

**CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunregulation
während der *Plasmodium yoelii*-Infektion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Simone Abel

aus Salzgitter

April 2011

Für meine Eltern und Dome

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

2. Gutachter: PD Dr. Wiebke Hansen

3. Gutachter: PD Dr. Stefanie Flohé

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Das Immunsystem | 7 |
| 1.2 T-Lymphozyten | 8 |
| 1.2.1 T-Zellaktivierung | 10 |
| 1.2.2 Zentrale und periphere Toleranz | 11 |
| 1.2.3 Natürliche regulatorische T-Zellen..... | 11 |
| 1.2.4 Induzierte regulatorische T-Zellen | 14 |
| 1.2.4.1 Suppressionsmechanismen von Tregs | 16 |
| 1.2.4.1.1 Interleukin-10..... | 19 |
| 1.2.5 Regulatorische T-Zellen in Infektionen | 21 |
| 1.3 Malaria | 22 |
| 1.3.1 Humanpathogene <i>Plasmodien</i> -Stämme..... | 23 |
| 1.3.2 <i>Plasmodium</i> Lebenszyklus | 25 |
| 1.3.2.1 Wissenschaftliche Tiermodelle der Malaria..... | 27 |
| 1.3.3 Die Immunantwort während der Malariainfektion | 27 |
| 1.3.3.1 Leberphase | 28 |
| 1.3.3.2 Blutphase | 29 |
| 1.3.4 Regulatorische T-Zellen während der Malariainfektion..... | 33 |
| 1.7 Zielsetzung | 36 |
| 2 Material und Methoden | 37 |
| 2.1 Mauslinien | 37 |
| 2.1.1 Tierhaltung | 37 |
| 2.1.2 BALB/c | 37 |
| 2.1.3 Foxp3/eGFP | 37 |
| 2.1.4 DEREK..... | 37 |
| 2.1.5 CD4IL10-KO | 38 |
| 2.2 <i>Plasmodium</i>-Stamm | 38 |
| 2.3 Chemikalien | 38 |
| 2.4 Puffer, Kulturmedien und Lösungen | 39 |
| 2.5 Primer | 41 |
| 2.6 Enzyme, DNA-Marker und Antikörper | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7 Kommerzielle Standardtests (Kits) | 43 |
| 2.8 Geräte | 43 |
| 2.9 Molekularbiologische Methoden | 44 |
| 2.9.1 Genotypisierung transgener Mauslinien | 44 |
| 2.9.2 Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene..... | 45 |
| 2.9.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasyMiniKit® | 45 |
| 2.9.2.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) | 46 |
| 2.9.2.3 Semiquantitativer Polymerase-Kettenreaktion | 47 |
| 2.9.2.4 Agarosegelelektrophorese | 47 |
| 2.9.2.5 Quantitative Real-Time PCR..... | 48 |
| 2.9.2.6 Genexpressionsanalysen..... | 49 |
| 2.10 Zellbiologische Methoden | 50 |
| 2.10.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen | 50 |
| 2.10.1.1 Milz | 50 |
| 2.10.1.2 Mesenterische Lymphknoten | 50 |
| 2.10.1.3 Blut..... | 50 |
| 2.10.2 Durchflusszytometrie | 51 |
| 2.10.2.1 Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse..... | 51 |
| 2.10.2.1.1 Oberflächenfärbung..... | 51 |
| 2.10.2.1.2 Intrazelluläre Färbung | 52 |
| 2.10.2.2 Sortieren von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie..... | 52 |
| 2.10.2.3 Bestimmung der Zellzahl | 52 |
| 2.10.2.4 Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen | 53 |
| 2.10.2.5 Isolierung von Dendritischen Zellen | 53 |
| 2.10.2.6 Isolierung von IL-10 sezernierenden T-Zellen..... | 54 |
| 2.10.2.7 CFSE-Markierung von Lymphozyten | 55 |
| 2.10.2.8 Proliferationstest | 55 |
| 2.10.2.9 Inhibitionstest..... | 56 |
| 2.10.2.10 Bestimmung von sezernierten Zytokinen | 56 |
| 2.11 Tierexperimentelle Methoden | 57 |
| 2.11.1 Injektion von Diphtherie-Toxin zur Depletion von Foxp3 ⁺ Tregs..... | 57 |
| 2.11.2 Bestimmung der Parasitämie | 57 |
| 2.11.3 Herstellung von <i>P. yoelii</i> -Blutstabilaten | 58 |
| 2.11.4 Infektion von Mäusen mit <i>P. yoelii</i> | 58 |

| | |
|--|------------|
| 2.12 Statistik | 59 |
| 4 Ergebnisse..... | 60 |
| 4.1 Charakterisierung der T-Zellantwort während der Infektion mit <i>P. yoelii</i> .60 | |
| 4.2 Depletion Foxp3 ⁺ Tregs während der <i>P. yoelii</i> -Infektion | 66 |
| 4.3 Genexpressionsanalysen von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen im Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektion | 71 |
| 4.4 Isolation und Analyse von IL10 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen mit Hilfe des „IL-10 Secretion Kits“ | 81 |
| 4.5 Die CD4 ⁺ T-Zell-spezifische Deletion der IL-10 Expression führt zu einer verstärkten T-Zellantwort nach <i>P. yoelii</i> -Infektion | 87 |
| 5 Diskussion..... | 97 |
| 6 Zusammenfassung | 110 |
| 7 Literatur | 112 |
| 8 Verzeichnisse | 127 |
| 8.1 Abkürzungsverzeichnis..... | 127 |
| 8.2 Abbildungsverzeichnis..... | 132 |
| 8.3 Tabellenverzeichnis | 135 |
| Danksagung | 136 |
| Lebenslauf..... | 137 |
| Erklärung | 138 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem muss auf eine Vielzahl von Pathogenen, wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, sowie auf entartete, körpereigene Zellen reagieren können und dabei die Individualität des Organismus erhalten. Es wird in angeborene und adaptive Immunantworten unterteilt, deren komplexes Zusammenspiel für einen ausreichenden Schutz bei einer Infektion essentiell ist (Janeway et al., 2002). Die Unterscheidung zwischen Selbst und nicht-Selbst ist dabei ein grundlegender Prozess, der Immunantworten gegen harmlose Antigene, wie Nahrung oder gegen körpereigenes Gewebe verhindert, da diese zu Autoimmunkrankheiten oder zu Immunpathologien führen können (Janeway et al., 2002; Sakaguchi und Sakaguchi, 2005).

Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine sofortige, jedoch eher unspezifische Immunantwort auf eindringende Pathogene. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile), Mastzellen und Dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) (Janeway et al., 2002). Darüber hinaus kann zudem das Komplementsystem, eine Gruppe von Blut-Proteinen, dabei helfen, Krankheitserreger zu beseitigen und die Immunantwort zu verstärken (Frank und Fries, 1991). NK-Zellen gehen nach ihrer Aktivierung gegen intrazelluläre Erreger wie z.B. Viren oder Parasiten vor und töten die infizierte Zelle (Scott und Trinchieri, 1995). Hauptsächlich DCs, Makrophagen aber auch Neutrophile erkennen konservierte, mikrobielle Muster, wie Lipopolysaccharide (LPS) über spezielle Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR), wie z.B. Toll-ähnliche-Rezeptoren (engl. *toll-like-receptor*, TLR). Die Aktivierung von PRRs führt zur Produktion von Zytokinen, Chemokinen, sowie auch zu einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen. Dadurch werden weitere Immunzellen zur Infektionsstelle gelockt und aktiviert (Janeway et al., 2002; Takeda und Akira, 2005).

Makrophagen phagozytieren erfasste Pathogene, degradieren diese und prozessieren einzelne Antigene. Diese Antigene werden anschließend über die

Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse-I und -II den spezifischen Lymphozyten, des adaptiven Immunsystems präsentiert. Das Aufeinandertreffen von aus dem Blut ins Gewebe migrierenden, unreifen DCs und einem Krankheitserreger führt zur Reifung dieser DCs. Reife DCs wandern zum nächsten Lymphknoten, um dort ihr prozessiertes Antigen über MHC Klasse-I und -II den spezifischen Lymphozyten zu präsentieren. Diese antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) stellen die Verbindungstelle zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem dar (Aderem und Underhill, 1999; Banchereau et al., 2000).

Das hochspezifische und effektive System der adaptiven Immunität existiert nur in höheren Organismen (Wirbeltieren) und ermöglicht diesen, unter anderem durch die Aufrechterhaltung von erworbener Immunität, gezielt auf fast jedes Pathogen reagieren zu können. Diese Eigenschaft basiert auf den im Knochenmark entstehenden Lymphozyten und ihren diversen Effektormechanismen. Man unterteilt die Lymphozyten in im Knochenmark maturierende B-Lymphozyten (humorale Immunantwort, Antikörperproduktion) und in T-Lymphozyten (zelluläre Immunantwort), die aus dem Knochenmark in den Thymus wandern und dort heranreifen. Die Lymphozyten zirkulieren im Blut und in der Lymphe und sind in großen Mengen auch in den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz, den Lymphknoten, den Mandeln und in den darmassoziierten lymphatischen Geweben lokalisiert. Die Funktionen von T-Lymphozyten werden in Kapitel 1.2 genauer erläutert (zusammengefasst in Janeway et al., 2002).

1.2 T-Lymphozyten

Die Immunabwehr auf zellulärer Ebene wird von T-Zellen durchgeführt und als zelluläre Immunität bezeichnet. Es werden generell zwei Hauptgruppen von T-Zellen unterschieden, die CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen.

CD4⁺ T-Zellen erfassen Antigene, die über MHC Klasse-II Moleküle präsentiert werden. Basierend auf ihrem Zytokinprofil werden CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche T-Helfer (T_H)-Zellpopulationen wie T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen unterteilt (Abbas et al., 1996; Zhou et al., 2009).

T_H1-Zellen definieren sich durch den Transkriptionsfaktor T-bet (engl. *T-box transcription factor expressed in T cells*) und die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-2 und Interferon (IFN)- γ , über das sie z.B. effektiv Makrophagen aktivieren, um eindringende Pathogene zu bekämpfen. Sie bewirken aber auch einen Antikörper *class switch* vorhandener Antikörper in opsonierende Antikörper-Untergruppen (Abbas et al., 1996; Su und Stevenson, 2002). Damit tragen T_H1-Zellen massiv zu einer inflammatorischen Immunantwort bei.

T_H2-Zellen exprimieren den spezifischen Transkriptionsfaktor GATA-3 und sezernieren vorwiegend die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Sie regulieren die inflammatorische Immunantwort und unterstützen die humorale B-Zellantwort. Sie fördern die B-Zellentwicklung zu Plasmazellen, die neutralisierende Antikörper wie Immunglobulin (Ig)G-1 sowie IgE produzieren und aktivieren Mastzellen, Eosinophile und Basophile (Abbas et al., 1996; Ansel et al., 2006).

T_H1-Zellen bekämpfen primär intrazelluläre Pathogene wie Virus-Infektionen, während die T_H2 gerichtete Abwehr eher gegen extrazelluläre Pathogene, Parasiten und Wurminfektionen vorgeht (Mosmann und Coffman, 1989). Eine T_H1 oder eher T_H2 gerichtete Abwehr kann für den Verlauf einer Infektion von großer Bedeutung sein. So zeigte die Infektion mit *Leishmania major* erstmals, dass Resistenz und Suszeptibilität stark von der Art der vorliegenden T_H-Zellantwort abhängig sein kann. So überleben C57BL/6 Mäuse die Infektion aufgrund einer genetisch eher T_H1 gerichteten Immunantwort, während BALB/c Mäuse, deren T-Zellantwort eher T_H2 gesteuert ist, der Infektion erliegen (Reiner und Locksley, 1995).

T_H17-Zellen exprimieren den spezifischen Transkriptionsfaktor *retinoid related orphan receptor* (ROR) γ t, produzieren IL-17, IL-21 und IL-22 und sind für die Abwehr von Pilzen, gram-positiven Bakterien und einigen Protozoen von großer Wichtigkeit (Z. Chen und O'Shea, 2008).

Zytotoxische CD8⁺ Effektor T-Zellen (engl. *cytotoxic T-lymphocytes*, CTLs) erkennen Antigene, die ihnen über MHC Klasse-I Moleküle präsentiert werden und können die inflammatorischen Zytokine IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α produzieren. CTLs sind vorrangig für die Eliminierung virusinfizierter Zellen zuständig, können aber auch gegen andere Pathogene und entartete Körperzellen, z.B im Falle von Krebs vorgehen. Sie üben ihre Zytotoxizität über Granzyme und Perforine oder über

FAS/FAS-Ligand-abhängige Apoptose induzierende Prozesse (Nagata, 1996; Russell und Ley, 2002).

1.2.1 T-Zellaktivierung

Die naive CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zelle zirkuliert nach ihrer Reifung im Thymus zwischen lymphatischem Gewebe und Blut, bis sie ihr spezifisches Antigen erkennt. Die Erkennung des Antigens erfolgt über einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR) der mit CD3 verbunden ist und einem Ko-Rezeptor, CD4 oder CD8. Naive T-Zellen können nur Antigene erkennen, die ihnen von einer professionellen APC über MHC Klasse-I oder -II Komplexe präsentiert werden. Zusätzlich zu diesem primären führt erst ein weiteres kostimulatorisches Signal, durch die Bindung des Rezeptors CD28 der T-Zelle an das Glykoprotein B7 (B7.1/B7.2 = CD80/CD86) der APC zur definitiven Aktivierung und folgenden Differenzierung der naiven T-Zelle zu einer Effektor T-Zelle. Kostimulatorische Moleküle wie CD80/CD86 und CD40 werden neben den MHC Komplexen auf aktivierten APCs exprimiert.

Ein primäres und sekundäres, kostimulatorisches Signal dienen zum Schutz vor autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie (Banchereau et al., 2000; Chambers, 2001; Janeway et al., 2002). Die zusätzliche Interaktion von CD40 auf reifen APCs mit CD40-Ligand (CD154), der auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, führt z.B. durch eine Erhöhung der kostimulatorischen Moleküle auf der APC zu einer verstärkten Aktivierung der T-Zelle (Cella et al., 1996; Grewal und Flavell, 1998).

Nach Aktivierung der T-Zelle erfolgt unter anderem die Expression der α -Kette des Interleukin (IL)-2 Rezeptors (CD25), der zusammen mit der zuvor vorhandenen γ - und β -Kette auf der T-Zelle den hochaffinen IL-2 Rezeptor ausbildet. Effektor T-Zellen können ihre Proliferation durch autokrine Produktion von IL-2 selbst beeinflussen (Nelson und Willerford, 1998; Taniguchi, 1992).

1.2.2 Zentrale und periphere Toleranz

Eine wichtige Aufgabe des Immunsystems ist es, zwischen Selbst- und nicht-Selbst-Antigenen zu unterscheiden. Im Thymus entsteht aus unreifen Vorläufer-T-Zellen ein großes Repertoire an T-Zellen mit diversen TCRs. Der Thymus stellt den Ort der Entstehung von zentraler Toleranz dar.

Die T-Zellen, deren TCRs MHC Komplexe des eigenen Organismus erkennen, werden positiv selektioniert. Zusätzlich wird die Affinität des TCRs zu Selbst-Antigenen überprüft. Besitzen die TCRs eine starke Affinität zu Selbst-Antigenen, werden sie negativ selektioniert, das heißt durch die Induktion von Apoptose deletiert, um spätere Autoimmunreaktionen durch diese autoreaktiven T-Zellen zu verhindern. Die negative Selektion im Thymus ist allerdings nicht effizient genug und so gelingt es einigen autoreaktiven T-Zellen aus dem Thymus zu entkommen und in die peripheren lymphatischen Organe auszuwandern (Jameson und Bevan, 1998). Um diese autoreaktiven T-Zellen in Schach zu halten, hat das Immunsystem weitere periphere Toleranzmechanismen entwickelt. Sie werden in intrinsische Mechanismen, wie Aktivierungs-induzierte Apoptose (engl. *activation induced cell death*, AICD), Ignoranz oder Anergie und in extrinsische Mechanismen unterteilt (Walker und Abbas, 2002).

Eine wichtige Rolle bei der peripheren Toleranz spielen neben tolerogenen DCs, vor allem die $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, die im folgenden Kapitel detailliert beschrieben werden.

1.2.3 Natürliche regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind von grundlegender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Immunantwort und Immuntoleranz. Diese spezialisierte Population ist in der Lage, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und so Autoimmunkrankheiten, Immunpathologien oder *Graft versus Host Diseases* (GVHD) zu verhindern. Des Weiteren sind Tregs in der peripheren Toleranz von großer Bedeutung, wo sie die klonale Expansion autoreaktiver Lymphozyten supprimieren (Sakaguchi, 2005; Sakaguchi und Sakaguchi, 2005; Sakaguchi et al., 2006).

Erstmals wurden T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften vor 40 Jahren beschrieben (Gershon und Kondo, 1971; Gershon et al., 1972). Damals konnten diese Zellen aufgrund von ineffizienten Methoden und mangelnden Möglichkeiten nicht überzeugend genug charakterisiert werden, was an ihrer Existenz zweifeln ließ (Janeway, 1988). Sakaguchi et al. gelang mit der Entdeckung der konstitutiven Expression von CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) auf CD4⁺ T-Zellen mit suppressivem Potential erst 1995 ein Durchbruch auf diesem Gebiet (Sakaguchi et al., 1995).

Tregs sind *in vitro* nicht in der Lage zu proliferieren, sie produzieren kein IL-2 und werden als anerg bezeichnet. Erst die Zugabe großer Mengen an IL-2 und die zusätzliche Stimulierung des TCRs führen zu einer Proliferation von Tregs. IL-2 ist für die Expansion und das Überleben von Tregs von großer Bedeutung (Scheffold et al., 2005; Takahashi et al., 1998).

Das zurzeit wichtigste Differenzierungsmerkmal von Tregs in der Maus ist Foxp3 (*Forkhead-box-protein 3*), ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor. Er gehört zur Familie der *forkhead/winged-helix* Transkriptionsfaktoren und kodiert für das Protein *Scurfin* (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). 95 % der CD4⁺CD25⁺ Tregs und ca. 4 % der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen der Maus exprimieren Foxp3 (Fontenot und Rudensky, 2005; Roncador et al., 2005). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen werden im Thymus generiert und als natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs) bezeichnet. Sie repräsentieren 5-10 % der CD4⁺ T-Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen (Read und Powrie, 2001). Eine Mutation auf dem X-Chromosom im *foxp3* Gen bei Mäusen (*scurfy*-Mausmutante) definiert sich durch die Ausbildung massiver Autoimmunerkrankungen, die bei homozygoten Mutanten innerhalb von drei Wochen postnatal zum Tode führen. Diese Mäuse besitzen keine funktionellen Tregs und zeigen eine verstärkte Proliferation der Lymphozyten sowie eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine (Clark et al., 1999). Die homologe Mutation im menschlichen Genom resultiert in dem IPEX-Syndrom (engl. *Immudysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked* Syndrom), das sich durch vielfältige Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes und Allergien äußert (Bennett et al., 2001). Dies verdeutlicht die enorme Relevanz von Foxp3⁺ Tregs in der Aufrechterhaltung der regulierenden Immunantwort und Toleranz.

Wie genau die Selektion von Tregs im Thymus erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Foxp3⁺ Tregs entwickeln sich aus einer Foxp3⁻CD4⁺ Selbst-Peptid-Thymozyte. Die Differenzierung in eine Foxp3⁺ Treg-Zelle benötigt eine relativ hohe Affinität zu Selbst-Peptid-MHC Komplexen, die Stimulation von CD28 und einen hochaffinen IL-2 Rezeptor (Josefowicz und Rudensky, 2009).

Neben Foxp3 und CD25 sind noch weitere Oberflächenmoleküle identifiziert worden, die differentiell von Tregs exprimiert werden, wie *Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein-4* (CTLA-4) (Read et al., 2000), *Lymphocyte activation gene 3* (Lag3) (Huang et al., 2004), *Programmed cell death-1* (PD-1) (Lechner et al., 2001), *Glucocorticoid-induced TNF-like Receptor* (GITR oder *tumor necrosis factor receptor superfamily 18*, TNFRSF18) (McHugh et al., 2002), Integrin $\alpha\text{E}\beta 7$ (CD103) (Lehmann et al., 2002) und Neuropilin-1 (Nrp1) (Bruder et al., 2004) sowie *G protein-coupled receptor-83* (GPR-83) (Hansen et al., 2006).

CTLA-4 ist ein CD28 Homolog mit größerer Affinität zu CD80 und CD86 auf DCs als CD28 selbst und spielt eine bedeutende Rolle in der negativen Regulation der Inflammatorischen Immunantwort. Es wird neben Tregs auch von aktivierten T-Zellen exprimiert. CTLA-4-KO (engl. *knock out*, KO)-Mäuse, sterben 2 bis 5 Wochen nach der Geburt an Multiorganversagen und extremer T-Zellproliferation. CTLA-4 ist kritisch für den suppressiven Phänotyp von Tregs (Read et al., 2000; Waterhouse et al., 1995; Wing et al., 2008).

Der E-Cadherin Ligand und Treg-Marker CD103 wird *in vitro* nach CD4⁺ T-Zellaktivierung nicht hochreguliert und definiert eine Subpopulation von CD103⁺ Tregs, die ein höheres suppressive Potential als CD103⁻ Tregs aufweisen (Lehmann et al., 2002). Lehmann et al. postulierten weiterhin auch ein suppressives Potential für CD4⁺CD25⁻CD103⁺ T-Zellen (Cepek et al., 1993; Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002).

Lag3, ein CD4 Homolog mit der Fähigkeit an MHC Klasse-II Moleküle zu binden, ist nachweislich in die Funktion von Tregs involviert (Huang et al., 2004). Kürzlich konnten Okamura et al. auch für CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die Lag3 exprimieren suppressive Eigenschaften zeigen. Lag3⁺ Tregs waren dazu fähig, in *recombination activation gene-1* (RAG-1)-defizienten Mäusen eine induzierte Kolitis effektiv zu verhindern (Okamura et al., 2009). Allerdings wird ein Großteil der bekannten Treg-

Markermoleküle auch von CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung exprimiert. So spielt Foxp3 die zentrale Rolle in der Definition einer regulatorischen T-Zelle.

Während die Expression von Foxp3 in Tregs der Maus einen gleichzeitigen Marker für suppressive Fähigkeiten dieser Zellpopulation darstellt, ist die Rolle von Foxp3 in der Entwicklung und Funktion humaner Tregs umstritten. Foxp3 wird in humanen T-Zellen nach Aktivierung hoch reguliert, ohne einen suppressiven Phänotyp in diesen Zellen zu induzieren (Zheng und Rudensky, 2007; Ziegler, 2007). Kürzlich konnte jedoch mit Garp (*glycoprotein-A repetitions predominant*) ein Oberflächenmarker auf Tregs identifiziert werden, der nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptors ausschließlich auf Tregs hochreguliert wird und maßgeblich zum suppressiven Phänotyp beiträgt (Probst-Kepper et al., 2009).

Abgesehen von natürlichen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs existiert auch ein geringer Prozentsatz natürlicher CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. Sie haben einen vergleichbaren molekularen Phänotyp und weisen ebenfalls suppressive Fähigkeiten auf (Bienvenu et al., 2005; Cosmi et al., 2003). Die vielen, verschiedenen Suppressionsmechanismen von Tregs werden in Kapitel 1.2.4.1 detaillierter erläutert.

1.2.4 Induzierte regulatorische T-Zellen

Es werden grundsätzlich zwei Hauptgruppen von Tregs beschrieben, die nTregs, die im Thymus generiert werden und die induzierten bzw. adaptiven regulatorischen T-Zellen (iTreg), die in der Peripherie unter bestimmten Bedingungen induziert werden können (Roncarolo et al., 2006; Weiner, 2001). In den letzten Jahren wurden immer mehr CD4⁺ T-Zellen mit suppressivem Potential entdeckt und als Subpopulationen von iTregs bezeichnet (Shevach, 2006).

Durch wiederholte Aktivierung von murinen und humanen, naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von IL-10, generierten Groux et al. *in vitro* eine CD4⁺ T-Zellpopulation mit suppressiven Eigenschaften. Die Applikation dieser IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen Typ 1 (Tr1) konnte *in vivo* die induzierte Kolitis durch Inhibition antigenspezifischer Immunantworten verhindern. Diese induzierten Tr1-Zellen sekretieren vorrangig große Mengen IL-10, etwas TGF- β , IL-5, wenig IL-2 und kein IL-4 (Groux et al., 1997). Die Inhibition von Effektor und Gedächtnis T-Zellen durch Tr1-Zellen erfolgt über die Sekretion der inhibitorischen Zytokine IL-10 und

etwas TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*). Zusätzlich bewirken sie eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle auf APCs und eine reduzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Tr1-Zellen können *ex vivo* und *in vivo* antigenspezifisch generiert werden (Roncarolo et al., 2006). Weiterhin produzieren Tr1-Zellen erst nach erfolgter Aktivierung IL-10 (Waldmann et al., 2006).

Des Weiteren sind mit TGF- β oder IL-10 behandelte DCs sowie tolerogene IL-10 produzierende DCs dazu fähig, naive CD4⁺ T-Zellen durch Stimulation in IL-10 produzierende Tr1-Zellen zu konvertieren (Jonuleit et al., 2000; Rutella et al., 2006). Interessanterweise wurde auch eine Induktion von Tr1-Zellen durch Pathogene, wie *Bordetella pertussis* über die Modulation von DCs durch die Sekretion von IL-10, beschrieben (McGuirk et al., 2002). Kürzlich wurde die Retinsäure-TGF- β vermittelte Induktion von Foxp3⁺ Tregs durch CD103⁺ DCs als weitere Möglichkeit der Treg Induktion identifiziert (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2009; Sun et al., 2007).

