, P. T. *et al.* (2018) 'The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer', *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A., p. 271. doi: 10.3389/fmed.2018.00271.
- Kurup, S. P., Butler, N. S. and Harty, J. T. (2019a) 'T cell-mediated immunity to malaria', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 457–471. doi: 10.1038/s41577-019-0158-z.
- Kurup, S. P., Butler, N. S. and Harty, J. T. (2019b) 'T cell-mediated immunity to malaria', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 457–471. doi: 10.1038/s41577-019-0158-z.
- Larkin, J. *et al.* (2015) 'Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.', *The New England journal of medicine*, 373(1). doi: 10.1056/NEJMoal504030.
- Latchman, Y. *et al.* (2001) 'PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation.', *Nature immunology*, 2(3), pp. 261–268. doi: 10.1038/85330.

- Law, H. *et al.* (2020) ‘Tfh cells in health and immunity: Potential targets for systems biology approaches to vaccination’, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, pp. 1–21. doi: 10.3390/ijms21228524.
- Lazar-Molnar, E. *et al.* (2008) ‘The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), pp. 2658–2663. doi: 10.1073/pnas.0711918105.
- Lenzen-Schulte, Martina; Grunert, D. (2018) *Nobelpreis für Medizin: Lahme Abwehr scharf machen*, *Deutsches Ärzteblatt*. Available at: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/201330/Nobelpreis-fuer-Medizin-Lahme-Abwehr-scharf-machen> (Accessed: 21 February 2021).
- Lindgren, T. *et al.* (2011) ‘Longitudinal Analysis of the Human T Cell Response during Acute Hantavirus Infection’, *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 85(19), pp. 10252–10260. doi: 10.1128/jvi.05548-11.
- Linsley, P. S. *et al.* (1996) ‘Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement.’, *Immunity*, 4(6), pp. 535–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673700> (Accessed: 16 January 2019).
- Liu, T. *et al.* (2017) ‘NF-κB signaling in inflammation’, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature, pp. 1–9. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Liu, W. *et al.* (2006) ‘CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells.’, *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 203(7), pp. 1701–11. doi: 10.1084/jem.20060772.
- Locci, M. *et al.* (2013) ‘Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses’, *Immunity*. NIH Public Access, 39(4), pp. 758–769. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.031.
- Lohr, J., Knoechel, B. and Abbas, A. K. (2006) ‘Regulatory T cells in the periphery’, *Immunological Reviews*, 212(1), pp. 149–162. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00414.x.
- Luty, A. J. F. *et al.* (1999) ‘Interferon-γ responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children’, *Journal of Infectious Diseases*. University of Chicago Press, 179(4), pp. 980–988. doi: 10.1086/314689.
- Mackroth, M. S. *et al.* (2016) ‘Acute Malaria Induces PD1 + CTLA4 + Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function’, *PLOS Pathogens*, (DOI:10.1371/journal.ppat.1005909), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.ppat.1005909.
- Masopust, D. and Schenkel, J. M. (2013) ‘The integration of T cell migration, differentiation and function’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 309–320. doi:

10.1038/nri3442.

McCall, M. B. B. *et al.* (2010) 'Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali.', *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), pp. 142–152. doi: 10.1086/648596.

McGregor, I. A. (1964) 'Studies in the acquisition of immunity to *plasmodium falciparum* infections in africa', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. No longer published by Elsevier, 58(1), pp. 80–92. doi: 10.1016/0035-9203(64)90073-2.

Mitchell, A. J. *et al.* (2005) 'Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 73(9), pp. 5645–53. doi: 10.1128/IAI.73.9.5645-5653.2005.

Monney, L. *et al.* (2002) 'Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease', *Nature*, 415(6871), pp. 536–541. doi: 10.1038/415536a.

Muxel, S. M. *et al.* (2011) 'The spleen CD4 + T cell response to Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 6(7). doi: 10.1371/journal.pone.0022434.

Nikolaos Patsoukis, Julia Brown, Victoria Petkova, Fang Liu, Lequn Li, V. A. B. (2012) *Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation* | *サイエンス誌*. Available at: <http://kagakusha.aaas.org/article/41242> (Accessed: 28 April 2017).