In einer weiteren Studie, führte die orale Applikation von geringen Mengen löslicher Antigene zu der Erzeugung von Toleranz, vermittelt durch die Induktion einer T-Zellgruppe mit suppressiven Eigenschaften, den T-Helfer Zellen Typ 3 (T_H3). T_H3-Zellen produzieren große Mengen an TGF- β , weniger IL-10 und IL-4 und konnten *in vivo* autoimmune Encephalitis verhindern (Y. Chen et al., 1994). Das suppressive Potential von T_H3-Zellen basiert auf dem inhibitorischen Zytokin TGF- β und inhibiert die Aktivierung von T_H2- sowie auch T_H1-Zellen (Weiner, 2001). Tr1- und T_H3-Zellen repräsentieren die zurzeit am genauesten beschriebenen Subpopulationen von iTregs. Ferner kann *in vivo* durch die chronische, orale Applikation von Antigenen ebenfalls eine Induktion an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs beobachtet werden. Apostolou und von Boehmer verabreichten in einem eleganten Experiment im Minutentakt über zwei Wochen mit Hilfe einer osmotischen Pumpe, kontrollierte Mengen von Hemagglutinin-Peptiden an TCR-transgene RAG-KO Mäuse und konnten so antigenspezifische T-Zellen in Foxp3⁺ Tregs transformieren (Apostolou und von Boehmer, 2004).

Foxp3 ist für die Entwicklung und Funktion von nTregs essentiell (Fontenot et al., 2003). Allerdings wurden auch noch andere peripher induzierte Tregs beschrieben, die trotz fehlender Foxp3 Expression, suppressives Potential besitzen. Vieira und

Kollegen konnten 2004 erstmals antigeninduzierte IL-10 produzierende T-Zellen mit suppressivem Potential zeigen, die kein Foxp3 exprimieren (Vieira et al., 2004). Weiterhin konnten Hansen et al. durch dauerhafte Antigen-Stimulation ebenfalls eine Induktion von antigenspezifischen Foxp3⁺CD25⁺ Tregs erzielen, die *in vitro* und *in vivo* regulatorisches Potential aufwiesen (Hansen et al., 2007).

1.2.4.1 Suppressionsmechanismen von Tregs

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an verschiedenen Mechanismen beschrieben, über die Tregs inflammatorische Immunantworten unterbinden. Dabei können Tregs verschiedene Stadien der Zellaktivität inhibieren (vgl. Abb. 1.1). Sojka et al. konnten zeigen, dass Tregs keinen Einfluss auf die initiale Zellaktivierungsphase haben (Sojka et al., 2005) (Abb. 1.1, **A**). Doch bereits die Proliferation dieser aktivierten Zellen kann, z.B. durch den Entzug des für die Zellvermehrung essentiellen Wachstumsfaktors IL-2 aus dem Milieu, unterbunden werden. (Thornton und Shevach, 1998) (Abb. 1.1, **B**). Die weitere Differenzierung einer CD4⁺ T-Zelle wird, durch das Verhindern der Induktion von spezifischen Transkriptionsfaktoren wie z.B. GATA-3 (T_H2-Zellen) und T-bet (T_H1-Zellen) oder durch die zeitliche Begrenzung des Zellkontaktes zwischen einer antigenbeladenen DC und deren antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen, gestört (Sarween et al., 2004; Tadokoro et al., 2006; Xu et al., 2003) (Abb. 1.1, **C**). Tregs können außerdem bestimmte Effektorfunktionen unterdrücken, wie die zytolytische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen, sowie die Sezernierung spezifischer Zytokine von CD4⁺ T-Zellen und die Antikörperproduktion von B-Zellen (Fields et al., 2005; Martin et al., 2004; Mempel et al., 2006) (Abb. 1.1, **D**) (Übersicht in Sojka et al., 2008).

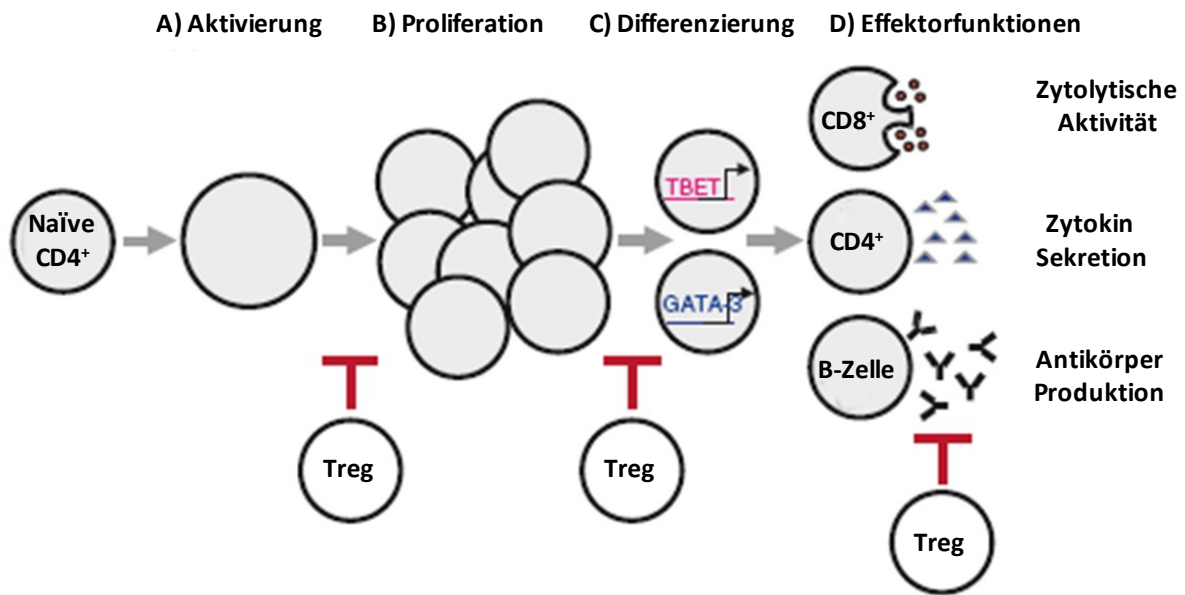


Abb. 1.1: Tregs können verschiedene Stadien der Zellaktivität inhibieren. Nähere Beschreibungen dazu im Text (A-D) (modifiziert nach Sojka et al., 2008).

Trotz intensiver Studien sind die exakten Mechanismen bei der Suppression von inflammatorischen Immunantworten *in vitro* und *in vivo* umstritten und noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden werden die regulatorischen Mechanismen genauer erläutert. Tregs können entweder Zell-Zell-kontaktabhängig oder unabhängig über die lokale Sezernierung inhibitorischer Zytokine oder die Störung des Zellmetabolismus, sowie durch Lyse der *Targetzelle* wirken. Wie bereits erwähnt haben sie auch auf DCs einen Einfluss. So können sie die Funktion von DCs verändern, indem sie z.B. ihre Reifung unterdrücken (Abb. 1.1) (Vignali et al., 2008).

Eine Zell-Zell-kontaktabhängige Suppression von Effektor T-Zellen kann über die Sekretion von Perforinen und Granzymen (Gzm) erfolgen. Sie induzieren Apoptose in der betroffenen Zielzelle. Während GzmA auf humanen Tregs exprimiert wird (Grossman et al., 2004), wurden größere Mengen GzmB auf murinen Tregs festgestellt (McHugh et al., 2002). Erstmals konnten 2005 Gondek et al. *in vitro* eine verminderte suppressive Aktivität von Tregs, isoliert aus GzmB-KO Mäusen, zeigen. Sie entdeckten dabei eine GzmB-abhängige, Perforin-unabhängige Zytolyse durch Tregs (Gondek et al., 2005). In einem Tumormodell konnte *in vivo* die GzmB- aber auch Perforin-abhängige Zytolyse gezeigt werden (Cao et al., 2007) (Abb. 1.2, B).

Neben dem bereits erwähnten Eingriff in den Zellmetabolismus von Effektorzellen durch den Treg-vermittelten Entzug von IL-2 (Thornton und Shevach, 1998), konnten Bopp et al. in Tregs große Mengen von zyklischem Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) nachweisen und postulierten eine bedeutende Funktion für cAMP in der Effektor T-Zellsuppression durch Tregs. cAMP wird intrazellulär von Tregs über *gap junctions* in die *Responder* T-Zelle transportiert und behindert dort die Zellvermehrung und IL-2 Synthese (Bopp et al., 2007).

Ein kürzlich erkannter Suppressionsmechanismus ist die Generierung von perizellulärem Adenosin über die Treg-Oberflächenmoleküle CD39 und CD73. Adenosin verhindert durch seine Bindung an den Adenosin-Rezeptor-2A ($A_{2A}R$) der Effektorzelle die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, fördert die Produktion von TGF- β und führt darüber hinaus auch zu einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007; Hershfield, 2005; Kobie et al., 2006; Zarek et al., 2008) (Abb. 1.2, **C**).

Die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β , sowie IL-35 bewirken auf unterschiedlichste Weise die Hemmung der Effektorzellvermehrung des Immunsystems (Asseman et al., 1999; Collison et al., 2007; Nakamura et al., 2001). Während die exakte Funktion von IL-35 noch nicht genau bekannt ist, kann TGF- β z.B. die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet oder die Aktivierung von Makrophagen unterdrücken und verhindert so die Entwicklung von inflammatorischen Immunantworten (Gorelik et al., 2002; Heath et al., 2000; Vignali et al., 2008) (Abb. 1.2, **A**). Wie in Kapitel 1.2.4 bereits näher erläutert, haben TGF- β und IL-10 auch in der Induktion von Tregs eine große Bedeutung. Die Rolle von IL-10 wird im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

DCs sind für die optimale Aktivierung von Effektor T-Zellen essentiell. Dieser Prozess kann von Tregs durch ihre Bindung an MHC Klasse-II und kostimulatorische Moleküle negativ beeinflusst werden. So ist Lag3 in der Lage, durch die Bindung an MHC Klasse-II Moleküle die Reifung von DCs zu verhindern (Liang et al., 2008), während CTLA-4 die kostimulatorischen Bindungsstellen CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) besetzen kann. Folglich sind diese Bindungsstellen nicht mehr für naive T-Zellen zugänglich und die Aktivierung dieser wird verhindert. Weiterhin fördert CTLA-4 durch die Bindung an CD80/CD86 auch die Produktion von Indolamin 2,3-

Dioxygenase (IDO), das die Induktion von pro-apoptischen Molekülen in Effektor T-Zellen bewirkt und somit ihre Proliferation hemmt (Fallarino et al., 2003; Mellor et al., 2004; Read et al., 2000) (Abb. 1.2, D).

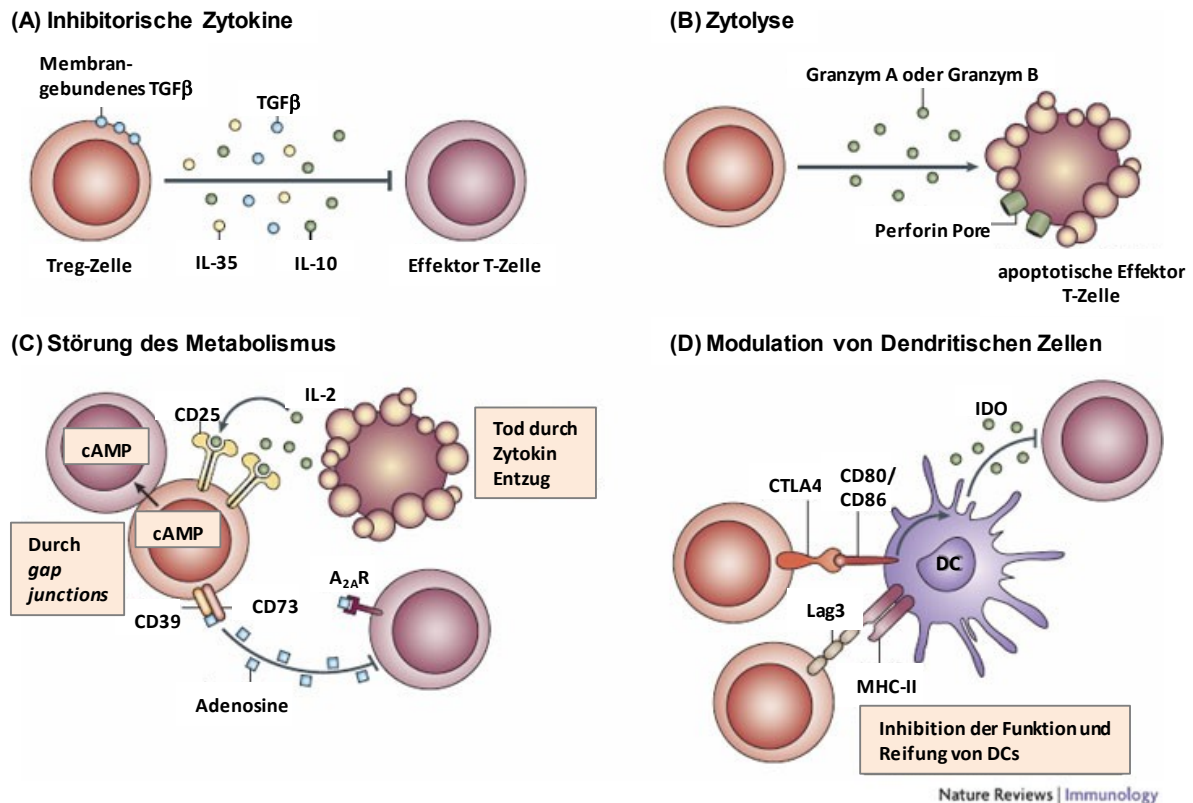


Abb. 1.2: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen. (A) Inhibitorische Zytokine, (B) Zytolyse, (C) Störung des Metabolismus (D), Modulation von DCs. Nähere Beschreibungen der Suppressionsmechanismen im Text (modifiziert nach Vignali et al., 2008).

Für ein besseres Verständnis der Treg Suppressionsmechanismen, sind vor allem *in vivo* noch intensivere Untersuchungen notwendig. Wahrscheinlich kommen je nach Ort und Sensitivität der zu unterdrückenden Zielzellen und abhängig von der Art der Entzündung, mehrere redundante Mechanismen der Suppression simultan zum Einsatz (Sojka et al., 2008).

1.2.4.1.1 Interleukin-10

IL-10 ist wie bereits erwähnt, ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin, das ursprünglich als T_H2 -typisches Zytokin beschrieben wurde (Fiorentino et al., 1989). Gegenwärtig ist jedoch bekannt, dass primär Tregs und DCs aber auch Makrophagen sowie T_H1 -, T_H3 -, Tr1-Zellen, $CD8^+$ T- und B-Zellen IL-10 produzieren

können (Kamanaka et al., 2006; Moore et al., 2001). Die inhibitorische Wirkung von IL-10 äußert sich in der reduzierten Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) und MHC Klasse-II Molekülen, sowie der verminderten Sekretion von Chemokinen und pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , TNF- α durch Monozyten und Makrophagen (Moore et al., 2001). Weiterhin unterdrückt IL-10 die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen und die Produktion der für die Bekämpfung einer Infektion wichtigen Zytokine IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4 und IL-5. Die autokrine Sekretion von IL-10 durch DCs verhindert ihre Reifung und Einwanderung in den Lymphknoten, wodurch indirekt die aktive Induktion T_H1-spezifischer Immunantworten unterbleibt (Demangel et al., 2002).

IL-10 spielt während einer Infektion eine große Rolle. Es kann die ablaufenden Entzündungsreaktionen durch die Inhibition von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen hemmen und so die vollständige Beseitigung des Pathogens verhindern, jedoch gleichzeitig das Risiko von Immunpathologien reduzieren (Couper et al., 2008a).

1.2.5 Regulatorische T-Zellen in Infektionen

Die Balance zwischen protektiver Immunität und Toleranz ist hauptsächlich von CD4⁺CD25⁺ Tregs abhängig (Sakaguchi, 2005). In den letzten Jahren wurde Tregs auch eine bedeutende Rolle im Verlauf von Infektionskrankheiten zugesprochen. Einerseits können sie Immunpathologien, verursacht durch eine exzessive Immunantwort, verhindern, andererseits sind sie auch in der Lage, wichtige krankheitsspezifische Immunantworten zu supprimieren, was in einer erhöhten Replikation und Persistenz des Erregers resultieren kann (Tab.1.1) (Belkaid, 2007).

Tab. 1.1: Positive und negative Treg-Funktionen während einer Infektion (modifiziert nach Belkaid et al., 2007).

| | Reduzierte Anzahl von Tregs ↓ | Gleichgewicht zwischen Tregs und Teff ↔ | Erhöhte Anzahl oder gesteigerter Funktion von Tregs ↑ |
|-------------------------------|----------------------------------|--|---|
| Vorteil für: -Wirt | Beseitigung des Pathogens | Aufrechterhaltung protektiver Immunität Kontrolle exzessiver Immunantworten | |
| -Pathogen | | Persistenz und/oder Übertragung | Übertragung |
| Nachteil für: -Wirt | Immunpathologien | “Bystander” Immunsuppression Persistenz des Pathogens | Verhinderung von inflammatorischen Immunantworten, Krankheitsrückfälle |
| -Pathogen | Beseitigung des Pathogens | | Zerstörung des Wirtes |

Teff = Effektor T-Zelle

So führt z.B. eine Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *Leishmania major* direkt an der Infektionsstelle zu einer Erhöhung von CD4⁺ Tregs. Dies bewirkt einerseits die Persistenz des Erregers, andererseits aber auch die Aufrechterhaltung der Immunität bei einer erneuten Infektion (Belkaid et al., 2002). Die Infektion mit *Toxoplasma gondii* kann bei Abwesenheit von IL-10 vom Wirt kontrolliert und behoben werden, jedoch stirbt der Wirt später aufgrund einer unkontrollierten Immunantwort (Gazzinelli et al., 1996). Bei HIV-Patienten konnte eine Wiedererlangung der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort durch die Depletion von CD4⁺ Tregs in mononukleären Zellen aus peripherem Blut (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) nachgewiesen werden (Weiss et al., 2004).

1.3 Malaria

Malaria ist eine lebensbedrohliche Infektionskrankheit, die durch den Parasiten *Plasmodium spec.* verursacht wird. Die Übertragung erfolgt durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke. Ursprünglich glaubte man, schlechte Gerüche und Dämpfe aus Sumpfgebieten würden die Krankheit verursachen. Daher wurde früher von Sumpffieber gesprochen. Dieser Begriff wurde im 19. Jahrhundert durch Malaria (ital. *mala aria*, schlechte Luft) abgelöst (Bruce-Chwatt, 1988). 1880 gelang Charles Louis Alphonse Laveran, während der Blutuntersuchung eines Malariapatienten die Entdeckung des Parasiten (Laveran, 1880). Ronald Ross identifizierte jedoch erst 20 Jahre später die Mücke der Gattung *Anopheles* als humanen Vektor der Malariaübertragung (Ross, 1897). Ross und Laveran erhielten für ihre grundlegenden Entdeckungen in der Malariaforschung den Nobelpreis.



Abb. 1.3: Malaria-Verbreitungskarte (Quelle: Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2010) http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG

Die Verbreitung der Malaria betrifft laut Weltgesundheitsorganisation (engl. *world health organisation*, WHO) gegenwärtig 106 Länder, vornehmlich die tropischen und subtropischen Gebiete Afrikas, Südostasiens, sowie Mittel- und Südamerika. Bis in das 20. Jahrhundert war Malaria noch in Europa, Teilen Nordamerikas und Russland verbreitet. Dort wurde sie jedoch in den 50er Jahren unter anderem durch den Einsatz des Insektizids DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethan) vollständig ausgelöscht.

Heute gelten Europa und Nordamerika ebenso wie Australien als malariafrei (Bruce-Chwatt, 1988).

In Risikogebieten erkranken allerdings immernoch über 225 Millionen Menschen pro Jahr an Malaria, von denen ca. 780.000 bis 900.000 die Infektion nicht überleben. Die meisten der globalen Todesfälle sind afrikanische Kinder unter 5 Jahren (~ 85 %) und Schwangere. 40 % der Weltbevölkerung leben in Malaria-endemischen Regionen (WHO, 2010). Damit repräsentiert Malaria aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität, neben HIV und Tuberkulose eine der tödlichsten und weitverbreitetsten Infektionskrankheiten (Stevenson und Riley, 2004). Die Malariaerkrankung stellt somit ein globales Gesundheitsproblem dar. Die zurzeit wichtigsten Präventivmaßnahmen sind Moskitonetze und Insektizide (WHO, 2010). Ein immer größer werdendes Problem bei der Bekämpfung von Malaria ist die Resistenz von Parasit und Mücke gegenüber dem Insektizid DDT und den gängigsten Malariamedikamenten, wie z.B. Chloroquine (Schlitzer, 2008). Des Weiteren ist zurzeit noch kein Impfstoff verfügbar, der effektiv vor einer Infektion schützen kann. Jedoch befindet sich gegenwärtig ein Impfstoff (RTS, S / AS01E) gegen *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) in der klinischen Phase III in Afrika (Cohen et al., 2010).

1.3.1 Humanpathogene *Plasmodien*-Stämme

Plasmodien sind einzellige, eukaryotische Parasiten, die durch den Stich einer *Anopheles*-Mücke auf Vertebraten (Reptilien, Vögel und Säugetiere) übertragen werden können.

Zurzeit sind fünf humanpathogene Parasiten der Gattung *Plasmodium* bekannt. Darunter *Plasmodium malariae* der Überträger der Malaria Quartana (mit charakteristischen rhythmischen Fieberschüben, alle 72 Stunden) der größtenteils im afrikanischen Raum verbreitet ist (White, 2009). *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) und *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) führen zur Malaria Tertiana, die sich in periodischen, alle 48 Stunden auftretenden Fieberschüben äußert (White, 2009). Diese Parasiten sind in der Lage überdauernde Leberstadien zu bilden. Diese sogenannten Hypnozoiten können noch nach vielen Jahren einen Wiederausbruch der Krankheit verursachen (Cogswell, 1992).

P. vivax ist hauptsächlich in Südamerika, Nordafrika und im asiatischen Raum verbreitet, während eine Infektion mit *P. ovale* auf Westafrika beschränkt ist.

Plasmodium knowlesi (*P. knowlesi*) wurde ursprünglich zu den Makaken infizierenden Parasiten gezählt. Allerdings werden immer häufiger, insbesondere auf Borneo und in Malaysia, Fälle humaner Malaria durch *P. knowlesi* festgestellt (Cox-Singh et al., 2008; Cox-Singh und Singh, 2008; Pain et al., 2008; White, 2009).

Während für diese vier *Plasmodien*-Subspezies ein milder Krankheitsverlauf charakteristisch ist, verursacht *P. falciparum* die heftigen Symptome der Malaria Tropica. Letzterer ist für die meisten Todesfälle verantwortlich. *P. falciparum* verursacht meistens keine zyklischen Fieberschübe, hat eine hohe Replikationsrate und kann alle Erythrozytentypen infizieren, was zu einer stark erhöhten Parasitämie führt (vgl. Tab. 1.2). Zusätzlich hat diese Unterart die Fähigkeit, infizierte Erythrozyten an die Kapillarwand der Blutgefäße zu binden, was zu mangelnder Blutzirkulation und damit zu insuffizienter Versorgung bestimmter Organe führen kann. Dies kann z.B. in einer zerebralen Malaria (engl. *cerebral malaria*, CM) resultieren, die unbehandelt in 25 bis 50 % der Fälle tödlich endet (Mackintosh et al., 2004; Miller et al., 2002; Warrell, 1989). 90 % der Malariafälle in Afrika werden durch *P. falciparum* verursacht. Auch in Haiti und Papua Neuguinea spielt besonders die Infektion mit *P. falciparum* eine übergeordnete Rolle (White, 2009).

Das Krankheitsbild der Malaria hängt zu allererst vom Gesundheitszustand des Wirts ab und definiert sich durch die meist rhythmischen, hohen Fieberschübe, Schüttelfrost sowie Kopf- und Gliederschmerzen (White, 2009). Unbehandelt kann eine Malaria zu schwerer Blutarmut, Organversagen, Lähmungserscheinungen, CM sowie zum Bewusstseinsverlust und zum Tode führen (Miller et al., 2002; White, 2009). Im Allgemeinen bevorzugt *Plasmodium* für die Sporogonie in der Mücke Temperaturen von mind. 16 °C bis 33 °C und hat eine Höhengrenze von 2000 Metern (Gillies, 1988). In Tabelle 1.1 sind diverse Charakteristika der verschiedenen Erreger dargestellt.

Tab. 1.2: Humane Malaria-Parasiten

| | <i>P. falciparum</i> | <i>P. vivax</i> | <i>P. ovale</i> | <i>P. malariae</i> | <i>P. knowlesi</i> |
|--|---|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| Exoerythrozytische-Entwicklung (Leber) (Tage) | 5.5 | 8 | 9 | 15 | 5-7 |
| Erythrozytischer Zyklus (Tage) | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| Erythrozytischer Zyklus (Tage) | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| Hypnozoiten (Rückfälle) | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein |
| Anzahl der Merozoiten pro Leber-Schizont | 30 000 | 10 000 | 15 000 | 2000 | keine Angabe |
| Erythrozyten Präferenz | Junge RBCs, kann jedoch alle infizieren | Retikulozyten | Retikulozyten | Alte RBCs | keine Angabe |

(Modifiziert aus: Tropical Diseases, White, 2009), RBCs = engl. *red blood cells*, Erythrozyten

1.3.2 Plasmodium Lebenszyklus

Plasmodien durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus mit einem notwendigen Wirtswechsel vom Moskito (Endwirt) zum Menschen (Zwischenwirt) (White, 2009). Die infizierte *Anopheles*-Mücke injiziert 8 bis 100 Sporozoiten während ihrer Blutmahlzeit in die Haut des menschlichen Wirts (Abb. 1.4, 1) (Garnham, 1988; Ponnudurai et al., 1991). Nur etwa 50 % der übertragenen Sporozoiten verlassen die Einstichstelle (Amino et al., 2006). Über Blutgefäße oder das Lymphsystem gelangen sie innerhalb von 5 bis 30 Minuten in die Leber (~70 %) oder zu den Lymphknoten (~30 %) (Sturm und Heussler, 2007). Treffen die Sporozoiten in der Leber auf eine Kupfferzelle, überqueren sie diese und anschließend einige benachbarte Hepatozyten (Frevert et al., 2005), bevor sie einen Hepatozyten infizieren (Baer et al., 2007; Mota et al., 2001). In einer parasitophoren Vakuole (PV) entwickeln sich die Sporozoiten im Hepatozyten in Leberschizonten zu mehreren tausend Merozoiten (Leber-Schizogenie) (Mota et al., 2001).

Die Leberphase (Exoerythrozytäre-Phase) kann abhängig vom *Plasmodium*-Stamm 5,5 bis 15 Tage dauern (Tab. 1.2) (Garnham, 1988). Nach Abschluss dieser Entwicklungsphase wird die PV lysiert. Dieser Vorgang induziert den Tod der Wirtszelle und die Ausbildung von Merosomen, die die Merozoiten mit Wirtszellmembran vesikulär umschließen und aus der Zelle bis ins kardiovaskuläre System zum Erythrozyten transportieren (Heussler et al., 2010; Sturm et al., 2006) (Abb. 1.4, 2).

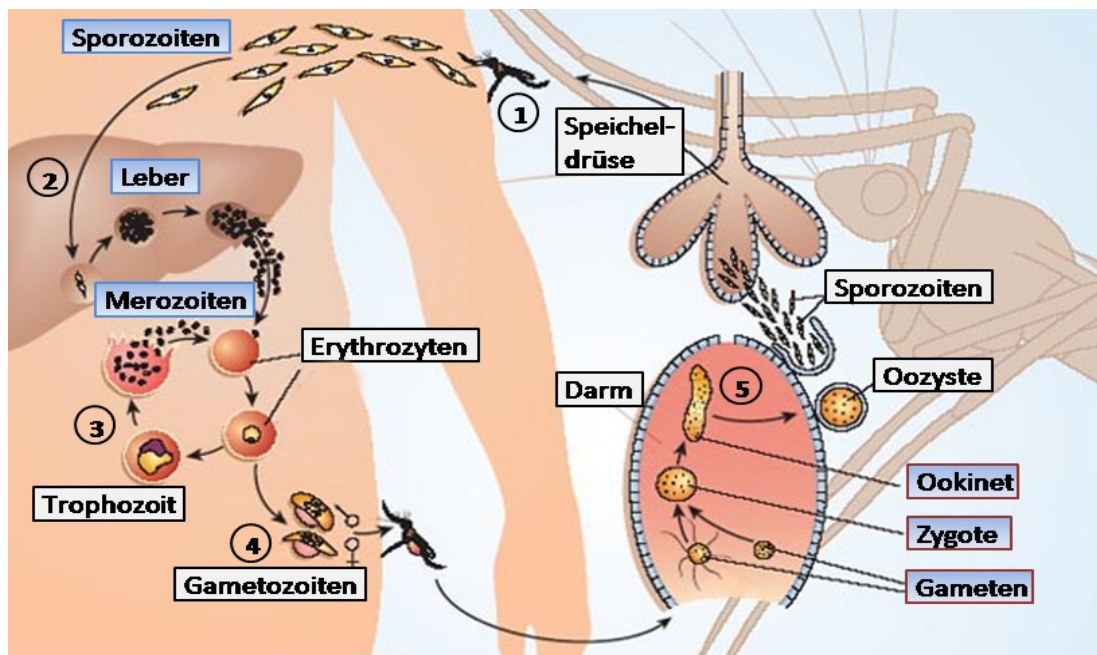


Abb. 1.4: Lebenszyklus von *Plasmodium spec.*. Modifiziert nach Robert Menard (Menard, 2005). Die einzelnen Infektionsstadien (1-5) sind im Text näher erläutert.

Während der Blutphase (Erythrozytäre-Phase) entwickeln sich die Merozoiten in einer PV über Ringstadien und Trophozoiten zu Schizonten mit wiederum 6 bis 36 Merozoiten (Simpson et al., 2002) (Abb. 1.4, 3). Durch Aufplatzen der Schizonten und des roten Blutkörperchens, gelangen die Merozoiten in den Blutkreislauf, wo sie entweder erneut Erythrozyten befallen oder sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten weiterentwickeln. Die obligat intrazellulären Reifungsprozesse der Parasiten in den Hepatozyten und Erythrozyten verlaufen asexuell. Während die Leberphase dabei symptomlos bleibt, verursacht die Blutphase der Malaria die in 1.3.1 beschriebenen Krankheitssymptome, wie z.B. die rhythmischen Fieberschübe (White, 2009) (Abb. 1.4, 4).

Die Gametozyten werden gegebenenfalls während der nächsten Blutmahlzeit durch eine *Anopheles*-Mücke aus dem menschlichen Blut aufgenommen und entwickeln sich im Mückendarm zu Gameten weiter. Im Darm der Mücke findet anschließend der sexuelle Part des Lebenszyklus statt, bei dem weibliche Makrogametozyten mit den begeißelten, männlichen Mikrogametozyten verschmelzen. Aus dieser Gametogonie geht die mobile Zygote, der Ookinete hervor. Diese reifen im Mitteldarm der Mücke zu Oozysten heran, in denen erneut Sporozoiten produziert werden (asexuell, Sporogonie) (Abb. 1.4, 5).

Die freigesetzten Sporozoiten gelangen über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen, um dort mit dem Speichel bei der nächsten Blutmahlzeit erneut auf den

menschlichen Wirt übertragen zu werden (Beier, 1998; Frischknecht et al., 2004). Der Prozess der Sporogonie kann 8 bis 35 Tage dauern (White, 2009).

1.3.2.1 Wissenschaftliche Tiermodelle der Malaria

Die beträchtlichen Infektionszahlen und der häufig schwere Verlauf einer Malaria machen den Bedarf an protektiven Impfstoffen und neuen Medikamenten deutlich. Unumgänglich ist dabei die Erforschung der Immunantwort und der Pathogenese während der Malariainfektion. Für diesen Zweck wurden Mausmodelle mit nagerpathogenen *Plasmodien*-Stämmen, wie *Plasmodium chabaudi* (*P. chabaudi*), *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) und *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*) in diversen Mausstämmen etabliert. *P. berghei* und *P. yoelii* wurden aus der Ratte *Thamnomys surdaster* und aus der weiblichen *Anopheles dureni*-Mücke in Zentralafrika isoliert (Hafalla et al., 2011; Killick-Kendrick und Peters, 1978).

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse mit BALB/c Hintergrund mit dem Nagerpathogen *P. yoelii* infiziert. Die Infektionen zeigen ein mit der humanen Malaria vergleichbares Krankheitsbild. Jedoch variieren die Art der Immunantwort, die Suszeptibilität, sowie der Krankheitsverlauf je nach *Plasmodien*- und Mausstamm. Die Infektion mit *P. yoelii 17XL non lethal* (*P.y. 17XNL*) zeigt ein sich selbst limitierendes Krankheitsbild der Malaria (~18 bis 22 Tage p.i.), welches nicht tödlich ist und in BALB/c Mäusen keine CM verursacht (Butler et al., 2010; de Souza et al., 2010; Fortin et al., 2002; Langhorne et al., 2002).

1.3.3 Die Immunantwort während der Malariainfektion

Eine effektive Immunabwehr bei einer Infektion mit *Plasmodium* ist notwendig, um die Malariainfektion zu kontrollieren und den Parasiten effizient zu bekämpfen. Dies erfordert ein enges Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort und variiert je nach Entwicklungsphase des Parasiten, sowie des infizierenden *Plasmodien*-Stamms (Stevenson und Riley, 2004). Die Abwehrmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind in der Lage, die Anzahl von infizierten Blutkörperchen zu dezimieren, die Parasitämie zu kontrollieren und schweren Krankheitsverläufen einer klinischen Malaria vorzubeugen. Jedoch kann

der Parasit in der Regel nicht vollständig eliminiert werden (Franks et al., 2001; Stevenson und Riley, 2004).

1.3.3.1 Leberphase

Malaria beginnt mit der Injektion der Sporozoiten in die Dermis des Wirtes, die umgehend zur Leber migrieren (vgl. 1.3). Bereits in dieser initialen Phase der Infektion werden Sporozoiten mit DCs, Makrophagen oder Langerhans-Zellen in der Dermis und im Lymphknoten konfrontiert (Amino et al., 2006; Hafalla et al., 2011).

DCs spielen während der Malariainfektion eine zentrale Rolle in der Prozessierung und Präsentation von aufgenommen parasitären Antigenen, sowie in der Aktivierung von naïven und Gedächtnis T-Zellen. Sie sind im angeborenen und im adaptiven Immunsystem von großer Bedeutung. Eine der ersten Reaktionen des angeborenen Immunsystems während der Malariainfektion, ist anscheinend die Aktivierung von DCs und Makrophagen (Sher et al., 2003; Stevenson und Riley, 2004).

Chakravarty und Kollegen konnten im *P. yoelii* Mausmodell zeigen, dass naïve CD8⁺ T-Zellen während der Malariainfektion bereits in den drainierenden Lymphknoten der Haut durch Cross-Präsentation der DCs von prozessierten Sporozoiten-Antigenen aktiviert werden und einen ersten Pool an aktivierten Effektor CD8⁺ T-Zellen bereitstellen. Diese aktivierten CD8⁺ T-Zellen wandern in die Leber ein und bekämpfen dort die infizierten Hepatozyten (Chakravarty et al., 2007). Die Leber gilt zwar als tolerogen, weist jedoch durchaus kompetente APCs wie hepatische DCs, Kupfferzellen und Hepatozyten auf (Crispe, 2003; Klein und Crispe, 2006; Knolle und Gerken, 2000). Ob CD8⁺ T-Zellen auch in der Leber aktiviert werden, muss noch genauer untersucht werden (Chakravarty et al., 2007).

CD8⁺ Effektor T-Zellen scheinen nach derzeitigem Kenntnisstand die Hauptakteure in der Bekämpfung des Parasiten während der Leberphase zu sein. Sie beseitigen die infizierten Hepatozyten entweder durch IFN- γ induzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion der infizierten Zielzelle oder FAS-abhängiger Apoptose sowie auch durch Perforin und Granzym gesteuerte Zelllyse (Doolan et al., 1996; Hoffman, 1996; Kagi et al., 1994; Schofield et al., 1987). Effektor und Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen, die während der Immunisierung mit bestrahlten, attenuierten *Plasmodium*-Sporozoiten induziert wurden, sind in einer Wildtyp (WT) Maus in der Lage, bei einer erneuten *Plasmodien*-Infektion die Entwicklung des Parasiten in der Leber zu unterbinden.

Dabei scheint die Unterstützung von CD4⁺ Helfer-T-Zellen für eine maximale klonale Expansion und das Überleben von antigenspezifischen Effektor und Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen unbedingt erforderlich zu sein. So beobachteten Overstreet und Kollegen in CD4-depletierten BALB/c Mäusen eine unzureichende Expansion von CD8⁺ T-Zellen nach der Immunisierung von BALB/c Mäusen mit bestrahlten, attenuierten *P. yoelii* Sporozoiten, wodurch die Parasitenlast nicht ausreichend kontrolliert werden konnte (Overstreet et al., 2011).

Weiterhin führt die Migration der Sporozoiten durch mehrere Hepatozyten entgegen früherer Vermutungen nicht primär zu einer Erhöhung der Infektionsrate (Carrolo et al., 2003; Mota et al., 2002), sondern auch zu einer weiteren Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den *myeloid differentiation gene* (MyD)88-Pfad, der über den Transkriptionsfaktor NFκB die Induktion des *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) anregt (Torgler et al., 2008). NO hat eine schädliche Wirkung auf die Entwicklung von Sporozoiten zu Merozoiten im Hepatozyten, was bereits in mehreren Experimenten gezeigt werden konnte: Es tötet den intrazellulären Parasiten ab (Nussler et al., 1993a; Nussler et al., 1993b; Seguin et al., 1994).

Indes führt die Transmigration der *P. yoelii* Sporozoiten durch Kupfferzellen unter *in vitro* Bedingungen zur Induktion von Apoptose und zu einer Desensibilisierung dieser sternförmigen Makrophagen gegenüber inflammatorischen Zytokinen. Das verschafft den invadierenden Parasiten einen Vorteil gegenüber der Phagozytose durch eben diese Fresszellen (Klotz und Frevert, 2008).

1.3.3.2 Blutphase

Die infizierten, kernlosen Erythrozyten besitzen keinen MHC-I Komplex und können so ihren intrazellulären Parasiten nicht dem Immunsystem präsentieren (Janeway et al., 2002). Durch die Erythrozytenlyse werden neben Parasitenprodukten auch toxische Stoffe, wie an *Plasmodien*-DNA gebundenes Hämozoin („Malaria-Pigment“, ein Hämoglobin-Abbauprodukt), Malaria-Glycosylphosphatidylinositol (GPI) aus der Erythrozyten-Membran und andere lösliche Produkte aus dem *Plasmodium*-Stoffwechsel freigesetzt. Diese Produkte werden vom Immunsystem über *Toll-like-receptor* (TLR)-9 (an *Plasmodien*-DNA gebundenes Hämozoin) oder TLR-2 (GPI) erkannt (Krishnegowda et al., 2005; Parroche et al., 2007; Pichyangkul et al., 2004) und führen über den MyD88-Pfad zu einer beträchtlichen Sezernierung pro-

inflammatorischer Zytokine durch z.B. Makrophagen wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und $\text{IFN-}\gamma$, die die charakteristischen Malaria-Symptome, wie z.B. Fieber auslösen (Bate et al., 1988; Miller et al., 1994).

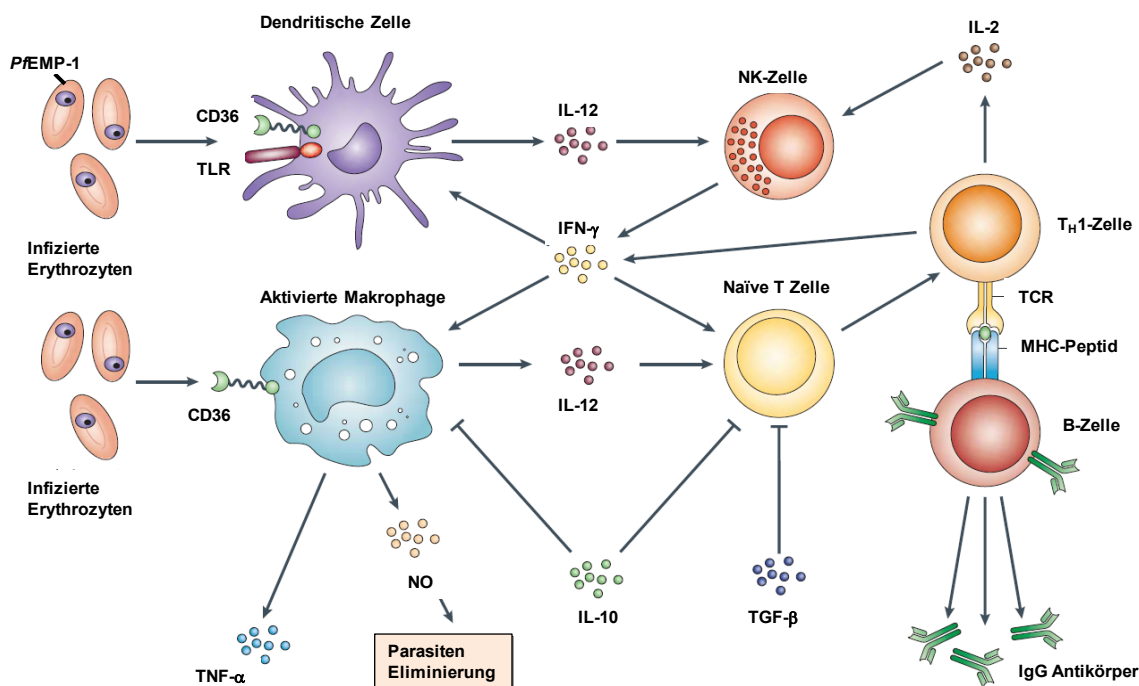


Abb. 1.3: Interaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems während der Blutphase der Malariainfektion. Diese schematische Darstellung zeigt das mögliche komplexe Zusammenspiel zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem während der Blutphase einer Malariainfektion. Makrophagen und DCs erkennen den Parasiten und Parasitenprodukte über die Interaktion von Parasitenliganden wie *PfEMP-1*, TLRs oder CD36. Nach ihrer Aktivierung bzw. Reifung, die durch $\text{IFN-}\gamma$ verstärkt wird, produzieren sie IL-12 , das wiederum NK-Zellen zur $\text{IFN-}\gamma$ Produktion anregt und zur Differenzierung von $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen führt. $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen fördern die Antikörper-Produktion von B-Zellen und sekretieren IL-2 , was zu einer weiteren Aktivierung von NK-Zellen führt, die ihrerseits weitere DCs und Makrophagen aktiviert. Makrophagen sekretieren zusätzlich Stickstoffmonoxid (NO), das die Eliminierung des Parasiten bewirkt und pro-inflammatorisches $\text{TNF-}\alpha$, das zusammen mit $\text{IFN-}\gamma$ z.B. zu einer verstärkten Expression von Adhäsions-Rezeptor-Molekülen auf Endothelzellen führt. IL-10 und $\text{TGF-}\beta$ haben dabei einen regulatorischen Einfluss auf die inflammatorische, angeborene und adaptive Immunantwort. Modifiziert nach Stevenson und Riley (Stevenson und Riley, 2004).

Die $\text{IFN-}\gamma$ Produktion durch aktivierte CD4^+ T-Zellen, führt zu einer zusätzlichen Aktivierung von Makrophagen. Letztere haben während der Infektion nicht nur eine antigenpräsentierende Funktion, sondern phagozytieren bereits infizierte Erythrozyten ohne opsonierende Antikörper. Allerdings spielen Makrophagen wahrscheinlich eine wichtigere Rolle in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems und in der Produktion von NO (Good und Doolan, 1999; Good, 2001; Stevenson und Riley, 2004). Makrophagen und DCs interagieren mit *P. falciparum* (*P.f.*) infizierten Erythrozyten vermutlich über das ausschließlich von *P. falciparum* exprimierte *P.f. encoded erythrocyte membrane Protein (PfEMP)-1* und dem auf Makrophagen, DCs und Thrombozyten exprimierten *Scavenger-Rezeptor CD36* (Serghides et al., 2003).

Untersuchungen der Blutphase im *P. chabaudi* Infektionsmodell zeigten eine entscheidende Rolle von CD4⁺ T-Zellen, IFN- γ sowie IL-12 während der initialen Blutphase und steigenden Parasitämie (Stevenson et al., 2001; Stevenson und Riley, 2004; Su und Stevenson, 2000; van der Heyde et al., 1997). IL-12 aktiviert NK-Zellen, die wiederum durch Ausschüttung von IFN- γ zusammen mit IL-12, die Differenzierung und Aktivierung von CD4⁺ T_H1-Zellen bewirken. NK-Zellen konnten als eine der ersten IFN- γ produzierenden Zellgruppen identifiziert werden (Artavanis-Tsakonas und Riley, 2002; Horowitz et al., 2010). Sie wirken zytotoxisch auf infizierte Erythrozyten und spielen scheinbar eine tragende Rolle in der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunantwort (Artavanis-Tsakonas und Riley, 2002; De Souza et al., 1997; Mohan et al., 1997).

CD4⁺ T_H1-Zellen sind nicht nur in der akuten Infektionsphase für die zelluläre Immunantwort von essentieller Bedeutung, sondern fördern in der chronischen Infektionsphase auch die Produktion von spezifischen Antikörpern. Sie beeinflussen den Antikörper *class switch* zu schützenden, opsonierenden Antikörper-Untergruppen in der akuten Infektionsphase (Su und Stevenson, 2002). Des Weiteren sezernieren sie ebenfalls IFN- γ , welches unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen führt, die infizierte Erythrozyten und freie Merozoiten phagozytieren (Good und Doolan, 1999; Good, 2001). CD4⁺ T_H2-Zellen sind wahrscheinlich eher in der chronischen Phase der Malariainfektion von Bedeutung, da sie die B-Zell Differenzierung und die damit verbundene Antikörper Entwicklung fördern (Abbas et al., 1996; Stevenson und Riley, 2004). Entscheidend für den Infektionsverlauf einer Malaria ist jedoch das Verhältnis von T_H1- und T_H2- Immunantworten und Zytokinen (Mbugi et al., 2010; Winkler et al., 1998).

Um genauer zu analysieren, ob B- und T-Zellen essentiell für die Kontrolle der Parasitämie und Eliminierung des Parasiten sind, wurden *Severe Combined Immunodeficient* (SCID)- (keine B- und T-Zellen = kein adaptives Immunsystem) und NUDE-Mäuse (keinen Thymus = keine T-Zellen) entweder mit *P. chabaudi* oder *P. yoelii non lethal* infiziert. Die infizierten Mäuse zeigten einen ähnlichen Anstieg der Parasitämie in der akuten Blutphase wie infizierte WT Mäuse, jedoch waren weder die infizierten NUDE- noch die SCID-Mäuse in der Lage die Parasitämie zu kontrollieren und starben im späteren Infektionsverlauf (Choudhury et al., 2000; Meding und Langhorne, 1991). Die Rekonstitution der mit *P. chabaudi* infizierten

SCID-Mäusen mit CD4⁺ T-Zellen schützte einen Großteil der Mäuse vor einem tödlichen Infektionsverlauf, jedoch konnten sie den Parasiten nicht vollständig eliminieren. Durch den adoptiven Transfer von CD4⁺ T-Zellen in *P. chabaudi* infizierte NUDE-Mäuse konnte jedoch die Parasitämie kontrolliert und die Infektion überwunden werden (Meding und Langhorne, 1991).

Dies zeigt deutlich, dass eine vollständige Eliminierung des Parasiten nur durch ein enges Zusammenspiel von humoraler und zellulärer Immunantwort möglich ist. T-Zellen sind wichtig, um zytotoxische und inflammatorische Funktionen zu aktivieren, sowie B-Zellen zur Antikörperproduktion anzuregen. Antikörper gegen Sporozoiten (engl. *circumsporozoite protein*, CSP) und Merozoiten (*PfEMP-x*) verhindern die Infektion der Hepatozyten bzw. der Erythrozyten. Ihre Produktion ist für die Kontrolle der Infektion und die Aufrechterhaltung der Immunität essentiell (Good und Doolan, 1999; Good, 2001; Hafalla et al., 2011).

Zusammengefasst verdeutlichen die kinetischen Analysen der *Plasmodien* Infektion die kontrollierende Aufgabe des angeborenen Immunsystems die Virulenz des infizierenden *Plasmodien*-Stamms in der Initialen Phase der Infektion zu limitieren. Dies ermöglicht die Ausbildung einer spezifischen, adaptiven Immunantwort zur vollständigen Eliminierung des Parasiten (Stevenson und Riley, 2004).

Ein großes Problem der immensen Ausschüttung inflammatorischer Zytokine ist die dadurch begünstigte Zytoadherenz von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten. Hauptsächlich TNF- α , IFN- γ und NO führen zu einer erhöhten Expression von Adhäsions-Rezeptor-Molekülen wie *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) oder *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) auf Endothelzellen der Blutgefäße oder CD36 auf Thrombozyten und Monozyten. *PfEMP-1*, ein Hauptligand für die genannten Adhäsions-Rezeptor-Moleküle, bindet in mikrovaskulären Gefäßen an die von Endothelzellen, Thrombozyten und Monozyten exprimierten Rezeptoren wie ICAM, VCAM oder CD36. Dieser Umstand führt zur erhöhten Sequestration und Verklumpung von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten, schützt den Parasiten dadurch vor der Aussondierung durch die Milz, ist für den Wirt jedoch der Grund für eine CM oder anderes Organversagen durch unzureichende Durchblutung (Miller et al., 1994; Miller et al., 2002). Schofield et al. fanden heraus, dass spezifische

Antikörper das Malaria-GPI neutralisieren, so teilweise die Entzündungskaskade und folglich immense Zytokinsekernierung inhibieren (Schofield et al., 2002).

Des Weiteren werden während der Malariainfektion auch beträchtliche Mengen anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β produziert. Ihre Aufgabe liegt in der Verminderung einer unkontrollierten Immunantwort und der Vermeidung von Immunpathologien, wie Entzündungen der Leber oder z.B. zerebraler Malaria (Stevenson und Riley, 2004).