Nishimura, H. *et al.* (1999) 'Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor', *Immunity*, 11(2), pp. 141–151. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80089-8.

Nokta, M. *et al.* (1997) 'Kinetics of tumor necrosis factor α and soluble TNFR_{II} in HIV-infected patients treated with a triple combination of stavudine, didanosine, and hydroxyurea', *AIDS Research and Human Retroviruses*. Mary Ann Liebert Inc., 13(18), pp. 1633–1638. doi: 10.1089/aid.1997.13.1633.

O'Shea, J. J. and Paul, W. E. (2010) 'Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells', *Science*, 327(5969), pp. 1098–1102. doi: 10.1126/science.1178334.

Organization, W. H. (2020) *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*.

De Pablo-Bernal, R. S. *et al.* (2014) 'TNF- levels in HIV-infected patients after long-term

- suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 69(11), pp. 3041–3046. doi: 10.1093/jac/dku263.
- Phares, T. W. *et al.* (2009) 'Target-Dependent B7-H1 Regulation Contributes to Clearance of Central Nervous System Infection and Dampens Morbidity', *The Journal of Immunology*, 182(9), pp. 5430–5438. doi: 10.4049/jimmunol.0803557.
- Pombo, D. J. *et al.* (2002) 'Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*', *Lancet*. Elsevier Limited, 360(9333), pp. 610–617. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09784-2.
- Qureshi, O. S. *et al.* (2011) 'Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.', *Science (New York, N.Y.)*. Europe PMC Funders, 332(6029), pp. 600–3. doi: 10.1126/science.1202947.
- Rao, M. *et al.* (2017) 'Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm', *International Journal of Infectious Diseases*. International Society for Infectious Diseases, 56, pp. 221–228. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.028.
- Ratner, A. and Clark, W. R. (1993) 'Role of TNF-alpha in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis.', *The Journal of Immunology*, 150(10).
- Riella, L. V. (2012) 'Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response', 12(10), pp. 2575–2587. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x.
- Roncarolo, M. G. *et al.* (2018) 'The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases', *Immunity*. Cell Press, pp. 1004–1019. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.001.
- Rowshanravan, B., Halliday, N. and Sansom, D. M. (2017) 'CTLA-4: a moving target in immunotherapy', *Blood*, 131(1), p. blood-2017-06-741033. doi: 10.1182/blood-2017-06-741033.
- Rudd, C. E., Taylor, A. and Schneider, H. (2009) 'CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction.', *Immunological reviews*. Europe PMC Funders, 229(1), pp. 12–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x.
- Ruibal, P. *et al.* (2016) 'Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea', *Nature*. Nature Publishing Group, 533(7601), pp. 100–104. doi: 10.1038/nature17949.
- Ryg-Cornejo, V. *et al.* (2016a) 'Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation', *Cell Reports*, 14(1), pp. 68–81. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.006.
- Ryg-Cornejo, V. *et al.* (2016b) 'Severe Malaria Infections Impair Germinal Center

- Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation', *Cell Reports*. Elsevier, 14(1), pp. 68–81. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.006.
- Ryg-Cornejo, V., Ly, A. and Hansen, D. S. (2016) 'Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria', *Parasitology*. Cambridge University Press, pp. 199–207. doi: 10.1017/S0031182015001705.
- Sabatos, C. A. *et al.* (2003) 'Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance', *Nature Immunology*, 4(11), pp. 1102–1110. doi: 10.1038/ni988.
- Salles, É. M. de *et al.* (2017) 'P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria', *PLoS Pathogens*. Public Library of Science, 13(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1006595.
- Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010) 'The regulation of IL-10 production by immune cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(3), pp. 170–181. doi: 10.1038/nri2711.
- Schneider, H. *et al.* (1999) 'Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(4), pp. 1868–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438921> (Accessed: 16 January 2019).
- Sereti, I. *et al.* (2000) 'Interleukin 2 leads to dose-dependent expression of the alpha chain of the IL-2 receptor on CD25-negative T lymphocytes in the absence of exogenous antigenic stimulation', *Clinical Immunology*. Academic Press Inc., 97(3), pp. 266–276. doi: 10.1006/clim.2000.4929.
- Sester, U. *et al.* (2008) 'PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific t cells correlates with viremia and reversible functional anergy', *American Journal of Transplantation*. Am J Transplant, 8(7), pp. 1486–1497. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02279.x.
- Sharpe, A. H. (2009) 'Mechanisms of costimulation.', *Immunological reviews*. NIH Public Access, 229(1), pp. 5–11. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x.
- Sharpe, A. H. and Pauken, K. E. (2017) 'The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway', *Nature Reviews Immunology*, 18(3), pp. 153–167. doi: 10.1038/nri.2017.108.
- Shimatani, K. *et al.* (2009) 'PD-1+ memory phenotype CD4+ T cells expressing C/EBP α underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(37), pp. 15807–15812. doi: 10.1073/pnas.0908805106.