1.3.4 Regulatorische T-Zellen während der Malariainfektion

Der Verlauf einer Malariainfektion wird maßgeblich durch die Balance zwischen protektiver Immunantwort und suppressiver Immunreaktion beeinflusst. Die Homöostase des Immunsystems ist wichtig, um den *Plasmodium*-Erreger weitestgehend zu eliminieren, jedoch gleichzeitig immunpathologische Folgen wie zerebrale Malaria zu verhindern (Belkaid, 2007). Dabei haben die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β überwiegend die Funktion, die Immunantwort zu regulieren (vgl. Kapitel 1.2.5 und Kapitel 1.3.4.1).

So zeigte eine Studie von Couper et al., einen massiven Anstieg von IL-10 während der Infektion mit *P. yoelii*. Sie identifizierten CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻CD127⁻ T-Zellen als Hauptproduzenten von IL-10. Die Infektion einer IL-10-KO Maus resultierte in einer signifikanten Reduktion der Parasitämie, zeigte jedoch auch häufigeres Vorkommen von Immunpathologien der Leber (Couper et al., 2008b). Allerdings existieren hinsichtlich der zellulären Quelle von IL-10 unterschiedliche Daten. Im Fall einer akuten *P. vivax* Infektion sekretierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs den Hauptanteil an IL-10 (Bueno et al., 2010). Wohingegen Chen et al. CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen als IL-10 Produzenten während einer Infektion von BALB/c oder DBA/2- Mäusen mit *P. yoelii lethal* beschrieben (G. Chen et al., 2009).

Eine andere Studie zeigte während der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *P. yoelii lethal* einen frühen Anstieg von TGF- β , der nach der Neutralisierung durch eine erhöhte Produktion von IL-10 komprimiert wurde und keinen positiven Einfluss auf den Infektionsverlauf zeigte. Erst die gleichzeitige Neutralisierung von TGF- β und des IL-10 Rezeptor-Signalwegs führten während der Infektion mit *P. yoelii lethal* zu

einer Erhöhung von TNF- α und IFN- γ . Damit zusammenhängend ging die Mortalitätsrate um 40 % zurück (Omer et al., 2003).

Im Mausmodell konnte eine Expansion von Tregs beobachtet werden. Die Infektionen von Mäusen mit *P. yoelii* sowie auch *P. berghei* zeigten eine transiente Erhöhung Foxp3⁺ Tregs 3 und 5 Tage nach der Infektion, abhängig vom *Plasmodium*-Stamm und Mausstamm (Hisaeda et al., 2005; Vigario et al., 2007). Außerdem beobachteten Hisaeda et al., dass eine Interaktion von *P. yoelii* 17X non lethal mit DCs über TLR-9 während der Infektion von C57BL/6 WT Mäusen zu einer Aktivierung und Expansion von Tregs führte, die die Malaria spezifische Immunantwort unterdrückten. TLR-9^{-/-} Mäuse, die mit dem *P. yoelii* 17X lethal-Stamm infiziert wurden, konnten teilweise die Infektion kontrollieren und einen tödlichen Krankheitsverlauf abwenden. Damit zusammenhängend ließ die suppressive Eigenschaft der Tregs nach, während die Anzahl von Effektor T-Zellen anstieg. Die Infektion von TLR-9^{-/-} Mäusen mit *P. yoelii* 17X non lethal wies hingegen keine Änderung in der Pathogenese auf (Hisaeda et al., 2008).

Walther und Kollegen konnten während der humanen Malaria eine Erhöhung von TGF- β , Foxp3 und CD4⁺CD25⁺ Tregs in PBMCs von *P. falciparum* infizierten Individuen feststellen, die mit einer steigenden Parasitämie korrelierte (Walther et al., 2005). Die Analyse von PBMCs aus *P. vivax* infizierten Individuen zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Expansion von Tregs und einer steigenden Parasitämie (Jangpatarapongsa et al., 2008; Walther et al., 2009). Diese Resultate weisen daraufhin, dass CD4⁺Foxp3⁺ Tregs einen großen Einfluss auf die Immunantwort und den Krankheitsverlauf einer Malariainfektion in der Maus sowie im Menschen besitzen.

In einem *P. yoelii* lethal C57BL/6 Infektionsmodell, konnte ein tödlicher Verlauf durch die Injektion von anti-CD25-Antikörper verhindert werden (Hisaeda et al., 2004). Im Gegensatz dazu, führte die Depletion der Tregs mit anti-CD25-Antikörper zwei Tage vor der Infektion von BALB/c Mäusen mit *P. berghei* zwar zu einem verzögerten Infektionsverlauf, jedoch konnten Long und Kollegen keine Änderung in der Pathogenese beobachten. Schließlich erlagen die Mäuse trotz Treg-Depletion der Malariainfektion (Long et al., 2003). Die Depletionsmethode mit anti-CD25 ist umstritten, da sie die Subpopulation von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (4 %), die kein CD25

exprimieren, nicht erfasst (Fontenot et al., 2005; Roncador et al., 2005). Außerdem werden kürzlich aktivierte Effektor T-Zellen aufgrund ihrer CD25 Expression ebenfalls depletiert. Seit kurzem existiert ein Mausmodell zur spezifischen und effizienten Depletion von Foxp3⁺ Tregs, das Dereg (engl. *DEpletion of REGulatory T-cells*) Mausmodell. Die Dereg Mäuse exprimieren eine Diphtherie-Toxin-Rezeptor-GFP (engl. *green fluorescent protein*) Kasette unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors. Durch die Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) ermöglicht dieses System eine selektive und effiziente Depletion von Foxp3⁺ Tregs und deren spezifische Detektion über GFP im Durchflusszytometer (Lahl et al., 2007).

Zusammengefasst bedarf der Einfluss von Tregs auf den Infektionsverlauf der Malaria, sowie auf die Wirkung von Medikamenten und Impfstoffen, genauer Untersuchungen. Durch welche spezifischen Mechanismen Tregs während einer Malariainfektion aktiviert, rekrutiert, expandiert oder induziert werden, muss noch intensiver analysiert werden. Das bessere Verständnis ist von essentieller Bedeutung, um das Gleichgewicht zwischen schützender Immunantwort und Immunpathologien gezielt modulieren zu können.

1.7 Zielsetzung

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Balance zwischen protektiver Immunität und Immuntoleranz beteiligt. So sind sie in der Lage, autoreaktive T-Zellen zu kontrollieren, um somit die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes oder rheumatoider Arthritis zu verhindern. Zudem spielen sie ebenfalls bei der Regulation von Immunantworten nach Transplantationen oder bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle. In den letzten Jahren wurde ihnen zusätzlich auch eine bedeutende Funktion im Verlauf von Infektionskrankheiten zugesprochen.

Während einer Malaria ist die Homöostase des Immunsystems von großer Relevanz, um einerseits die Eliminierung des Parasiten durch eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten und andererseits Immunpathologien zu verhindern, die durch exzessive unkontrollierte Immunantworten verursacht werden können.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von Tregs während der *P. yoelii*-Infektion durch funktionelle und phänotypische Analysen genauer charakterisiert werden. Durch die spezifische Treg-Depletion mit Hilfe der DEREK Maus soll der Einfluss von Tregs auf den Infektionsverlauf durch Bestimmung der Parasitämie und des Aktivierungsstatus von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen analysiert werden. Um einen tieferen Einblick in den molekularen Phänotyp von Tregs im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion zu erlangen, sollen vergleichende Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technologie durchgeführt werden, und die Expression einzelner ausgewählter Gene mit Real-Time PCR und durchflusszytometrischen Analysen verifiziert werden. Auf diesem Wege sollen Moleküle identifiziert werden, die während der Malariainfektion differentiell von Tregs exprimiert werden. Durch die spezifische Modulation der Expression eines oder mehrerer Gene, könnte die Immunantwort während einer Infektion mit *Plasmodium* so verändert werden, dass es zu einer verminderten Parasitenlast und schlussendlich zur vollständigen Beseitigung des Parasiten kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinien

2.1.1 Tierhaltung

Die verwendeten Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen unter spezifisch pathogen freien (SPF)-Bedingungen in IVC2-Käfigen (IVC = individuell ventilierte Käfige) gehalten und waren zu Versuchsbeginn mindestens 8 Wochen alt. Alle drei Monate wurden Sentinel-Mäuse einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung zum Ausschluss mikrobieller Kontaminationen durch ein externes Labor unterzogen. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte gemäß der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“.

2.1.2 BALB/c

BALB/c Mäuse wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Foxp3/eGFP

Die Foxp3/eGFP transgenen Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und unter tierärztlicher Kontrolle, in der tierexperimentellen Einheit des UK Essen, in homozygoter Form weitergezüchtet. Sie exprimieren eGFP (engl. *enhanced-green fluorescent protein*) durch Insertion in den *foxp3* Genlocus unter Kontrolle des Foxp3-Promotors (Haribhai et al., 2007).

2.1.4 DEREg

Transgene DEREg (engl. *DEpletion of REgulatory T cells*) Mäuse exprimieren eine Diphtherie-Toxin-Rezeptor-GFP Kasette unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors. Dieses System ermöglicht die selektive Depletion von Foxp3⁺ Tregs, durch die Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) (Lahl et al., 2007). Die DEREg Mäuse wurden freundlicherweise von Tim Sparwasser (Twincore Hannover) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 CD4IL10-KO

Die CD4IL10-KO (CD4cre x IL-10^{fl/fl}) Maus basiert auf dem „Cre/loxP-System“. Dieses Rekombinationssystem erlaubt das gezielte modifizieren bzw. deletieren von DNA-Sequenzen in bestimmten Zellpopulationen. Um die CD4IL10-KO Maus zu generieren, wurden CD4cre Mäuse, die aktive Cre-Rekombinase nur in CD4⁺ T-Zellen exprimieren mit IL-10^{fl/fl} Mäusen, in denen das IL-10 Gen durch zwei loxP-Stellen flankiert ist, gekreuzt. Die loxP- markierten Stellen, die im DNA-Segment des IL-10 Gens in gleicher Richtung orientiert sind, werden durch die Cre-Rekombinase erkannt und durch Verbindung der flankierten loxP-Stellen in Form eines kreisförmigen Produktes herausgeschnitten. CD4⁺ T-Zellen sind nun nicht mehr dazu fähig, funktionelles IL-10 zu produzieren (Roers et al., 2004).

2.2 Plasmodium-Stamm

Plasmodium yoelii 17X non lethal

P. yoelii Blutstabilate wurden freundlicherweise von Kai Matuschewski (Max-Planck-Institut, Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.3 Chemikalien

Tab. 2.1: Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Biobudget, Krefeld |
| Alsever's Lösung | Sigma, Taufkirchen |
| Ammoniumacetat [C ₂ H ₇ NO ₂] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid [NH ₄ Cl] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ampli Taq 10x Reaktionspuffer | Applied Biosystems, Darmstadt |
| AutoMACS Pro Washing Solution | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| AutoMACS Running Buffer | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Borsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma, Hamburg |
| Collagenase Typ D | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Diphtherie-Toxin (DT) | Merck, Darmstadt |
| Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O) | Carl Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|----------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Deoxyribonuclease (DNase) I Typ II | Sigma-Aldrich, USA |
| Dinatriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O] | Carl Roth, Karlsruhe |
| dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Fermentas, St.Leon-Rot |
| Ethanol, absolut | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fötiales Kälberserum (FCS) | PAA Laboratories, Pasching |
| Gentamycin | PAA Laboratories, Pasching |
| Giemsas Azur Eosin-Methylenblau- Lösung | Merck, Darmstadt |
| Glycerin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Go Taq Flexi 5 x Puffer | Promega, Mannheim |
| Heparin-Natrium-25000-ratiopharm© | Merckle GmbH, Blaubeuren |
| Ionomycin | Sigma, Hamburg |
| Kaliumdihydrogencarbonat [KHCO ₃] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumhydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid [KCl] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Lineares Polyacrylamid (LPA) | Ambion, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid [MgCl ₂] | Promega, Mannheim |
| MML V-RT 5x Puffer | Promega, Mannheim |
| Natriumchlorid [NaCl] | Carl Roth, Karlsruhe |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma, Hamburg |
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | Sigma, Hamburg |
| Sodium-dodecyl-sulfate (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trypan Blue Stain | Invitrogen, Karlsruhe |
| Xyclencyanol FF | Sigma, Hamburg |

2.4 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

| | |
|-------------------------|--|
| ACK-Puffer | 155 mM [NH ₄ Cl] 9,98 mM [KHCO ₃] 0,5 M EDTA pH8 pH auf 7,2 - 7,4 einstellen; sterilfiltrieren |
| DNA-Ladepuffer (6-fach) | 10 mM Tris (pH 7,5) 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xyclencyanol FF 60 % Glycerin 60 mM EDTA |

| | |
|--------------------------|--|
| FACS-Puffer | 2 % (v/v) FCS 2 mM EDTA 1 x PBS-Puffer |
| PBS/EDTA-Lösung | 1 x PBS-Puffer 50 mM EDTA |
| PBS-Puffer | 136 mM [NaCl] 2,68 mM [KCl] 8,09 mM [Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O] 1,47 mM [KH ₂ PO ₄] |
| TBE-Puffer | 89 mM Tris 89 mM Borsäure 2,53 mM EDTA |
| TE-Puffer (10/1) | 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA |
| Giemsa-Puffer | 0,49 g [KHCO ₃] 1,14 g [Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O] ad 1000 ml H ₂ O pH auf 7,2 einstellen |
| Giemsa-Färbelösung | 10 % Giemsa-Färbelösung in Giemsa-Puffer |
| IMDM-Komplettmedium | „Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“ Mit GlutaMAX™ - I und 25mM Hepes (Invitrogen, Karlsruhe) Supplementiert mit: 10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 U Penicillin 0,1 mg Streptomycin 25 µM 2-Mercaptoethanol |
| RPMI 1640-Komplettmedium | „Roswell Park Memorial Institute“-Medium Mit GlutaMAX™ -I und 25mM Hepes (Invitrogen, Karlsruhe) |

| | |
|---------------------------|---|
| Trypanblau-Lösung | 0,5 g Trypanblau 0,9 g NaCl ad 100ml H ₂ O |
| Collagenase/DNase- Lösung | 1 mg/mL Collagenase Typ D 10 µg/mL DNase I Typ II 1 x FACS-Puffer |
| Tail-Puffer | 100 mM Tris HCL (pH 8,5) 200 mM NaCl 0,2 % SDS 5 mM EDTA |

2.5 Primer

Alle Oligonukleotide stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Eurofins MWG Operon (Invitrogen, Karlsruhe). Für die cDNA-Synthese wurden Oligo (dT) Primer (0,5 µg/µl) und Random Primer (3,0 µg/µl) verwendet.

Tab. 2.2: Oligonukleotide

| Oligonukleotide | Sequenz | Annealing Temperatur (T _A) |
|----------------------|------------------------------------|--|
| RPS9 5'mm | 5'- CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC -3' | 52 °C - 58 °C |
| RPS9 3'mm | 5'- TGACGTTGGCGGATGAGCACA -3' | |
| IL-10 5'mm | 5'- CTGGACAACATACTGCTAACCGACTC -3' | 58 °C |
| IL-10 3'mm | 5'- ATTTCTGGGCCATGCTTCTCTGC -3' | |
| Klrg1 5'mm | 5'- GGAATGGGTCTGGGGAATCTTTGT -3' | 55 °C |
| Klrg1 3'mm | 5' GTGGCTATCTGCAGGGTGGGTATC -3' | |
| Penk-1 5'mm | 5'- CTCCGATGAAGAAGGCGAAAAT -3' | 58 °C |
| Penk-1 3'mm | 5'- TCTAGACCACGGGGGCAACTGTA -3' | |
| SOCS2 5'mm | 5'- TACCGGTACGATCTGGGGACTGC -3' | 55 °C |
| SOCS2 3'mm | 5'- AGGGCCTCTGGGTTCTCTTTCACA -3' | |
| Tnfrsf18 (GITR) 5'mm | 5'- GAACGCGGGGAGCAGACAGA -3' | 58 °C |
| Tnfrsf18 (GITR) 3'mm | 5'- CATAGGGCCCAATCGTAACTCACC -3' | |

2.6 Enzyme, DNA-Marker und Antikörper

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Ampli Taq Gold Polymerase | Applied Biosystems, Darmstadt |
| GoTaq Hot Start Polymerase | Promega, Mannheim |
| M-MLV Reverse Transcriptase | Promega, Mannheim |
| RNase H minus point mutant | Promega, Mannheim |
| Gene Ruler 100 bp ladder Plus | MBI-Fermentas, St. Leon-Rot |

Tab. 2.3: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Epitop (Anti-Maus-) | Fluorophor | Klon | Hersteller |
|-------------------------|-------------|--------------|-----------------------|
| α CD3e | Ungekoppelt | 145-2C11 | BD Pharmingen |
| α CD4 | APC | RM4-5 | BD Pharmingen |
| | PB | RM4-5 | BD Pharmingen |
| | FITC | GK1.5 | BD Pharmingen |
| | PE | H129.19 | BD Pharmingen |
| α CD8a | APC | 53-6.7 | BD Pharmingen |
| | PB | 53-6.7 | BD Pharmingen |
| | FITC | 53-6.7 | BD Pharmingen |
| | PE | 53-6.7 | BD Pharmingen |
| α CD11c | APC | HL3 | BD Pharmingen |
| α CD25 | APC | PC61 | BD Pharmingen |
| | PE | PC61 | BD Pharmingen |
| | FITC | 7D4 | BD Pharmingen |
| α CD45RB | Biotin | 16A | BD Pharmingen |
| α CD62L | Biotin | MEL-14 | BD Pharmingen |
| α CD69 | Biotin | H1.2F3 | BD Pharmingen |
| α CD103 | PE | M290 | BD Pharmingen |
| α CTLA-4 (CD152) | PE | UC10-4F10-11 | BD Pharmingen |
| α Lag-3 (CD223) | PE | C9B7W | BD Pharmingen |
| α PD-1 (CD297) | PE | J43 | BD Pharmingen |
| α Garp | PE | YGIC86 | eBioscience (NatuTec) |
| α Foxp3 | APC | FJK-16s | eBioscience |
| | PE | FJK-16s | eBioscience |
| | FITC | FJK-16s | eBioscience |
| α GzmB | APC | GB12 | Invitrogen |
| Streptavidin (SavPE) | PE | - | BD Pharmingen |
| α 7-AAD | - | - | eBioscience |

Tab. 2.4: Fluorochrome

| Fluorochrom | Abkürzung | Absorption (nm) | Emission (nm) |
|---------------------------|-----------|-----------------|---------------|
| Allophycocyanin | APC | 633 | 660 |
| R-Phycoerythrin | PE | 488 | 575 |
| Fluoresceinisothiocyanat | FITC | 488 | 525 |
| Pacific Blue [®] | PB | 405 | 455 |
| 7-Aminoactinomycin D | 7-AAD | 488 | 647 |

2.7 Kommerzielle Standardtests (Kits)

| | |
|--|------------------------------|
| CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| IL-10 Secretion Kit, mouse | Miltenyi, Bergisch Gladbach |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| CFSE: Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit | Invitrogen, Karlsruhe |
| Intracellular staining Set | eBioscience, San Diego , USA |
| Procarta Cytokine Assay Kit | Panomics, Fremont, USA |

2.8 Geräte

Tab. 2.5: Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|-----------------------------|
| AutoMACS (AutoMACS pro) | Miltenyi Biotec |
| Brutschrank (HERA cell 150) | Thermo Electron Corporation |
| FACS (BD LSR II) | Biosciences, Heidelberg |
| FACS (BD ARIA II) | Biosciences, Heidelberg |
| GelDoc Station | Intas |
| Gellaufkammer | Whatman |
| Mikroskop (Axiovert 40 C) | Zeiss |
| PowerSupply | BioRad |
| Real-Time PCR-System (7500 Fast Real-Time PCR System) | Applied Biosystems |
| Sicherheitswerkbank Klasse II (MSC-Advantage) | Thermo scientific |
| Sterilbank (DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR) | Biosan |
| Thermocycler (T3000 Thermocycler) | Biometra |
| Thermoblock (Thermomixer comfort) | Eppendorf |
| Vortexer (MS3 basic) | Ika |

| | |
|---|-------------------|
| Waage (CP2202S) | Sartorius |
| Sicherheitswerkbank Klasse II (Biowizard Golden Liner) | Kojair® |
| Zentrifuge (MULTIFUGE 3SR+) | Thermo scientific |
| Zentrifuge (Centrifuge 5417R) | Eppendorf |

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Genotypisierung transgener Mauslinien

Zur Identifizierung von Foxp3/eGFP, DEREK und CD4IL10-KO transgener Mäuse, wurden PCR-Amplifikationen genomischer DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Dafür wurden Schwanzbiopsien von absetzreifen (neugeborenen, mindestens vier Wochen alten) Mäusen, mindestens drei Stunden in 90 µl Tail-Puffer und 10 µl Proteinase K bei 56 °C im Thermomixer, schüttelnd verdaut, 5 Minuten bei 95 °C hitzeinaktiviert, 5 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert und anschließend 1:50 verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde 1 µl für die PCR (s. Tab. 2.7) verwendet. In Tabelle 2.6 sind die Transgen-spezifischen Primerpaare aufgeführt.

Tab. 2.6: Oligonukleotidprimerpaare zur Genotypisierung transgener Mäuse

| Transgen | Primer | Annealing Temperatur (T _A) |
|---------------------------|--|--|
| Foxp3/eGFP | 5'- GCGTAAGCAGGGCAATAGAGG -3' 5'- GCATGAGGTCAAGGGTGATG -3' | 58 °C |
| DEREG 1 | 5'- GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA -3' 5'- GGGTGTCTGCTGGTAGTGGTCGG -3' | 60 °C |
| DEREG 2 | 5'- CCCAGGTTACCATGGAGAGA -3' 5'- GAACTTCAGGGTCAGCTTGC -3' | 60 °C |
| IL10 ^{flox/flox} | 5'- CCAGCATAGAGAGCTTGCATTACA -3' 5'- GAGTCGGTTAGCAGTATGTTGTCCAG -3' | 60 °C |
| CD4cre | 5'- ACGACCAAGTGACAGCAATG -3' 5'- CTCGACCAGTTTAGTTACCC -3' | 60 °C |

Der Standardreaktionsansatz für die PCR-Reaktion besteht aus:

- 1 µl genomische DNA (1:50 aus xy-Verdau)
- 1 x Reaktionspuffer
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP Mix (2,5 mM jedes Nukleotid)
- 5 µM Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
- 5 µM Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
- 0,5 U GoTaq Hot Start Polymerase
- ad 20 µl H₂O steril

Anschließend wurde folgendes PCR-Amplifikationsprogramm im Thermocycler durchgeführt:

Tab. 2.7: PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mauslinien.

| | 10 Zyklen | | | | 27 Zyklen | | |
|---------------------|-----------|------|----------------|------|-----------|----------------|------|
| Temperatur °C | 95.0 | 95.0 | T _A | 72.0 | 95.0 | T _A | 72.0 |
| Zeit (Min:Sekunden) | 10:00 | 0:30 | 1:30 | 1:30 | 0:15 | 0:45 | 0:45 |

2.9.2 Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene

Zur Analyse der Expression von RPS9, IL-10, Klrp1, Penk-1, SOCS2 und Tnfrsf18 (GITR), wurde die Gesamt-RNA von 1×10^6 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen oder 1×10^6 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen, aus entweder *P. yoelii* infizierten oder nicht infizierten Mäusen, unter Verwendung des RNeasyMiniKits[®] (Qiagen) nach Herstellerangaben, isoliert. Diese wurde anschließend in cDNA revers transkribiert und die Genexpression mittels semiquantitativer PCR und darauffolgend durch eine quantitative Real-Time PCR untersucht.

2.9.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasyMiniKit[®]

Das Prinzip dieses Reaktionsansatzes basiert auf der selektiven Bindung von RNA, mit Hilfe eines Salz-Puffer Gemisches, an die aus einer Silikamembran bestehenden Säule unter Hochsalzbedingungen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Qiagen. Die Gesamt-RNA wurde mit 100 µl RNase

freiem H₂O eluiert. Die anschließende Ethanolfällung erfolgte durch die Zugabe von 1 µl Lineares Polyacrylamid (LPA), 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat [C₂H₇NO₂] und 2,5 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei -80 °C. Darauffolgend wurden die Proben 30 Minuten bei 20800 x g und 4 °C zentrifugiert und mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde Luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge DEPC-H₂O aufgenommen.

2.9.2.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene erfordert die Reverse Transkription der generierten RNA-Proben in cDNA (*complementary DNA*). Für die Initiation der cDNA Synthese, wurden jeweils 1 µg RNA mit einem Primer-Mix aus Oligo(dT)- und Random Hexamer-Primern, für 10 min auf 70 °C im Thermocycler erhitzt. Nach der Anlagerung der Primer wurden die Proben bis zur Zugabe des Mastermixes, der die für diese Reaktion erforderlichen Reverse Transkriptase enthält, auf Eis gestellt. Standardreaktionsansatz für die Primerhybridisierung:

| | |
|----------|-----------------------|
| 1 µg | RNA |
| 0,25 µg | Oligo(dT)-Primer |
| 1,5 µg | Random Hexamer Primer |
| ad 14 µl | H ₂ O |

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler für 60 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde eine weitere enzymatische Reaktion, durch die Inkubation für 5 Minuten bei 90 °C, unterbunden. Für die Reverse Transkription wurden folgende Reagenzien zum Reaktionsansatz gegeben:

| | |
|---------------|--|
| 4 µl (1 x) | 5 x M-MLV-Reverse Transkriptase-Puffer |
| 1 µl (2,5 mM) | 10 mM dNTP-Mix |
| 1 µl (200 U) | M-MLV Reverse Transkriptase |

Nach Beendigung der Reversen Transkription, wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.2.3 Semiquantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Die Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht den Nachweis und die Anreicherung kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR beruht auf der Amplifikation von DNA-Abschnitten, spezifiziert durch zwei Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C. Die komplementären Oligonukleotid-Primer lagern sich bei der entsprechenden Annealing Temperatur (T_A) an die einzelsträngige DNA an. Während der folgenden Elongation knüpft eine DNA-abhängige, hitzestabile DNA-Polymerase freie Nukleotide an die 3'-Enden der Primer an und synthetisiert die komplementäre DNA-Sequenz. Durch die Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, kann die spezifische, zu untersuchende DNA-Sequenz in 30 Zyklen, ausreichend vervielfältigt werden, wodurch nach der Agarosegelelektrophorese eine semiquantitative Aussage über die Expression von RPS9, IL-10, Klrg1, Penk-1, SOCS2 oder Tnfrsf18 (GITR) getroffen werden kann.

Tab. 2.8: Programm der semiquantitativen PCR

| | | | | | |
|---------------------|-------|-----------|-------|------|-------|
| | | 30 Zyklen | | | |
| Temperatur °C | 94.0 | 94.0 | T_A | 72.0 | 72.0 |
| Zeit (Min:Sekunden) | 10:00 | 0:45 | 0:45 | 1:00 | 10:00 |

2.9.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein Trennverfahren für DNA dar, bei dem die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld in Abhängigkeit der Molekülgröße unterschiedlich schnell in Richtung Anode durch eine Gelmatrix wandern. Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die dadurch bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Durch Vergleich mit der Mobilität von Marker-DNA aus Molekülen bekannter Größe kann die Größe von DNA-Fragmenten abgeschätzt werden. Die verwendeten Gele hatten eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in TBE-Puffer. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst,

anschließend mit 0,5 µg/ml Ehtidiumbromid versetzt und zur Polymerisation in eine Gelkammer gefüllt. TBE-Puffer diente gleichzeitig als Laufpuffer. Vor dem Auftragen in die Taschen wurden die Proben mit 6 x Ladepuffer versetzt. Ein 100 bp Standard-DNA-Marker wurde als Längenstandard zur Bestimmung der Fragmentgrößen benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-150 V. Die DNA wurde unter UV-Licht in einer Geldokumentationskammer visualisiert und photographisch festgehalten.

2.9.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht die genaue Quantifizierung spezifischer DNA-Templates, durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe. Sie beruht auf dem Prinzip der semiquantitativen PCR. Die mit der Amplifikation eines spezifischen DNA-Templates im Reaktionsansatz verbundene Zunahme der DNA-Fragmente führt zu einer erhöhten Anzahl interkalierender Fluoreszenzfarbstoffmoleküle und nimmt exponentiell zu. Diese Fluoreszenzsignale werden nach jedem Amplifikationszyklus gemessen und nach Beendigung der Real-Time PCR gegen die Anzahl der durchgeführten Amplifikationszyklen aufgetragen. Der CT-Wert (engl. *cycle threshold*, Fluoreszenzschwellenwert) stellt sicher, dass die Quantifizierung in der Phase des exponentiellen Wachstums erfolgt.

Die zu analysierenden cDNA Proben wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green versetzt. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der zu analysierenden cDNAs erstellt, aus der sich durch den gemessenen CT-Wert in den Ausgangsproben, die relativen Template-Konzentrationen bestimmen ließen. Die Normalisierung der Messergebnisse auf eine Standardtemplatemenge erfolgte durch die gleichzeitige Analyse des *housekeeping* Gens RPS9. Der Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time PCR-Reaktion:

| | |
|-----------|---|
| ~20 ng | cDNA-Template |
| 1 x | Power SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas) |
| 50-900 nM | Vorwärtsprimer |
| 50-900 nM | Rückwärtsprimer |
| ad 20 µl | H ₂ O steril |

Die Fluoreszenzsignale während der Amplifikation wurden mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System gemessen und anschließend mit der SDS 1.4 „7500 Fast Real-Time Software“ analysiert. Das PCR-Programm ist in Tab. 2. angegeben.

Tab. 2.9: Programm der quantitativen Real-Time PCR

| | | | | |
|---------------------|-------|-----------|----------------|------|
| | | 40 Zyklen | | |
| Temperatur °C | 94.0 | 94.0 | T _A | 72.0 |
| Zeit (Min:Sekunden) | 10:00 | 0:15 | 1:00 | 1:00 |

2.9.2.6 Genexpressionsanalysen

Das Genexpressionsprofil von am FACS (engl. *fluorescence activated cell sorter*) Aria II durchflusszytometrisch sortierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/eGFP⁺ Tregs, isoliert aus naiven nicht infizierten Foxp3/eGFP BALB/c Mäusen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/eGFP⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP BALB/c Mäusen 3 und 5 Tage nach der Infektion (engl. *post infection*, p.i.) wurde unter Verwendung von Microarrays (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) analysiert (Kooperation mit Dr. Robert Geffers, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig). Die Extraktion der RNA erfolgte aus den Proben entsprechend des Protokolls „*RNeasy animal cells*“ (Qiagen, Hilden).

Zum Verdau kontaminierender DNA, wurden die Proben mit DNase behandelt. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) elektrophoretisch ermittelt. Die Umschreibung von RNA in cDNA und darauffolgend von cDNA in Cy3-markierte cRNA erfolgte nach dem Protokoll des „*Quick Amp Labeling Kit, one-color*“ Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration der cRNA und die Markierung durch Cy3 wurde mittels Nanodrop (PEQLAB, Erlangen) bestimmt. Anschließend wurden von jeder Probe 1,6 µg Cy3-markierter cRNA auf den Genchip „*G4122F whole mouse genom microarray 4 x 44 K 60mer*“ 16 Stunden bei 65 °C hybridisiert (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Nach der Hybridisierung und dem Waschen, erfolgte das Scannen des Genchips auf dem „*DNA Microarray Scanner*“ mit „*Surescan high Resolution*“ gemäß der Herstellerangaben (Agilent Waldbronn, Deutschland). Die Signalintensitäten wurden mit der „*Feature Extraction Software 10.5*“ unter Berücksichtigung der empfohlenen Einstellungen durch den Hersteller (GE1_105_Dec08, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) analysiert und mit der „*Genespring Software GX 10*“ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) ausgewertet.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Zur Durchführung von Experimenten und Analysen, erfolgte zuvor die Herstellung von Lymphozytensuspensionen aus verschiedenen Mausorganen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationsschritte in einer Zellkulturzentrifuge (Multifuge 3SR+, Thermo Scientific, Langenselbold) für 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden am Ende einer Isolierung in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer oder Medium aufgenommen.

2.10.1.1 Milz

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus Milzen wurden diese präpariert und in einer Petrischale mit 10 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer) und einer Kanülenspritze ausgespült. Die Zellen wurden für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert und anschließend gezählt.

2.10.1.2 Mesenterische Lymphknoten

Zur Herstellung einer Lymphozytensuspension aus den Mesenterischen Lymphknoten (MLN), wurden diese nach der Präparation in einer Petrischale durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) gedrückt und vereinzelt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert und anschließend gezählt.

2.10.1.3 Blut

Zur Überprüfung der Depletion von Foxp3⁺ Tregs durch DT, wurden Lymphozyten aus dem Blut isoliert und entsprechend analysiert. Um die Lymphozyten aus dem Blut zu gewinnen, wurde dieses retroorbital mit einer Heparin beschichteten, 3 mm Glaskapillare entnommen. Das Blut wurde in einem Heparin beschichteten 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gestellt. Danach wurde das gewonnene Blut mit ACK-Puffer versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10

min bei 6000 x g zentrifugiert (Zentrifuge, Centrifuge 5417R, Eppendorf). Das Pellet wurde mit FACS-Puffer gewaschen, erneut für 10 min bei 6000 x g zentrifugiert und abschließend in einem entsprechendem Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

2.10.2 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der, durch Antikörper markierten Zellen am FACS LSR II (BD, Heidelberg), oder zur Zellsortierung am FACS ARIA II (BD, Heidelberg) werden diese in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare angesaugt und an einem Laser einzeln vorbeigeführt. Das Licht des Lasers wird dadurch gebrochen bzw. gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) ist das Licht, das durch die Zellen in einem geringen Winkel von 3-10° gestreut wird und proportional zur relativen Größe der Zellen ist. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) ist das Licht, welches von den Zellen im 90° Winkel reflektiert wird und mit der Granularität und Membranfaltung der Zelle korreliert.

Die dabei freigesetzte Emission, wird von Detektoren gemessen und vom System in elektrische Signale umgewandelt. Diese Signale werden von einem Computer aufgenommen und als Punkte dargestellt. Einzelne Populationen eines Zellgemisches können so anhand der Größe und Granularität der Zellen sowie Art und Menge der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe identifiziert und charakterisiert werden.

2.10.2.1 Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse

2.10.2.1.1 Oberflächenfärbung

Die für die Oberflächenmoleküle spezifischen Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder mit Biotin konjugiert. Diese Biotin-konjugierten Antikörper werden in einem zweiten Färbeschritt durch einen an Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für die Charakterisierung der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten gefärbt. Dafür wurden mindestens 5×10^5 Zellen 5 Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand ausgeschlagen, die sedimentierten Zellen durch Vortexen gelockert und mit 100 µl in FACS-Puffer verdünntem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper (vgl. Tab. 2.) 10 Minuten bei 4 °C, im

Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand ausgeschlagen und die Zellen mit 200 µl FACS- Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl FACS- Puffer resuspendiert. Die FACS-Analyse und Auswertung erfolgte am LSR II (BD Bioscience, Heidelberg) mit Hilfe der DIVA-Software (BD Bioscience, Heidelberg).

2.10.2.1.2 Intrazelluläre Färbung

Die Intrazelluläre Färbung erfolgte im Anschluss an die Oberflächenfärbung. Die Zellen wurden zwei Mal mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Fix/Perm (eBioscience) für 2 Stunden (Foxp3 und CTLA-4) bzw. 30 Minuten (GzmB) bei 4°C, im Dunkeln inkubiert. Die permeabilisierten Zellen wurden dann zwei Mal mit 100 µl 1 x Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und für 30 Minuten mit Foxp3, CTLA4 oder GzmB im Dunkeln gefärbt. Nach dem abschließenden Waschen der Zellen mit 100 µl Permeabilisierungspuffer wurden diese für die durchflusszytometrische Analyse am LSR II in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.10.2.2 Sortieren von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Während bei der FACS-Analyse am LSR II (BD Bioscience, Heidelberg) nur die Charakterisierung eines Zellgemisches erfolgt und die Zellen nach Charakterisierung verworfen werden, können die durch entsprechende Antikörper markierten Zellpopulationen im FACS ARIA II-Zellsortierer (BD Bioscience, Heidelberg) unter Verwendung der DIVA Software separiert, in Medium sortiert und anschließend für weitere Analysen verwendet werden.

2.10.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung adäquat verdünnt und in die Zählkammer gefüllt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der in tote Zellen eindringt, so dass diese unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Die Plasmamembran lebender Zellen ist für den Farbstoff undurchlässig. So ist eine Diskriminierung von lebenden und toten Zellen möglich. Die Anzahl der lebenden Zellen (n) in einem Großquadrat, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem

Faktor 10^4 (Volumenrechnungsfaktor für 1 mm^3) ergibt die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Multipliziert man diese mit dem Kulturvolumen, so erhält man die Gesamtzellzahl.

2.10.2.4 Isolierung von CD4^+ T-Zellen

Zur Isolierung von murinen CD4^+ T-Zellen wurde das murine „*CD4⁺ T Cell Isolation Kit*“ (Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden zuvor isolierte Lymphozyten aus der Milz oder dem MLN mit einem Cocktail aus biotinylierten Antikörpern (anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-DX5 und anti-Ter-119) für 10 Minuten inkubiert, um Granulozyten, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen, Erythrozyten sowie CD8^+ und CD25^+ T-Zellen mit Biotin zu markieren. Im nächsten Inkubationsschritt wurden die biotinylierten Zellen 15 Minuten mit einem anti-Biotin-Antikörper inkubiert, der an *MicroBeads* gekoppelt ist und somit paramagnetische Eigenschaften aufweist. Anschließend erfolgte das Waschen der Zellsuspension mit ausreichend ($\sim 10 \text{ ml}$) FACS- Puffer. Nachdem die Zellsuspension für 10 Minuten bei $300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert wurde, wurde das Pellet in $500 \text{ }\mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert. Die negative Depletion der CD4^+ T-Zellen erfolgte durch das Anlegen eines Magnetfeldes, durch welches die an *MicroBeads* gebundenen Zellen an der aus Stahlwolle bestehenden Säule festgehalten wurden, während die unmarkierten CD4^+ T-Zellen ausgewaschen wurden. Die magnetische Separation wurde am AutoMACS (Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt.

2.10.2.5 Isolierung von Dendritischen Zellen

Für die Isolierung von CD11c^+ Dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) aus der Milz wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und mit einer Collagenase/DNase Lösung für 45 bis 60 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ verdaut. Anschließend wurden die DCs in einem Zellsieb mit der Porengröße $100 \text{ }\mu\text{m}$ mechanisch vereinzelt und mit FACS-Puffer gewaschen. Die CD11c^+ Zellen der vorliegenden Zellsuspension wurden unter Anwendung von „*CD11c (N418) MicroBeads*“ gemäß den Angaben des Herstellers über positive Selektion am AutoMACS isoliert (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

2.10.2.6 Isolierung von IL-10 sezernierenden T-Zellen

Zur Isolierung von IL-10⁺ T-Zellen, wurde das „Mouse IL-10 Secretion Kit“ (Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Das Prinzip des IL-10 Sekretions-Kits beruht auf der Bindung eines IL-10 spezifischen „Catch Reagenz“ an die Oberfläche von zuvor stimulierten Leukozyten. Während einer Inkubationsphase der Zellen im Brutschrank bei 37 °C, werden die Zytokine (hier: IL-10) nach außen sekretiert und das „Catch Reagenz“ bindet IL-10 an die Zelle. Ein IL-10 spezifischer Antikörper (Anti IL-10 monoklonaler Antikörper IgG1, konjugiert mit PE) markiert anschließend diese Zellen, an dessen Konstrukt wiederum „Anti-PE *MicroBeads*“ binden, welche die Zellen magnetisch markieren (s. Abb. 2.1.).

Die magnetisch markierten IL-10-positiven Zellen werden darauffolgend mit Hilfe des AutoMACS sortiert. Die an „Anti-PE *MicroBeads*“ gebundenen IL-10⁺ Zellen werden an der Säule festgehalten, während die unmarkierten, IL-10-negativen Zellen ausgewaschen werden. Es erfolgt eine positive Selektion der IL-10 produzierenden Zellen.

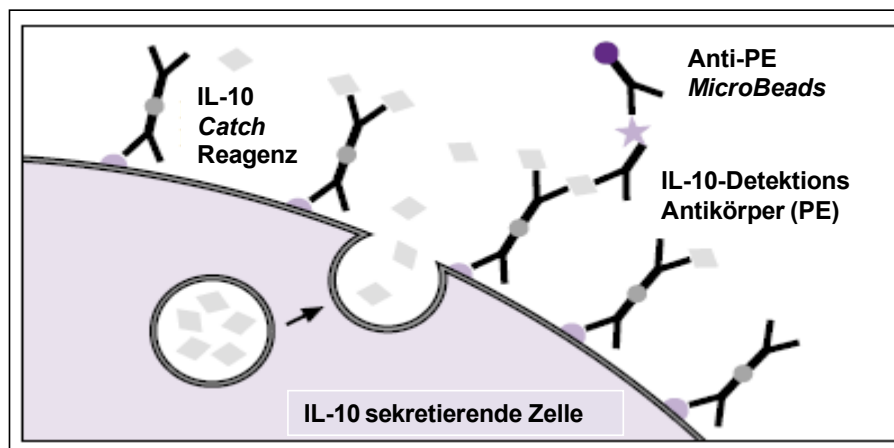


Abb. 2.1: Prinzip des „Mouse IL-10 Secretion Kit“
(Modifiziert nach: *Cytokine Secretion Assay*, Miltenyi Biotec)

In dieser Arbeit wurden die Milzen von *P. yoelii* infizierten BALB/c Mäusen (Tag 7 p.i.) präpariert und die Lymphozyten isoliert. Nach der Einzelzellgewinnung, erfolgte die Zellsortierung von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen. Diese wurden anschließend in einer 24-Loch-Platte mit 2 x 10⁶ Zellen/Loch in 1 ml IMDM Komplettmedium ausgesät und durch Zugabe von PMA (0,01 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml), für 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert.

Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen in 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 80 µl

kalttem IMDM-Medium resuspendiert und die Zellsuspension nach Zugabe von 20 μl des IL-10 spezifischen „Catch Reagenz“ für 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 37 °C warmen IMDM Medium aufgefüllt. Die Sekretionsphase von IL-10 produzierenden Zellen erfolgte für 45 Minuten bei 37 °C unter langsamer Rotation. Darauf folgend wurden die Zellen zum Abstoppen der Sekretion kurz auf Eis gestellt, zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen, in 80 μl FACS-Puffer resuspendiert und mit 20 μl des „Maus IL-10 Detektions Antikörper (PE)“ gefärbt.

Die Zellen wurden für die Zellanalysen nicht wie vom Hersteller angegeben mit „Anti-PE *MicroBeads*“ markiert und durch das AutoMACS separiert. Stattdessen wurden die Zellen für eine höhere Reinheit der distinkten Populationen durchflusszytometrisch am FACS ARIA II, basierend auf der PE Fluoreszenz, sortiert. Die sortierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet.

2.10.2.7 CFSE-Markierung von Lymphozyten

Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) dringt passiv in das Zellinnere ein und bindet dort irreversibel an Zellproteine. Um die Proliferationsrate von T-Zellen bestimmen zu können, wurden die Zellen CFSE markiert. Die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen halbiert sich in proliferierenden Zellen bei jeder Teilung. Die Proliferationsrate kann über die Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Der gesamte Ablauf der CFSE-Markierung wurde abgedunkelt durchgeführt, da CFSE besonders lichtempfindlich ist. Die sortierten $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen wurden in 4 ml IMDM ohne Zusätze aufgenommen und mit 2,5 μM CFSE für 8 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 ml FCS, und ein erneuter Inkubationsschritt (5 Minuten, 37 °C, dunkel). Die Zellen wurden in einem abschließenden Schritt mit PBS-Puffer verdünnt, zentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen IMDM-Komplettmedium aufgenommen.

2.10.2.8 Proliferationstest

Zur Analyse der Proliferation von T-Zellen *in vitro*, wurden sortierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ (Foxp3^-) T-Zellen aus mit *P. yoelii* infizierten und nicht infizierten WT BALB/c- oder aus mit *P. yoelii* infizierten und nicht infizierten CD4IL10-KO Mäusen CFSE gefärbt und mit einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte in 200 μl IMDM-Komplettmedium in Gegenwart von 5×10^4 CD11c^+ DCs ausgesät. Die

ausgesäten T-Zellen wurden mit α CD3 (löslich, 1 μ g/ml) für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Als Kontrolle dienten nicht stimulierte CFSE-markierte CD4⁺CD25⁻ (Foxp3⁻) T-Zellen aus entweder infizierten oder nicht infizierten WT BALB/c- oder CD4IL10-KO Mäusen. Die Proliferation von CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻(Foxp3⁻) T-Zellen wurde über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer bestimmt.

2.10.2.9 Inhibitionstest

Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität *in vitro* von sortierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ oder sortierten CD4⁺CD25⁺ Tregs isoliert aus *P. yoelii* infizierten oder nicht infizierten WT BALB/c oder CD4IL10-KO Mäusen wurden diese mit 2 x 10⁵ sortierten, CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ bzw. CD4⁺CD25⁻ *Responder* T-Zellen im Verhältnis 1:1 in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 μ l IMDM-Komplettmedium in Gegenwart von 5 x 10⁴ CD11c⁺ DCs und α CD3 (löslich, 1 μ g/ml) kokultiviert. Nach 48 Stunden Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank, wurde die Proliferation der *Responder* T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen. Anhand des Inhibitionstests sollte überprüft werden, welchen Einfluss CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ T-Zellen, isoliert aus mit *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (7 Tage p.i.) auf die Proliferation von CFSE-gefärbten CD4⁺CD25⁻ *Responder* T-Zellen, isoliert aus naiven BALB/c Mäusen haben. Dafür wurden 1 x 10⁵ CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ T-Zellen mit 1 x 10⁵ CFSE-gefärbten CD4⁺CD25⁻ *Responder* T-Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten in 200 μ l IMDM-Komplettmedium in Gegenwart von 2,5 x 10⁴ DCs CD11c⁺ DCs und α CD3 (löslich, 1 μ g/ml) kokultiviert. Nach 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank, wurde die Proliferation der *Responder* T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen.

2.10.2.10 Bestimmung von sezernierten Zytokinen

Zur Bestimmung sezernierter Zytokine wurden die Zellkulturüberstände nach 72 bzw. 48 Stunden des Proliferationstests oder des Inhibitionstest abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Für die Quantifizierung von sezerniertem IFN γ , IL-2, IL-10, IL-4, IL-17, und TNF α wurde das „*Procarta Cytokine Assay Kit*“

(Panomics, Fremont, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messungen wurden am Luminex200 durchgeführt. Die Konzentration der Zytokine wurde mit der Luminex IS Software bestimmt (Luminex Corporation, Austin, USA).

2.11 Tierexperimentelle Methoden

2.11.1 Injektion von Diphtherie-Toxin zur Depletion von Foxp3⁺ Tregs

Um Foxp3⁺ Tregs zu depletieren, wurde *P. yoelii* infizierten WT-BALB/c und *P. yoelii* infizierten DEREK Mäusen jeden zweiten Tag 30 ng/g Körpergewicht DT intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das Diphtherie-Toxin (Merck) wurde nach Herstellerangaben in PBS gelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Anteils an Foxp3/eGFP⁺ T-Zellen, wurde alternierend zur DT Verabreichung Blut mit Hilfe einer Kapillare aus dem Auge der Maus entnommen, die Lymphozyten isoliert, für die Antigene CD4⁺ und CD25⁺ gefärbt und die Foxp3/eGFP Expression durchflusszytometrisch am LSR II überprüft.

2.11.2 Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie einer *P. yoelii* infizierten Maus, wurde dieser ein Blutropfen entnommen und mit Hilfe eines Objektträgers auf einem anderen Objektträger ausgestrichen, so dass ein *Monolayer* an Erythrozyten vorlag. Der luftgetrocknete Ausstrich wurde in Methanol fixiert, 30 bis 60 min in einer Färbeküvette mit Giemsa-Färbelösung gefärbt, mit Giemsa-Puffer abgespült und luftgetrocknet. Die Blutausrich wurden unter dem Mikroskop Axiovert 40 C (Zeiss) bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl und einem Okular mit integriertem Netzmikrometer (10 x 10 mm) ausgewertet. Gezählt wurden zunächst die Erythrozyten eines Netzmikrometerfeldes, welche dann mit der Gesamtzahl der gezählten Sichtfelder (n) multipliziert wurden. Es wurde ein Bereich auf dem Objektträger ausgewählt, in dem die Erythrozyten ungefähr in gleicher Dichte vorlagen. Die Parasitämie (in %) wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Gesamtzahl der Parasiten (aus n Sichtfeldern)}}{\text{Gesamtzahl der Erythrozyten in einem Sichtfeld} \times n \times 100}$$

$$\text{Gesamtzahl der Erythrozyten in einem Sichtfeld} \times n \times 100$$

2.11.3 Herstellung von *P. yoelii*-Blutstabilaten

Zur Herstellung von Blutstabilaten aus einer infizierten Maus muss die Parasitämie zwischen 1 bis 10 % liegen. Um das Blut aus der infizierten Maus zu gewinnen, wurde diese getötet und das Herz mit einer heparinisierten Spritze punktiert. Das Blut der infizierten Maus wurde mit Alsever's-Solution 1:3 (100 µl Blut + 200 µl Alsever's-Solution) gemischt, in Kryoröhrchen gefüllt und im Stickstofftank gelagert. Die Blutstabilate wurden zur Lagerung der Blutstadien von *P. yoelii* oder zur erneuten i.p. Infektion von naiven Mäusen verwendet.

2.11.4 Infektion von Mäusen mit *P. yoelii*

Um eine Maus mit einer genauen Anzahl an Parasiten (P) infizieren zu können, wurde zuerst ein Blutstabilat drei bis vier Tage zuvor durch eine naive BALB/c Maus transferiert. Die Parasitämie dieser Maus muss zwischen 0,1 % bis 1 % liegen, um mehrfach infizierte Erythrozyten zu vermeiden. Für die *P. yoelii*-Infektion in dieser Arbeit, wurden 1×10^5 infizierte Erythrozyten eingesetzt. Das benötigte Blutvolumen ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$7 \times 10^6 \text{ (Erythrozyten/}\mu\text{l Blut einer Maus)} \times \text{Parasitämie (in \%)} \times 10^{-2} \text{ P/}\mu\text{l}$$

Beispielrechnung bei einer Parasitämie von 0,75 %:

$$7 \times 10^6 \times 0,75 \times 10^{-2} \text{ P/}\mu\text{l} = 52.500 \text{ P/}\mu\text{l}$$

Herstellung der 1. Verdünnung = 100 µl Blut + 900 µl RPMI-Medium

$$5250 \text{ P} = 1 \mu\text{l}$$

$$100\,000 \text{ P} = x$$

$$x = 19,05 \mu\text{l (aus 1. Verdünnung)}$$

Es werden nach dieser Beispielrechnung pro Maus 19,05 µl verdünntes, infiziertes Blut benötigt, um diese mit 1×10^5 Parasiten zu infizieren. Das Injektionsvolumen wurde mit RPMI-Medium auf 200 µl aufgefüllt und der zu infizierenden Maus intravenös (i.v.) injiziert.