- Shiratori, T. *et al.* (1997) 'Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2.', *Immunity*, 6(5), pp. 583–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175836> (Accessed: 16 January 2019).
- Spolski, R., Li, P. and Leonard, W. J. (2018) 'Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 18(10), pp. 648–659. doi: 10.1038/s41577-018-0046-y.
- Steeg, C. *et al.* (2009) 'Limited Role of CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells in the Control of Experimental Cerebral Malaria', *The Journal of Immunology*, 183(11), pp. 7014–7022. doi: 10.4049/jimmunol.0901422.
- Takeuchi, A. and Saito, T. (2017) 'CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation, p. 194. doi: 10.3389/fimmu.2017.00194.
- Tivol, E. A. *et al.* (1995) *Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4*, *Immunity*.
- Triebel, F. *et al.* (1990) 'LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4.', *The Journal of experimental medicine*. Rockefeller University Press, 171(5), pp. 1393–405. doi: 10.1084/JEM.171.5.1393.
- Victora, G. D. and Nussenzweig, M. C. (2012) 'Germinal centers', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews , pp. 429–457. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032.
- Villegas-Mendez, A. *et al.* (2012) 'IFN- γ -producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Europe PMC Funders, 189(2), pp. 968–79. doi: 10.4049/jimmunol.1200688.
- Vinuesa, C. G. and Cyster, J. G. (2011) 'How T cells earn the follicular rite of passage', *Immunity*. *Immunity*, pp. 671–680. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.001.
- Wajant, H. and Siegmund, D. (2019) 'TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., p. 91. doi: 10.3389/fcell.2019.00091.
- Wakkach, A. *et al.* (2003) 'Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo', *Immunity*. Cell Press, 18(5), pp. 605–617. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00113-4.

- Walker, L. S. K. (2013) 'Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance', *Journal of autoimmunity*. 2013/07/10. Academic Press, 45(100), pp. 49–57. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.006.
- Walunas, T. L., Bakker, C. Y. and Bluestone, J. A. (1996) 'CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation.', *The Journal of experimental medicine*, 183(6), pp. 2541–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676075> (Accessed: 16 January 2019).
- Wang, C. J. *et al.* (2012) 'Cutting Edge: Cell-Extrinsic Immune Regulation by CTLA-4 Expressed on Conventional T Cells', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 189(3), pp. 1118–1122. doi: 10.4049/jimmunol.1200972.
- Waterhouse, P. *et al.* (1995) 'Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 270(5238), pp. 985–988. doi: 10.1126/science.270.5238.985.
- Wherry, E. J. (2011) 'T cell exhaustion.', *Nature immunology*. Nature Publishing Group, 12(6), pp. 492–499. doi: 10.1038/ni.2035.
- Wherry, E. John and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nature Reviews Immunology*, 15(8). doi: 10.1038/nri3862.
- Wherry, E John and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nat Rev Immunol*. doi: 10.1038/nri3862.
- Wing, K. *et al.* (2008) 'CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 322(5899), pp. 271–275. doi: 10.1126/science.1160062.
- Wolchok, J. D. *et al.* (2013) 'Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma.', *The New England journal of medicine*, 369(2). doi: 10.1056/NEJMoa1302369.
- Workman, C. J. *et al.* (2009) 'LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 182(4), pp. 1885–91. doi: 10.4049/jimmunol.0800185.
- Workman, C. J., Dugger, K. J. and Vignali, D. A. A. (2002) 'Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(10), pp. 5392–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421911> (Accessed: 17 January 2019).
- Yamazaki, T. *et al.* (2002) 'Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(10), pp. 5538–5545. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5538.
- Yokosuka, T. *et al.* (2012) 'Programmed cell death 1 forms negative costimulatory

- microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2.’, *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 209(6), pp. 1201–17. doi: 10.1084/jem.20112741.
- Yu, J. *et al.* (2016) ‘PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes’, *OncoTargets and Therapy*, Volume 9, pp. 5023–5039. doi: 10.2147/OTT.S105862.
- Zander, R. A. *et al.* (2017) ‘Th1-like Plasmodium-Specific Memory CD4+ T Cells Support Humoral Immunity’, *Cell Reports*. Elsevier B.V., 21(7), pp. 1839–1852. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.077.
- Zeng, H. *et al.* (2015) ‘Type 1 regulatory T cells: A new mechanism of peripheral immune tolerance’, *Cellular and Molecular Immunology*, 12(5), pp. 566–571. doi: 10.1038/cmi.2015.44.
- Zhao, Y., Shao, Q. and Peng, G. (2020) ‘Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment’, *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature, pp. 27–35. doi: 10.1038/s41423-019-0344-8.
- Zheng, L. *et al.* (1995) ‘Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor’, *Nature*. Nature, 377(6547), pp. 348–351. doi: 10.1038/377348a0.
- Zhu, C. *et al.* (2005) ‘The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity’, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 6(12), pp. 1245–1252. doi: 10.1038/ni1271.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit zwischen September 2016 und September 2021 auf der Grundlage meiner Arbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg entstanden. Für die überaus lehrreiche und spannende Zeit bin ich ebenso dankbar, wie ich allen Menschen dankbar bin, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Allen voran zu nennen ist mein Doktorvater, PD Dr. Thomas Jacobs, der es mir ermöglichte meine Dissertation auf diesem faszinierenden und hochrelevanten Themengebiet anzufertigen. Danken möchte ich ihm für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die menschlich und fachlich tolle Begleitung.

Ebenso möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Jacobs (Protozoen-Immunologie)“ für den jederzeit anregenden Austausch sowie die große Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders hervorzuheben ist hier Dr. Maria Mackroth, der ich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit danke, etwa durch die methodische Einführung oder durch ihre unermüdlichen Hinweise während der Niederschrift meiner Arbeit. Den menschlichen und fachlichen Austausch habe ich stets als motivierend, konstruktiv und bereichernd empfunden.

Danken möchte ich überdies Prof. Dr. Julian Schulze zur Wiesch für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie allen übrigen Mitgliedern der Prüfungskommission, für die Bereitschaft an meiner Verteidigung mitzuwirken.

Darüber hinaus möchte ich Daniel Becker, Marius Piepke und Dr. Katharina Schüller für die kritische Durchsicht meiner Arbeit, die richtigen Worte zur richtigen Zeit und unsere besondere Freundschaft danken.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet und gefördert haben.

Zu nennen sind hier Uta Zwölfer-Dorau und Dr. Frank Dorau, die durch ihr stetes Interesse an meiner Arbeit sowie unermüdlichen Zuspruch zum guten Gelingen beigetragen haben.

Außerdem zu nennen ist Dr. Philipp Bitzer, der mir seit ich denken kann als unverzichtbarer Ratgeber, Kompass und großer Bruder im besten Sinne zur Seite steht.

Dankbar für unser Familienglück, ihren Humor und ihre Geduld bin ich meiner Frau, Annika Bitzer, ohne deren verlässlichen und liebevollen Rückhalt diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Barbara und Hans Bitzer, bedanken. Ihre liebevolle Fürsorge und Unterstützung von Beginn an ist das Fundament dieser Arbeit und all dessen, was mein berufliches und privates Glück heute ausmacht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

12 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

13 Eidesstattliche Erklärung

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.