2.12 Statistik

Alle angegebenen Statistiken wurden mit den angegebene statistischen Tests und der Graph Pad Prism 5.0 Software analysiert (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant) (Graph Pad Software, La Jolla).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der T-Zellantwort während der Infektion mit *P. yoelii*

Für die Charakterisierung der T-Zellantwort und den allgemeinen Verlauf der *Plasmodium*-Infektion wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Wildtyp (WT) BALB/c Mäuse mit 1×10^5 *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*)-infizierten Erythrozyten (engl. *infected red blood cells*, iRBC) infiziert. Die *P. yoelii*-Infektion von BALB/c Mäusen ließ sich zwischen Tag zwei und drei nach der Infektion (engl. *post infection*, p.i.) durch die Giemsa-Färbung mikroskopisch diagnostizieren (Abb. 4.1, A). Der Infektionsverlauf ist dabei dadurch gekennzeichnet, dass die Parasitämie im Durchschnitt zwischen 3 und 12 Tagen p.i. exponentiell ansteigt und im weiteren Infektionsverlauf (14 bis 18 Tage p.i.) wieder abfällt. Im Blutausstrich der zuvor infizierten Mäuse konnten nach 18 bis 22 Tagen p.i. keine iRBCs mehr nachgewiesen werden. Die Parasitämie war auf 0 % gesunken (Abb. 4.1, B).

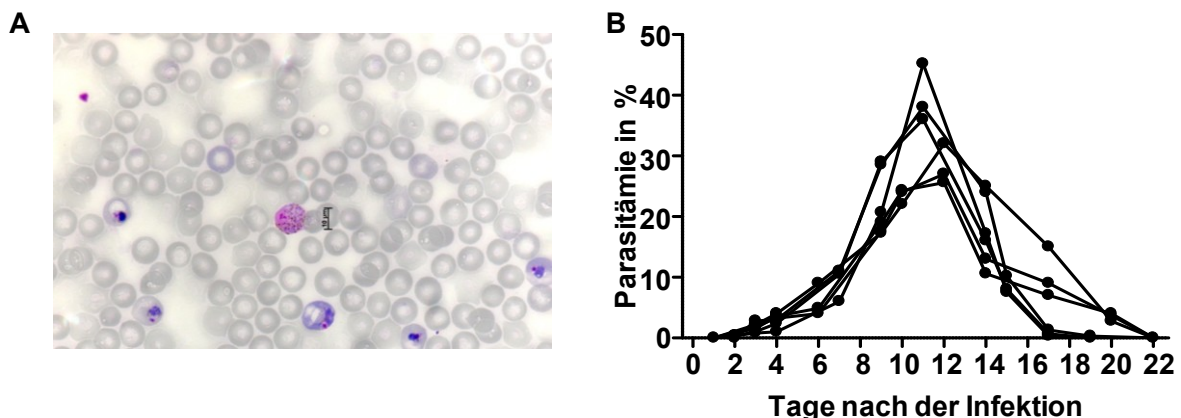


Abb. 4.1: Verlauf der Parasitämie nach Infektion mit *P. yoelii*. An Tag 3, 5, 7, 10 bis Tag 22 nach der Infektion von Wildtyp (WT) BALB/c Mäusen mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs wurde aus der Schwanzvene der infizierten Maus ein Tropfen Blut entnommen, auf einem Objektträger ein *Monolayer* von Erythrozyten aufgetragen und darauffolgend eine Giemsa-Färbung durchgeführt (A). Die Parasitämie wurde unter dem Lichtmikroskop mittels 100 x Okular und Immersionsöl bestimmt und ist in % infizierter Erythrozyten dargestellt (B) (n = 6).

An Tag 3, 5, 7, 10 und 14 p.i. wurden die Milzen entnommen und im Hinblick auf den lymphozytären Phänotyp analysiert. Der schematische Versuchsablauf ist in Abbildung 4.2 dargestellt

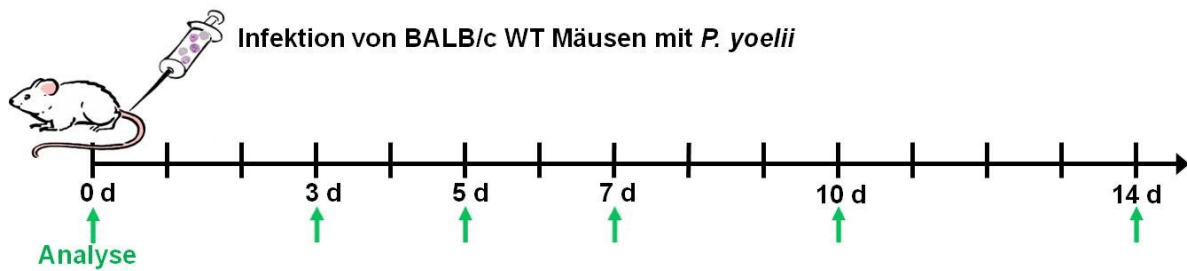


Abb. 4.2: Schematische Darstellung für die Infektion und Analyse von *P. yoelii* infizierten Mäusen. Für die Infektion von WT BALB/c Mäusen mit *P. yoelii* wurden 1×10^5 *P. yoelii*-infizierte Erythrozyten an Tag (engl. *day*, d) 0 intravenös (i.v.) injiziert. An Tag 3, 5, 7, 10, und 14 erfolgte die Analyse der infizierten Mäuse.

Nach Entnahme der Milzen von nicht infizierten (0 d) und infizierten WT BALB/c Mäusen, wurden die Lymphozyten isoliert und die Gesamtzellzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Lymphozytenfärbung für die Analyse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl.

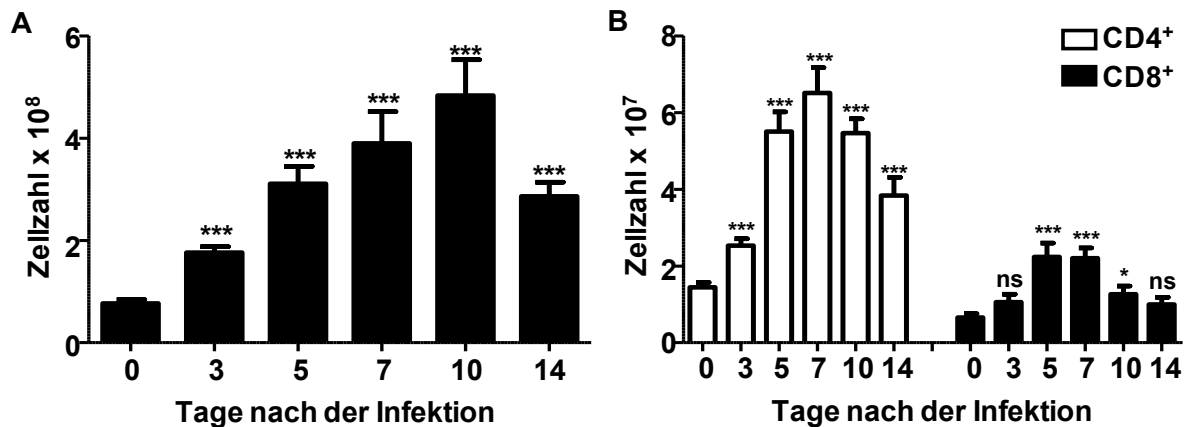


Abb. 4.3: Verlauf der *P. yoelii*-Infektion in BALB/c Mäusen. An Tag 3, 5, 7, 10, und 14 nach der Infektion wurden die Milzen aus BALB/c WT Mäusen, entweder infiziert mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs oder nicht infiziert (0 d), entnommen, die Lymphozyten isoliert und die absolute Anzahl an Milzzellen mikroskopisch bestimmt (A). Nach durchflusszytometrischer Analyse des prozentualen Anteils CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, erfolgte die Zellzahlbestimmung dieser Zellen (B). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus zwei bis fünf Experimenten mit jeweils drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test im Vergleich zum nicht infizierten WT (0 d) durchgeführt (***p < 0,001; *p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion zeigte einen kontinuierlichen Anstieg von Tag 3 bis Tag 10 p.i. (Abb. 4.3, A). Nach 14 Tagen p.i. sank die Gesamtzellzahl wieder leicht ab. Unter den Milzzellen konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten bestimmt werden, die bis Tag 7 p.i. anstieg und an Tag 10 p.i. wieder erniedrigt vorlag (Abb. 4.3, B). Allerdings konnte auch 14 Tage p.i. bei der Gesamtzellzahl sowie der CD4⁺ und CD8⁺ Zellzahl

im Vergleich zur Kontrolle, den nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (0 d), noch eine Erhöhung gemessen werden.

Um den Einfluss der *P. yoelii*-Infektion auf den Phänotyp von T-Zellen zu untersuchen, wurden Lymphozyten 3, 5, 7, 10 und 14 Tage p.i. aus infizierten und nicht infizierten BALB/c Mäusen isoliert und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer CD25, CD45RB und CD62L Expression durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse zusammengefasst und graphisch dargestellt.

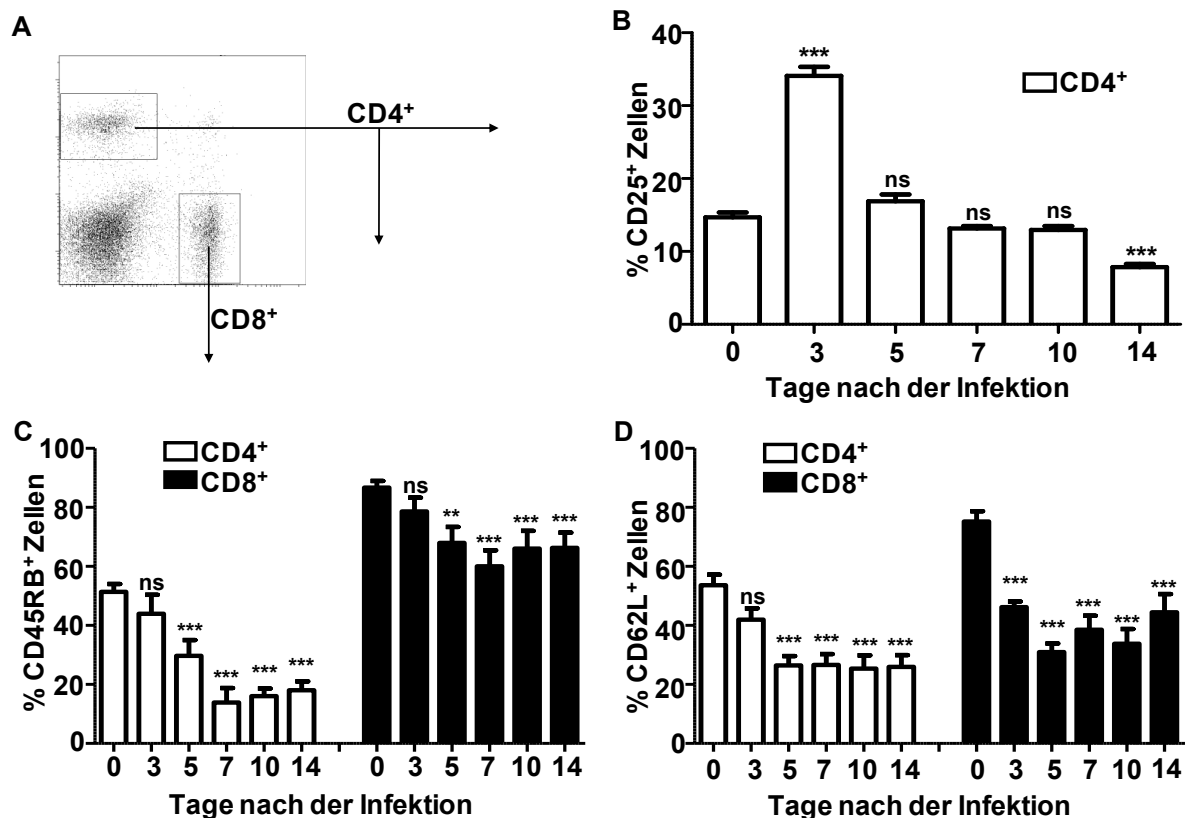


Abb. 4.4: Aktivierter Phänotyp von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach der Infektion mit *P. yoelii*. Nicht infizierte und mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infizierte WT BALB/c Mäuse wurden an Tag 3, 5, 7, 10 und 14 p.i. getötet und die Milzen entnommen. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert, mit Fluoreszenz markierten Antikörpern gegen CD4 oder CD8 und CD25 (B), CD45RB (C) oder CD62L (D) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist in A ein repräsentativer dot plot der CD4 und CD8 Expressionsanalyse und in B, C und D die Zusammenfassung der Ergebnisse aus zwei bis fünf Experimenten mit jeweils drei Mäusen als Mittelwert mit Standardfehler. Statistische Analysen wurden mittels t-Test im Vergleich zum nicht infizierten WT (d 0) durchgeführt (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; ns = nicht signifikant).

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Lymphozyten, isoliert aus *P. yoelii* infizierten Mäusen, zeigten einen aktivierten Phänotyp nach der Infektion. CD25 repräsentiert einen frühen Aktivierungsmarker und wird nach Erkennung des Antigens erhöht auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Dadurch wird die Proliferation dieser T-Zellen, durch die Bildung

des IL-2 Rezeptors ermöglicht. Drei Tage p.i. lag die CD25 Expression deutlich erhöht vor, die jedoch nach fünf bis sieben Tagen p.i. wieder auf das CD25 Expressionsniveau der CD4⁺ T-Zellen aus nicht infizierten BALB/c Kontrolltieren absank (Abb. 4.4, B). CD62L (L-Selektin) ist auf naïven T-Zellen exprimiert und ist für ihre Wegfindung zu den entsprechenden Lymphknoten von Bedeutung. Nach Kontakt mit einem Antigen ist die zuvor CD62L⁺ T-Zelle aktiviert und reguliert L-Selektin herunter (Arbones et al., 1994; Jung et al., 1988). CD45RB ist ein Aktivierungsmarker und wird nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen ebenfalls runterreguliert (Trowbridge und Thomas, 1994).

Bereits an Tag drei nach der Infektion konnte eine Verminderung des prozentualen Anteils an CD45RB⁺CD4⁺ und CD62L⁺CD4⁺ sowie CD45RB⁺CD8⁺ und CD62L⁺CD8⁺ T-Zellen gemessen werden, der zwischen Tag fünf und sieben sein niedrigstes Niveau erreichte und bis zum Messende (14 d, p.i.) nicht mehr angestiegen ist (Abb. 4.4, C und D).

Da es sich bei CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nicht ausschließlich um aktivierte T-Zellen handelt, sondern CD25 auch ein Markermolekül für regulatorische T-Zellen darstellt, wurde anschließend der prozentuale Anteil sowie die Absolutzellzahl an CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) während der Infektion mit *P. yoelii* untersucht. Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Foxp3 (engl. *forkhead-box-protein 3*) gehört zur Familie der *forkhead/winged-helix* Transkriptionsfaktoren und kodiert für das Protein Scurfin (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Foxp3 wird spezifisch in CD4⁺ Tregs exprimiert und ist somit zur Identifizierung von Tregs geeignet.

Für diese Untersuchungen wurden Foxp3/eGFP Mäuse mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infiziert, nach 3, 5, 7, 10 und 14 Tagen die Milz entnommen und die Lymphozyten isoliert. Foxp3/eGFP *knock-in* Mäuse exprimieren das *enhanced-green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors, wodurch es möglich ist, die Foxp3⁺ Tregs anhand der eGFP Expression zu identifizieren und zu quantifizieren.

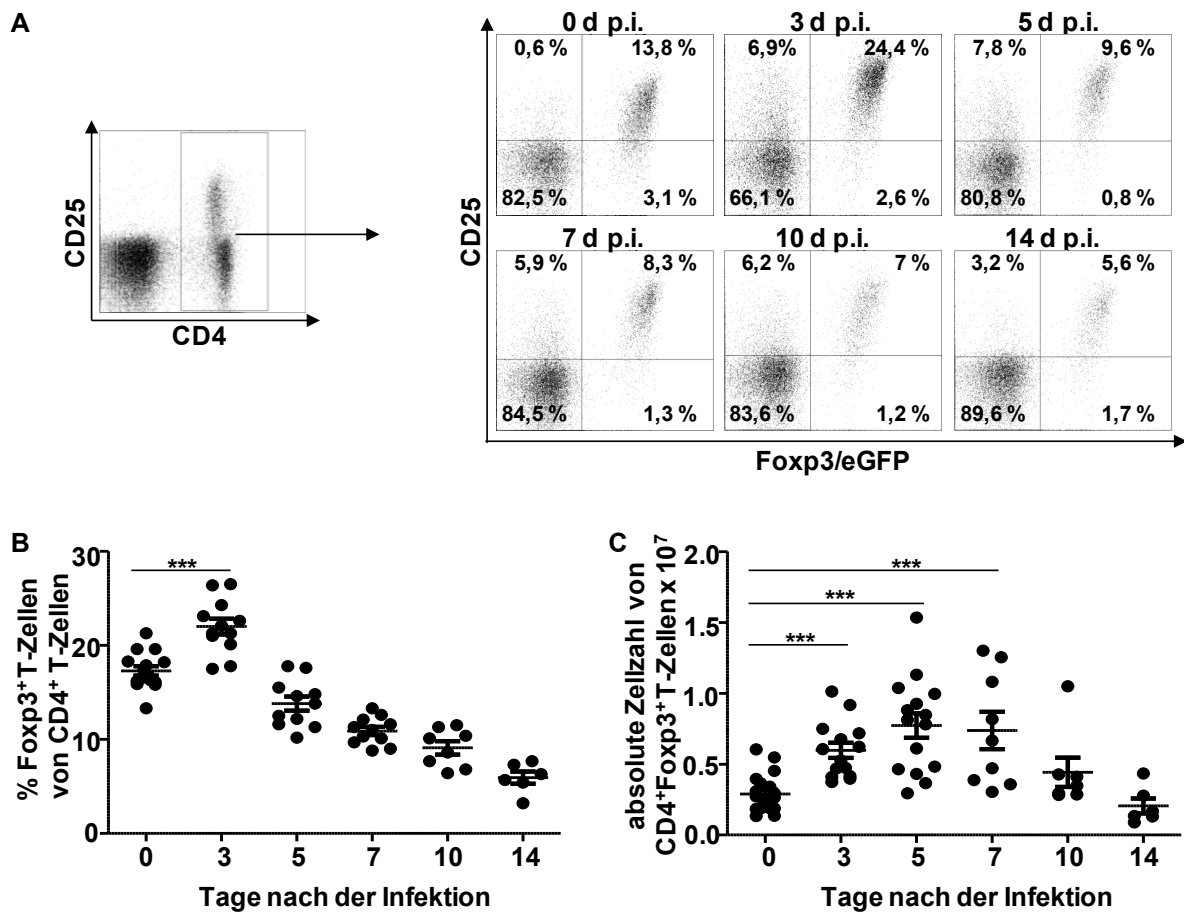


Abb. 4.5: Expansion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs nach der Infektion mit *P. yoelii*. Foxp3/eGFP *knock-in* Mäuse wurden mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infiziert, 3, 5, 7, 10 und 14 Tage p.i. die Lymphozyten aus der Milz isoliert und hinsichtlich ihrer Foxp3 (eGFP) Expression durchflusszytometrisch analysiert (A). Dargestellt sind die *dot plots* der Foxp3 und CD25 Expression in der CD4⁺ T-Zellpopulation an Tag 3 und 5 p.i. aus einem von bis zu vier unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil Foxp3⁺ Tregs in der CD4⁺ T-Zellpopulation (B) sowie die absolute Zellzahl von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (C) p.i. und stellen eine Zusammenfassung aus zwei bis vier Experimenten mit jeweils drei Mäusen dar. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (***) $p < 0,001$.

Der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺ Tregs stieg 3 Tage nach der Infektion im Vergleich zu nicht infizierten WT Mäusen signifikant an, sank im weiteren Infektionsverlauf jedoch bis unter das Niveau der nicht infizierten Kontrolltiere ab (Abb. 4.5, A und B). Bei der Bestimmung der absoluten Zellzahl von Foxp3⁺ Tregs in der CD4⁺ T-Zellpopulation (Abb. 4.5, C) konnte nicht nur 3 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion, sondern auch, vergleichbar mit dem kinetischen Verlauf der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.3, B), nach 5 bis 10 Tagen p.i. eine Erhöhung von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs beobachtet werden.

Um herauszufinden, ob diese Tregs während der *P. yoelii*-Infektion ein ähnliches immunsuppressives Potential besitzen, wie Tregs aus nicht infizierten Wildtyp Mäusen, wurden BALB/c Mäuse infiziert und die Tregs nach 7 Tagen p.i. hinsichtlich

ihrer inhibitorischen Fähigkeit in einem *in vitro* Inhibitionstest analysiert. Dafür wurden durchflusszytometrisch sortierte CD4⁺CD25⁺ Tregs aus entweder *P. yoelii* infizierten (7 Tage p.i.) oder nicht infizierten BALB/c Mäusen zusammen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus nicht infizierten WT Mäusen in Anwesenheit von CD11c⁺ Dendritischen Zellen (DCs) und αCD3 für 48 Stunden im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Die Proliferationsrate wurde über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes bestimmt, der mit jeder Zellteilung in äquivalenten Mengen an die Tochterpopulation weitergegeben wird und somit immer weniger stark fluoresziert.

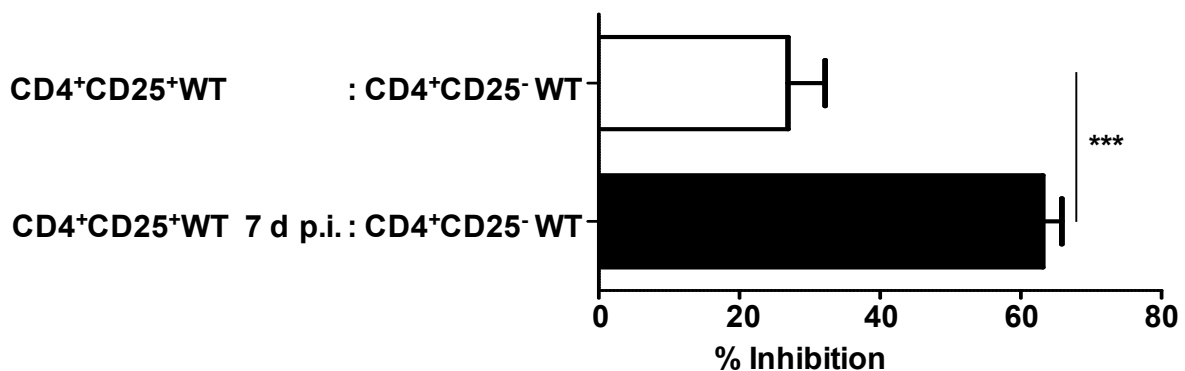


Abb. 4.6: Erhöhte suppressive Fähigkeit von CD4⁺CD25⁺ Tregs nach der Infektion mit *P. yoelii*. CD4⁺CD25⁺ nTreg Zellen aus *P. yoelii* infizierten oder nicht infizierten BALB/c Mäusen wurden im Verhältnis 1:1 zusammen mit CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ Responder T-Zellen und in Anwesenheit von CD11c⁺ Dendritischen Zellen (DCs) mit αCD3 für 48 Stunden kostimuliert. Die Proliferationsrate der CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ Responder T-Zellen wurde durchflusszytometrisch über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes gemessen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Die Abnahme der Proliferation der Responder T-Zellen in den Kokultur-Experimenten, wurde dabei zur Proliferation der Responder T-Zellen allein (= 100 %) ins Verhältnis gesetzt. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,01).

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, waren CD4⁺CD25⁺ Tregs aus naiven, nicht infizierten sowie aus *P. yoelii* infizierten Mäusen funktionell und konnten die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen inhibieren. CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten Mäusen wiesen jedoch eine signifikant höhere suppressive Fähigkeit (62 % Inhibition) auf, als CD4⁺CD25⁺ Tregs aus nicht infizierten WT Mäusen (33 % Inhibition).

Zusammengefasst führt die Infektion von BALB/c Mäusen mit *P. yoelii* zu einer Erhöhung der Zellzahl in der Milz sowie zu einem aktivierten Phänotyp von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Des Weiteren kommt es während der Infektion mit *P. yoelii* zu einer Expansion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, die ein verstärktes suppressives Potential im Vergleich zu CD4⁺Foxp3⁺ Tregs aus nicht infizierten BALB/c Mäusen aufweisen.

4.2 Depletion Foxp3⁺ Tregs während der *P. yoelii*-Infektion

Wie bereits erwähnt, sind Tregs in der Lage krankheitsspezifische Immunantworten zu unterdrücken. In Ergebnisteil 4.1. konnte eine Expansion von Foxp3⁺ Tregs und eine verstärkte suppressive Fähigkeit dieser nach der Infektion mit *P. yoelii* gezeigt werden. Welchen Einfluss dies auf den Infektionsverlauf hat, sollte mit Hilfe der DEREK Maus analysiert werden. Transgene DEREK Mäuse exprimieren einen Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors. Durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) ist es möglich, Foxp3⁺ Tregs effizient zu depletieren. Für diese Untersuchung wurden transgene DEREK Mäuse mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infiziert und Foxp3⁺ Tregs, an Tag 0 sowie an Tag 2, 4 und 6 durch die Injektion von DT, depletiert. Die Analyse von infizierten DEREK Mäusen erfolgte 7 Tage nach der Infektion von DT behandelten und unbehandelten Kontrolltieren.

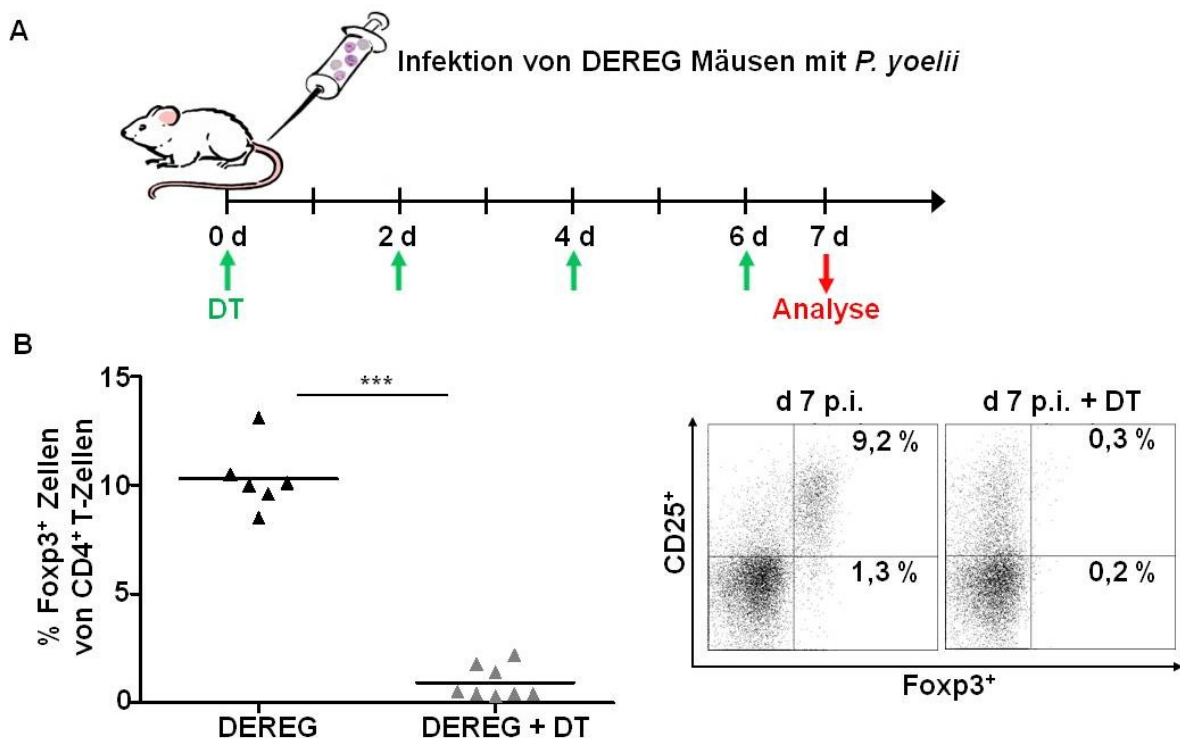


Abb. 4.7: Effiziente Depletion von Foxp3⁺ Tregs in DEREK Mäusen durch die Injektion von DT. Versuchsdurchführung der *P. yoelii*-Infektion und DT-Injektion. DEREK Mäuse wurden mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs an Tag 0 (0 d) infiziert. Die DT-Injektion erfolgte am Tag der *P. yoelii*-Infektion sowie 2 d, 4 d und 6 d p.i.. Als Kontrolle wurden DEREK Mäuse nur mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infiziert. An Tag 7 p.i. wurde die Milz entnommen, die Lymphozyten isoliert und die Expression von CD25 und Foxp3 in der CD4⁺ T-Zellpopulation durchflusszytometrisch analysiert (A). Die graphische Darstellung zeigt eine Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Die *dot plots* zeigen die Verteilung der CD25⁺ und Foxp3⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation aus infizierten DEREK Mäusen 7 d p.i. (links) und infizierten DEREK Mäusen 7 d p.i. nach dreimaliger DT-Injektion (rechts) eines repräsentativen Versuches (B). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,001).

Nach der Injektion von DT konnten die Foxp3⁺ Tregs in der CD4⁺ T-Zellpopulation nahezu vollständig depletiert werden (von 10,5 % auf 0,5 %; Abb. 4.7, B). Die Parasitämie von *P. yoelii* infizierten DEREK Mäusen, die entweder mit DT behandelt wurden oder unbehandelt blieben (vgl. Abb. 4.7), wurde an Tag 3, 5 und 7 nach der Infektion bestimmt und miteinander verglichen (Abb. 4.8).

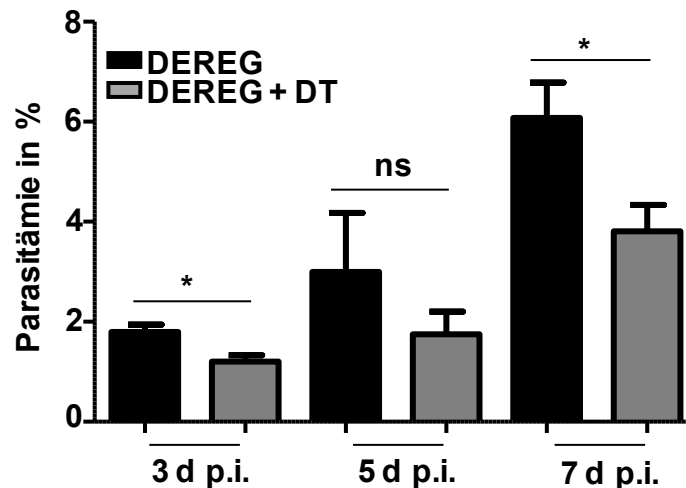


Abb. 4.8: Die Depletion von Foxp3⁺ Tregs durch DT resultiert in einer reduzierten Parasitämie in *P. yoelii* infizierten DEREK Mäusen. An Tag 3, 5 und 7 nach der Infektion von DEREK Mäusen mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs und Injektion von DT (DEREG+DT), wurde aus der Schwanzvene der infizierten Maus etwas Blut entnommen, auf einem Objektträger ein *Monolayer* an Erythrozyten erzeugt und darauffolgend eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Die Parasitämie wurde unter dem Lichtmikroskop mittels 100er Okular bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ns = nicht signifikant).

Die Depletion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs durch die Injektion von DT während der Infektion mit *P. yoelii* führt zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der Parasitämie an Tag 3 und 7 nach der Infektion. Als Kontrolle dienten *P. yoelii*-infizierte DEREK Mäuse, die nicht mit Diphtherie-Toxin behandelt wurden. Für einen tieferen Einblick in den T-Zell-Phänotyp von Effektor T-Zellen aus infizierten, Treg-depletierten DEREK Mäusen, wurden die *P. yoelii* infizierten Mäuse an Tag 7 p.i. getötet, und die Lymphozyten aus der Milz für durchflusszytometrische Analysen isoliert. Die Lymphozyten wurden für die Antigene CD4 und CD8 gefärbt und hinsichtlich der CD62L und CD69 Expression untersucht. CD69 ist einer der frühesten Aktivierungsmarker und wird, im Gegensatz zu CD62L, nach der Aktivierung einer T-Zelle erhöht exprimiert (Testi et al., 1989).

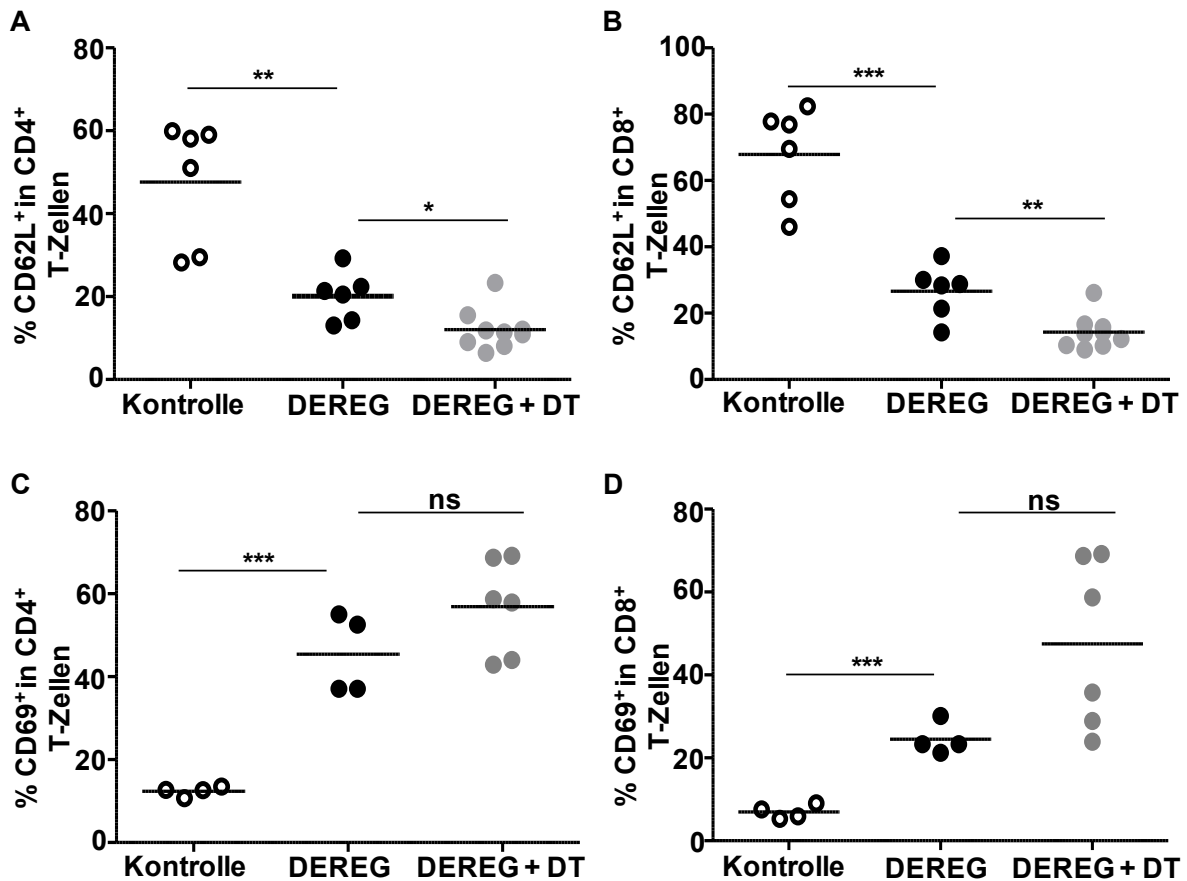


Abb. 4.9: Verstärkte T-Zellaktivierung in Treg-depletierten Mäusen während der *P. yoelii*-Infektion. Nicht infizierte BALB/c (Kontrolle) und mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infizierte DEREg Mäuse, entweder mit DT behandelt (DEREG+DT) oder unbehandelt (DEREG), wurden an Tag 7 p.i. getötet und die Milz entnommen. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert, mit α CD4, α CD8 und mit α CD62L (A und B) oder α CD69 (C und D) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung aus zwei bis drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Der Prozentsatz an CD4⁺CD62L⁺ sowie CD8⁺CD62L⁺ T-Zellen war in DT behandelten, infizierten DEREg Mäusen im Vergleich zu unbehandelten, infizierten DEREg Mäusen signifikant verringert (Abb. 4.9, A und B). Der Anteil an CD4⁺CD69⁺ sowie CD8⁺CD69⁺ aktivierten T-Zellen war nach der Injektion von DT allerdings nicht signifikant erhöht (Abb. 4.9, C und D). Neben einer verringerten Parasitämie in infizierten, Treg-depletierten DEREg Mäusen, konnte somit auch eine verstärkte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. In weiteren Analysen des T-Zell-Phänotyps von infizierten Treg-depletierten DEREg Mäusen, wurden die Oberflächenmoleküle Lag3 und PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen, sowie GranzymB (GzmB) auf CD8⁺ T-Zellen 7 Tage nach der Infektion analysiert. Lag3 wird auf Tregs exprimiert und repräsentiert ein CD4-ähnliches Molekül, das an MHC Klasse-II

Moleküle binden kann. Es wird jedoch auch von aktivierten T-Zellen exprimiert (Huang et al., 2004; Triebel et al., 1994).

PD-1 gehört zu der CD28-Familie und ist wahrscheinlich in den komplexen Mechanismus der peripheren T-Zell-Toleranz involviert (Freeman et al., 2000). Es wird ebenfalls nach T-Zellaktivierung hochreguliert aber auch von anergen T-Zellen sowie Tregs exprimiert (Agata et al., 1996; Lechner et al., 2001). Die Expression von PD-1 soll die Aktivität des Immunsystems bei einer starken Immunantwort reduzieren, um durch aktivierte T-Zellen ausgelöste Immunpathologien zu verhindern (Freeman et al., 2000; Nishimura und Honjo, 2001).

Das zytolytische Protein GzmB wird von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (CTLs) jedoch auch von Treg-Populationen exprimiert (McHugh et al., 2002; Russell und Ley, 2002).

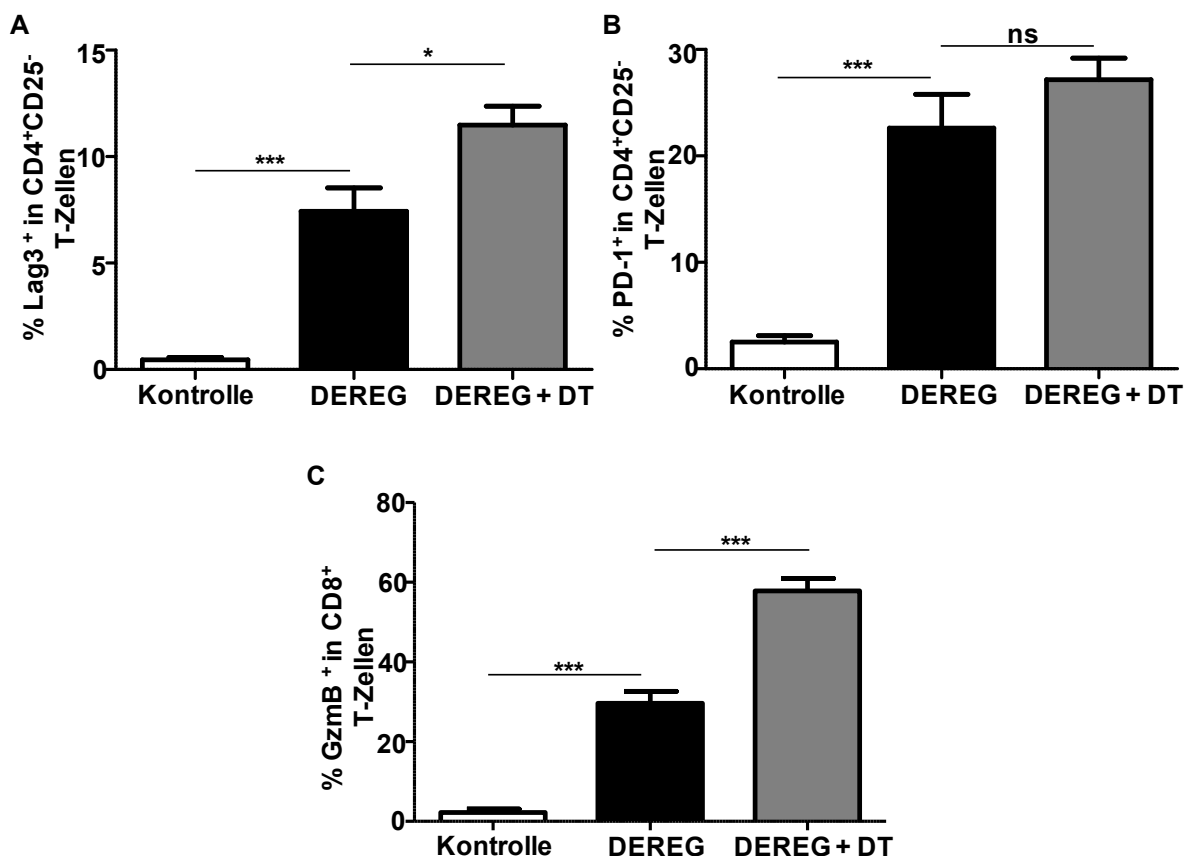


Abb. 4.10: Die Depletion von Tregs führt zu einem Anstieg an Lag3⁺ und PD-1⁺CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sowie GzmB⁺CD8⁺ T-Zellen in *P. yoelii* infizierten Mäusen. Nicht infizierte BALB/c (Kontrolle) und mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs infizierte DEREK Mäuse die entweder mit DT behandelt wurden (DEREG+DT) oder unbehandelt blieben (DEREG), wurden an Tag 7 p.i. getötet und die Milz entnommen. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert, mit $\alpha CD4$ und $\alpha Lag3$ (A) oder $\alpha PD-1$ (B) sowie $\alpha CD8$ und $\alpha GzmB$ (C) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Wie in Abbildung 4.10. dargestellt ist, zeigten isolierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Treg-depletierten Mäusen 7 Tage nach der Infektion eine signifikante Erhöhung von CD4⁺CD25⁻Lag3⁺ T-Zellen (Abb. 4.10, A), sowie leicht erhöhte Mengen von CD4⁺CD25⁻PD-1⁺ T-Zellen (Abb. 4.10, B) im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus infizierten DEREK Mäusen, die nicht mit DT behandelt wurden. Die GzmB Expressionsanalysen auf CD8⁺ T-Zellen 7 Tage nach der Infektion mit *P. yoelii* zeigten einen zweifachen prozentualen Anstieg von CD8⁺GzmB⁺ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen p.i. gegenüber nicht depletierten Mäusen (Abb. 4.10, C).

Grundsätzlich konnte durch die Depletion von Foxp3⁺ Tregs während der Infektion mit *P. yoelii* neben einer signifikanten Reduktion der Parasitämie (Abb. 4.8), auch eine höhere Aktivierungsrate von CD4⁺ (Abb. 4.9) sowie CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.9 und Abb. 4.10, C) gezeigt werden. Dies macht deutlich, dass Foxp3⁺ Tregs eine wichtige Rolle im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion von BALB/c Mäusen spielen.

4.3 Genexpressionsanalysen von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion

Wie bereits gezeigt werden konnte, kommt es während der Infektion mit *P. yoelii* zu einer Expansion von Tregs (Abb. 4.5), die zudem über ein stärkeres suppressives Potential verfügen als Tregs aus nicht infizierten WT Mäusen (Abb. 4.6).

Um dieses Phänomen molekular detaillierter zu charakterisieren, wurden vergleichende Genexpressionsanalysen mit Hilfe der Microarray Technologie durchgeführt. Für dieses Versuchsvorhaben wurden CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sowie CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus Milzen von nicht infizierten und *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP Mäusen, 3 und 5 Tage p.i. durchflusszytometrisch am FACS ARIA II sortiert (Reinheit > 95 %) und für die Microarray Analysen verwendet. In Abbildung 4.11 ist die Isolationsstrategie für die Sortierung der zu analysierenden Zellen dargestellt.

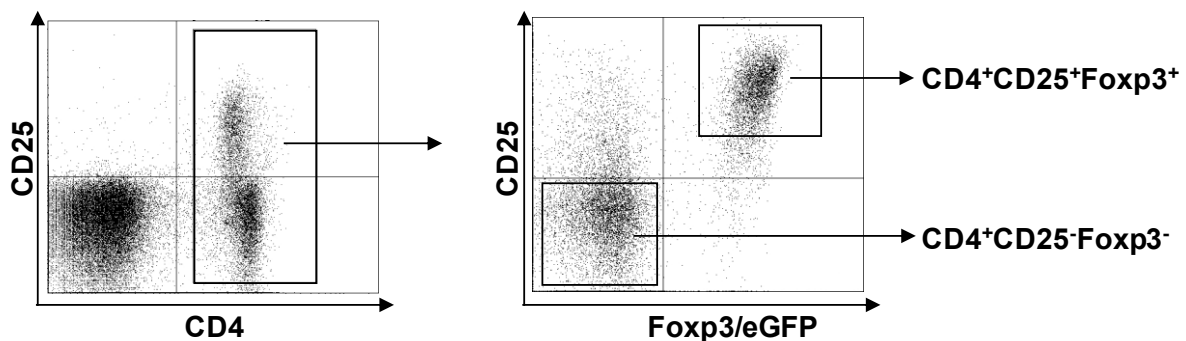


Abb. 4.11: Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen wurden aus Milzzellen, isoliert aus nicht infizierten, naiven Foxp3/eGFP Mäusen und *P. yoelii* infizierten (1×10^5 iRBC, 3 und 5 d p.i.) Foxp3/eGFP Mäusen durchflusszytometrisch am FACS ARIA II sortiert. In beiden *dot plots* ist die Isolationsstrategie dargestellt.

Die vergleichenden Genexpressionsanalysen ermöglichen die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* (3 d und 5 d p.i.), im Vergleich zu den entsprechenden T-Zellpopulationen aus nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen.

Das Genexpressionsprofil wurde aus den sortierten Zellpopulationen mit Hilfe der Agilent-Genexpressions-Chip-Microarray-Technologie erstellt. Für die Treg-spezifischen Transkriptomanalysen wurden nur die Gene mit einem Regulationsfaktor größer als 2 und einer Signalintensität größer als 1000 in Betracht

gezogen. Die in Abbildung 4.12 dargestellte *heat map* zeigt die differentiell exprimierten Gene von naiven $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (WT) aus nicht infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen gegenüber $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 3 und 5 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion.



Abb. 4.12: Genexpressionsanalysen von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs aus nicht infizierten WT $Foxp3/eGFP$ Mäusen und *P. yoelii* infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen 3 d und 5 d p.i.. Die *heat map* zeigt die differentiell exprimierten Gene (Regulationsfaktor > 2, Signalstärke > 1000) aus den Ergebnissen der Agilent-Microarray Analysen von naiven $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (WT) aus nicht infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen gegenüber $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 3 und 5 Tage nach der *P. yoelii* (*Py*)-Infektion. Die Farbe orange-rot repräsentiert eine stärkere Expression des analysierten Gens, während die Farbe blau-grau eine schwächere Expression darstellt.

Die Analyse des Genexpressionsprofils von naiven $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (WT) aus nicht infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen wurde mit dem Profil von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 3 und 5 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion verglichen (Abb. 4.12). Dabei wird eine starke Änderung des Genexpressionsprofils in der Treg-Population während der Infektion deutlich. Der molekulare Phänotyp der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs wird folglich während der *P. yoelii*-Infektion moduliert.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Agilent-Microarrays das Genexpressionsprofil von $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen aus nicht infizierten und aus *P. yoelii* infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen 3 d und 5 d p.i. bestimmt. Durch vergleichende Analysen mit den Ergebnissen der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg Population konnten somit Treg-spezifische Gene ermittelt werden, das heißt Gene die differentiell in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs im Vergleich zu $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen aus nicht infizierten Mäusen exprimiert werden.

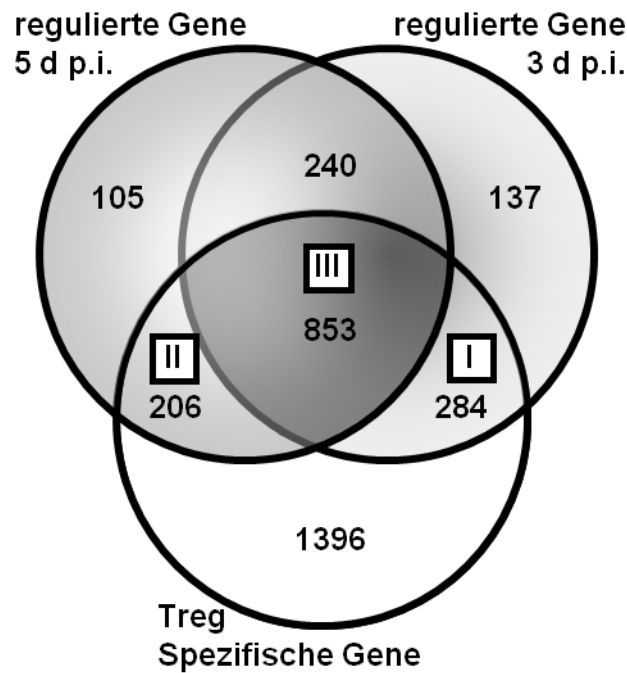


Abb. 4.13: Schnittmengendiagramm differentiell exprimierter Gene in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs verglichen mit $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen, aus nicht infizierten und *P. yoelii* infizierten $Foxp3/eGFP$ 3 d oder 5 d p.i.. $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T Zellen wurden entweder aus nicht infizierten oder aus *P. yoelii* infizierten $Foxp3/eGFP$ Mäusen 3 d oder 5 d p.i. mit Hilfe des FACS ARIA II isoliert und für Genexpressionsanalysen mittels Agilent-Microarrays verwendet. Im Schnittmengendiagramm sind Gene mit einer Signalstärke größer als 1000 und einem Regulationsfaktor größer als 2 dargestellt. Menge (I) spiegelt die Anzahl der Treg-spezifischen Gene wider, reguliert 3 d p.i. Menge (II) 5 d p.i. und Menge (III) stellt die Treg-spezifischen Gene dar, die sowohl an Tag 3 als auch an Tag 5 nach *P. yoelii*-Infektion reguliert waren.

Insgesamt wurden 4076 Gene mit einer Signalstärke größer als 1000 in mindestens einer der analysierten T-Zellpopulation identifiziert und für weitere Analysen berücksichtigt. Als reguliert wurden die Gene bezeichnet, die in den vergleichenden Genexpressionsanalysen mindestens um den Faktor 2 verändert vorlagen.

Dabei konnten 2729 Gene mit unterschiedlicher Expressionsstärke in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs im Vergleich zu $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen aus nicht infizierten WT Mäusen erfasst werden die im Folgenden als Treg-spezifisch bezeichnet werden. Darüber hinaus wurden 1243 dieser Treg-spezifischen Gene auch im Infektionsverlauf von *P. yoelii* als reguliert identifiziert, 284 Gene davon 3 d p.i. (Abb. 4.13, I), 206 Gene 5 d p.i. (Abb. 4.13, II) und 853 Gene zeigten eine differentielle Expression an Tag 3 und Tag 5 p.i. (Abb. 4.13, III) in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs.

Eine Auswahl von regulierten Treg-spezifischen Molekülen entweder 3 d p.i. (I), 5 d p.i. (II) oder an beiden Tagen p.i. (III) ist als relative Expression aus einem Experiment logarithmisch in Abbildung 4.14 veranschaulicht.

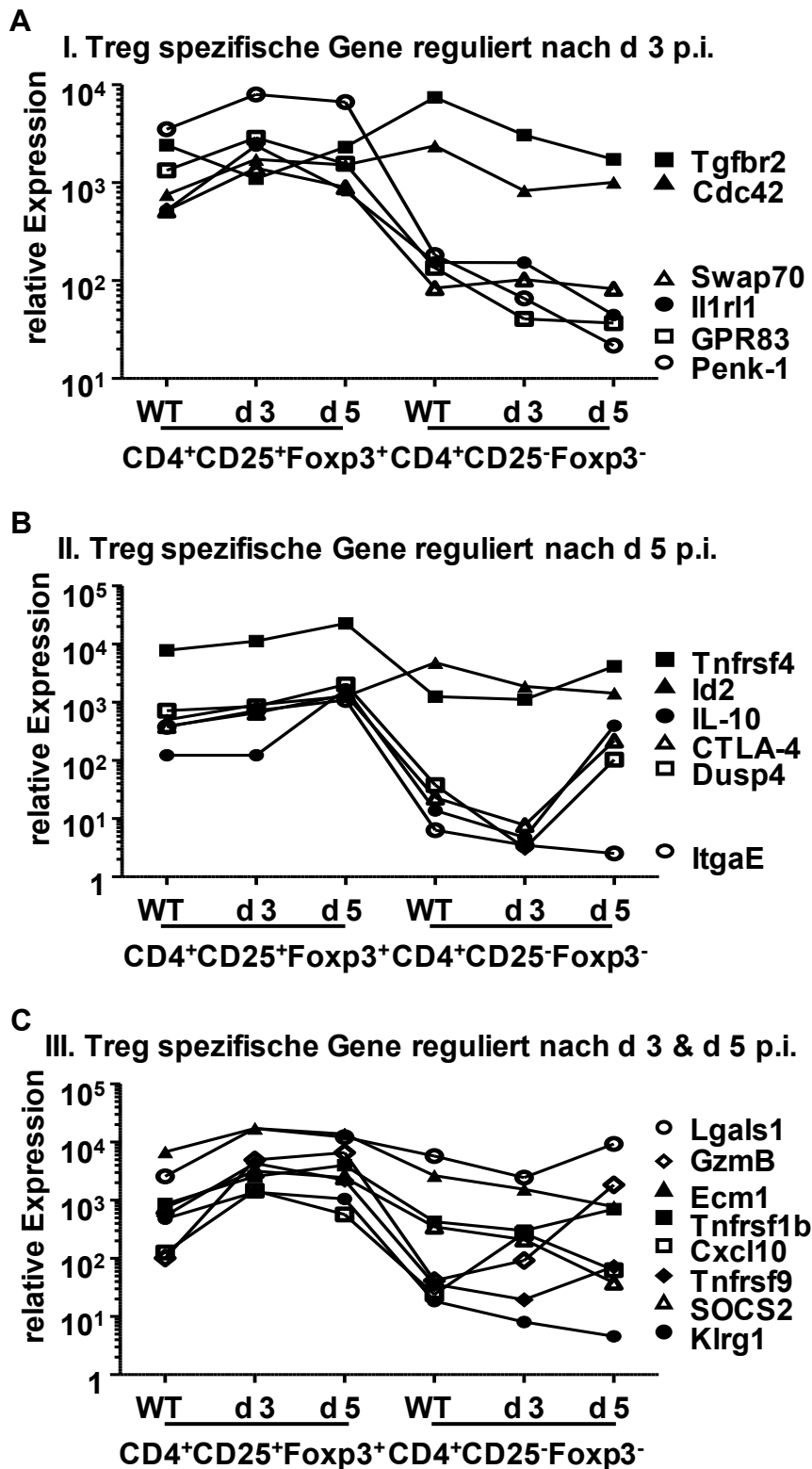


Abb. 4.14: Auswahl differentiell exprimierter Gene in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs verglichen mit CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus nicht infizierten oder *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP Mäusen 3 d und 5 d p.i.. Die Graphen zeigen die logarithmische Darstellung der relativen Expression von ausgewählten Molekülen 3 d p.i. (A), 5 d p.i. (B) oder an beiden Tagen p.i. (C) aus den Ergebnissen der durchgeführten Agilent-Microarrays von naiven CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (WT) sowie naiven CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen (WT) aus nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen gegenüber CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen 3 und 5 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion aus Foxp3/eGFP Mäusen.

Wie in Abbildung 4.14 deutlich wird, sind einige Treg-assoziierte Moleküle nicht nur in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sondern auch in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen nach *P. yoelii*-Infektion reguliert. So werden z.B. die Gene CTLA-4 und IL-10 5 d p.i. nicht nur in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sondern auch in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen erhöht exprimiert, wohingegen Penk-1 oder Gpr83 nach 3 Tagen p.i. (Abb. 4.14, A) und ItgaE (Integrin α E β 7, CD103) nach 5 d p.i. nur in Tregs hochreguliert sind (Abb. 4.14, B). Klr1 und SOCS2 sind nach 3 und 5 Tagen p.i. nur in Tregs reguliert, während GzmB nach 3 und 5 Tagen p.i. in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sowie CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen verstärkt exprimiert wird (Abb. 4.14, C).

Zusammengefasst, zeigen die vergleichenden Genexpressionsanalysen von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten Mäusen und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs aus nicht infizierten Mäusen, dass die Infektion mit *P. yoelii* zu einer Modulation des molekularen Phänotyps der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs führt.

Um die Ergebnisse der Microarray Analysen zu validieren, wurden die Expressionslevel einiger ausgewählter Gene zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (3, 5, 7, 10 und 14 Tage p.i.) durchflusszytometrisch (Abb. 4.15) und mit Hilfe der Real-Time PCR (Abb. 4.16) bestimmt.

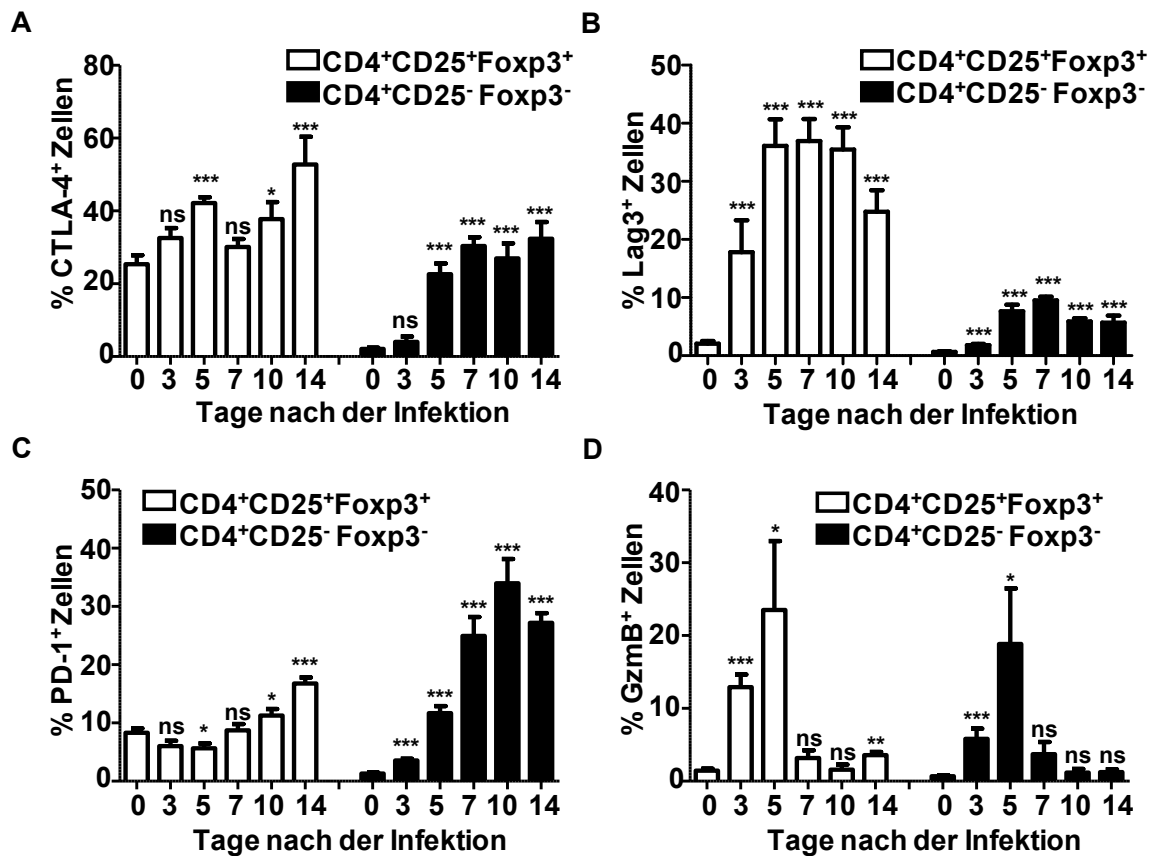


Abb. 4.15: Durchflusszytometrische Analyse der CTLA-4, Lag3, PD-1 und GzmB Expression in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion. Milzzellen wurden aus *P. yoelii* infizierten (3 d, 5 d, 7 d, 10 d und 14 d p.i.) und naiven, nicht infizierten (0 d = WT) Foxp3/eGFP Mäusen isoliert, mit αCD4 und αCD25 sowie αCTLA-4 (A), αLag3 (B), αPD-1 (C) oder αGzmB (D) gefärbt und der prozentuale Anteil in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen *P. yoelii* p.i. durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test in Bezug zum nicht infizierten WT (0 d) durchgeführt (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Die mittels Microarray Analyse festgestellte verstärkte Expression einzelner Gene, wie CTLA-4, Lag3, PD-1 und GzmB in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und/oder CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Infektionsverlauf, konnte auch auf Proteinebene durchflusszytometrisch bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, können Lag3 und PD-1 als Aktivierungsmarker und ebenso als inhibitorische Moleküle auftreten. CTLA-4 kann immunsupprimierend wirken, wird jedoch auch nach T-Zellaktivierung exprimiert. Es bindet an dieselben kostimulierenden Moleküle (B7.1 und B7.2) wie CD28 und hemmt dadurch die TCR-Signalinduktion (Read et al., 2000). Der prozentuale Anteil an CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen stieg während der Infektion bis zu Tag 14 p.i. im Vergleich zum nicht infizierten WT stetig an (50 % vs. 25 % bzw. 40 % vs. 2 %; Abb. 4.15, A). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten weiterhin eine durchgängig signifikant

($p < 0,001$) erhöhte Lag3 Expression in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und in $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen 3, 5, 7, 10 und 14 Tage nach *P. yoelii*-Infektion (Abb. 4.15, B). Der Anteil PD-1⁺ Zellen hingegen zeigte erst nach 7 Tagen p.i. eine Erhöhung in beiden Populationen, die in den Tregs sogar noch bis Tag 14 anstieg (18 %; Abb. 4.15, C). Nach 3 bis 5 Tagen p.i. war für GzmB⁺ T-Zellen ein erhöhter Anteil in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs sowie in $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen von 1 % bis auf ca. 18 % zu detektieren, welches im weiteren Infektionsverlauf jedoch wieder auf Kontrollniveau zurückging (Abb. 4.15, D).

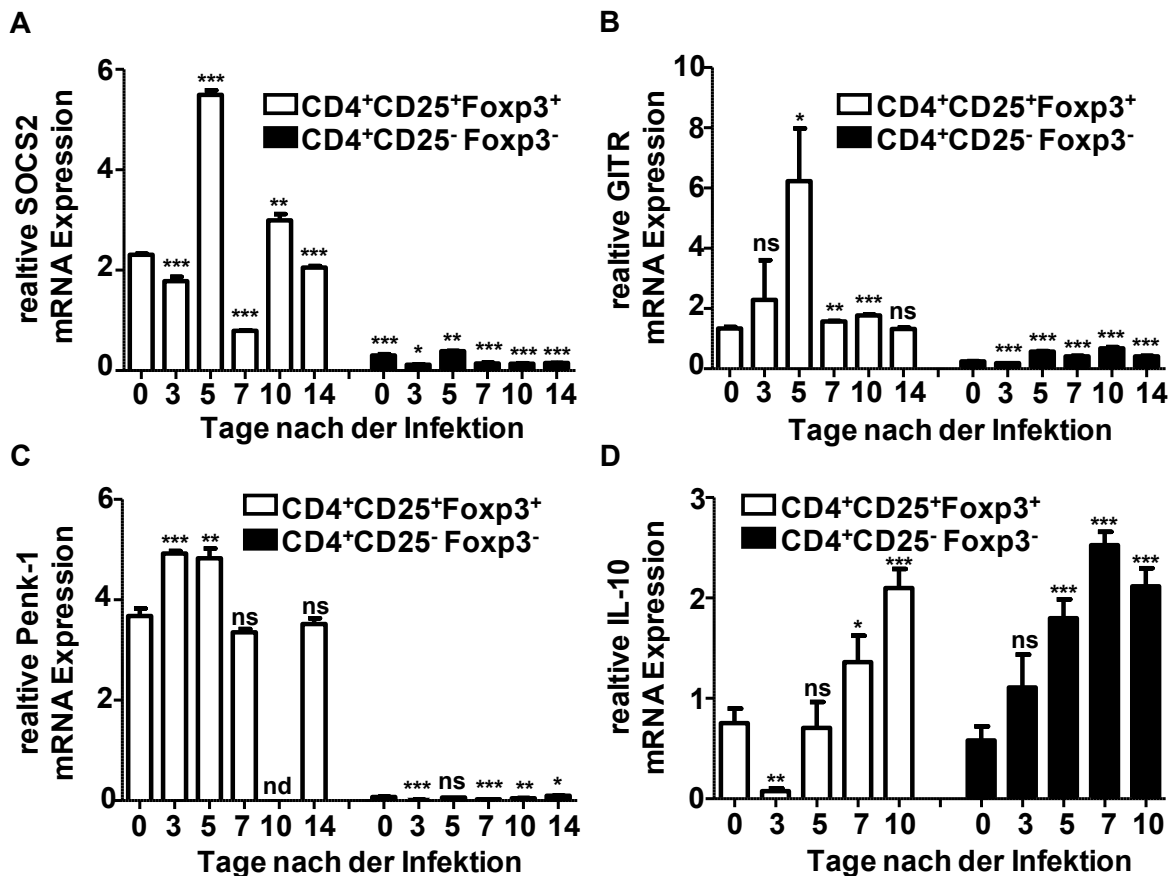


Abb. 4.16: Erhöhte mRNA Expression von SOCS2 (A), GITR (B) und Penk-1 (C) in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und IL-10 (D) in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs sowie in $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen nach *P. yoelii*-Infektion. RNA wurde aus sortierten $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen aus der Milz von *P. yoelii* infizierten (3 d, 5 d, 7 d, 10 d und 14 d p.i.) und naiven, nicht infizierten (0 d) Foxp3/eGFP Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und hinsichtlich der mRNA Expression von SOCS2 (A), GITR (B), Penk-1 (C) und IL-10 (D) mittels Real-Time PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test in Bezug zum nicht infizierten WT (0 d) durchgeführt (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$; ns = nicht signifikant), nd = nicht detektiert.

Die Real-Time PCR Analyse ergab eine erhöhte mRNA Expression von SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling 2*), GITR und Penk-1 (*proenkephalin-1*) in sortierten $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 3 bis 5 Tage p.i., wobei SOCS2 sogar an Tag 10 p.i. noch eine beträchtliche Induktion aufwies (Abb. 4.16, A-C), die Expression in $CD4^+CD25^-$

Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion jedoch nicht induziert wurde. Für das immunsuppressive Zytokin IL-10 konnte nicht nur in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, sondern auch in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen eine Hochregulierung der mRNA bis zu Tag 10 nach der *P. yoelii*-Infektion detektiert werden (Abb. 4.16, D).

Um die Erhöhung der IL-10 mRNA während der Infektion mit *P. yoelii* auch auf Proteinebene in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T Zellen zu überprüfen, wurden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus der Milz *P. yoelii*-infizierter Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. isoliert und für 72 Stunden *in vitro* stimuliert. Die Menge an sekretiertem IL-10 im Überstand wurde mit Hilfe der Luminex Technologie bestimmt.

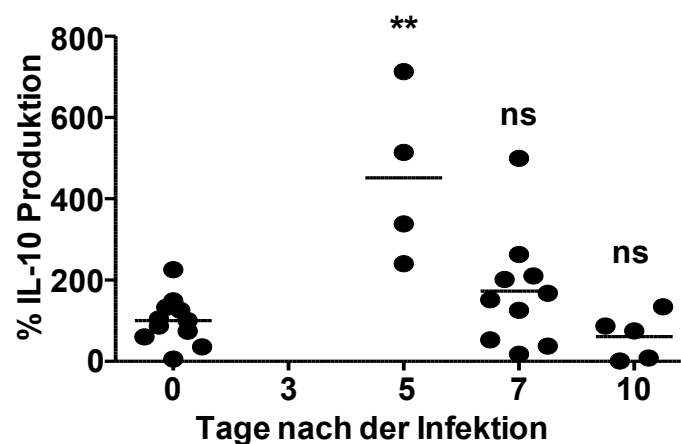


Abb. 4.17: IL-10 Sekretion von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen wurden 5, 7 oder 10 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion aus Foxp3/eGFP Mäusen oder aus nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen isoliert und in Gegenwart von CD11c⁺ DCs für 72 Stunden mit α CD3 stimuliert. Die Überstände wurden mit Hilfe der Luminex Technologie analysiert und der prozentuale Anteil IL-10 sekretierender CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen ermittelt (nicht infizierte Foxp3/eGFP Maus, 0 d = 100 %). Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Gezeigt sind die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test im Vergleich zum nicht infizierten WT (0 d) durchgeführt (**p < 0,01; ns = nicht signifikant).

Wie in Abb. 4.17 gezeigt, kam es 5 Tage nach *P. yoelii*-Infektion zu einer stark erhöhten IL-10 Sekretion von *in vitro* stimulierten CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen, die 7 Tage p.i. noch etwas erhöht war, jedoch an Tag 10 auf das Sekretionsniveau der nicht infizierten Kontrollzellen (0 d) herabsank (Abb. 4.17).

Insgesamt konnten wir also nachweisen, dass die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion eine erhöhte suppressive Fähigkeit besitzen und ihren molekularen Phänotyp verändern (Abb. 4.6 und Abb. 4.13). Zudem zeigte sich eine Expansion an CTLA-4, Lag3 und PD-1 exprimierenden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen (Abb. 4.14). Außerdem wird die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 in

CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen an Tag 5 und Tag 7 nach *P. yoelii*-Infektion induziert (Abb. 4.17). Daher stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen während der Infektion mit *P. yoelii* hat.

Folglich wurden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP Mäusen 5 und 7 Tage nach der Infektion sowie aus nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen isoliert, CFSE gefärbt und *in vitro* stimuliert. Die Proliferationsrate wurde über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt.

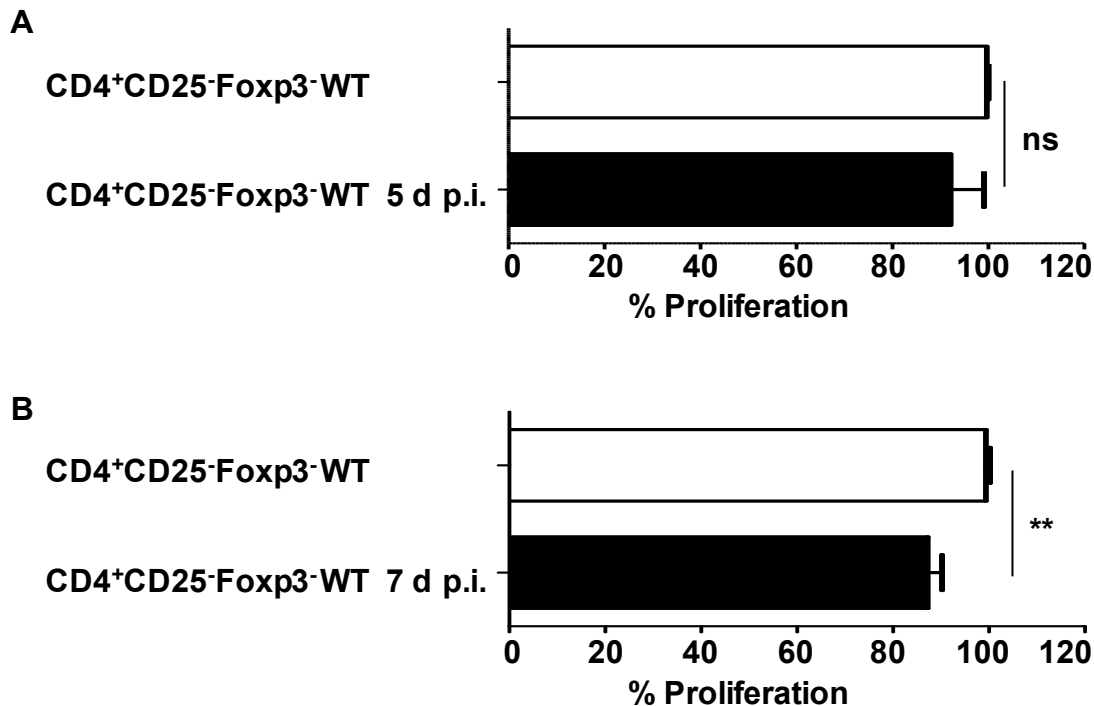


Abb. 4.18: Reduzierte Proliferationsrate von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen 5 und 7 Tage nach *P. yoelii*-Infektion. 3×10^5 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen wurden 5 Tage (A) oder 7 Tage (B) nach der *P. yoelii*-Infektion aus infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (schwarze Balken) oder aus nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (weiße Balken), isoliert, CFSE-markiert und in Gegenwart von CD11c⁺ DCs für 72 Stunden mit α CD3 stimuliert. Die Proliferationsrate der CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes gemessen. Die Proliferationskapazität wurde auf das Proliferationsniveau der CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (100 %) normalisiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,01; ns = nicht signifikant).

Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist, weisen CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen 5 Tage p.i. eine leicht reduzierte Proliferationskapazität auf (90 %; Abb. 4.18, A). Dieser Trend wird durch eine signifikant reduzierte Proliferation (85 %) der CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen an Tag 7 des Infektionsverlaufs bestätigt (Abb. 4.18, B).

Das Zytokinprofil der im Proliferationstest restimulierten $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen, wurde im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Luminex Technologie analysiert.

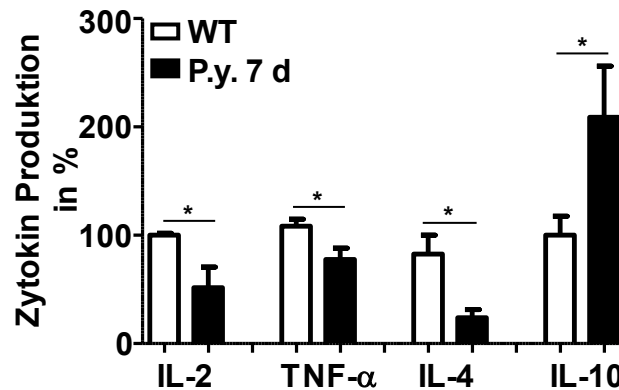


Abb. 4.19: Zytokinprofil von $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen nach *P. yoelii*-Infektion. $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen wurden 7 Tage p.i. für die Analyse von IL-2, IL-4 und IL-10 und TNF- α nach der *P. yoelii*-Infektion aus infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (schwarz) oder nicht infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (weiß), isoliert und in Gegenwart von $CD11c^+$ DCs und $\alpha CD3$ für 72 Stunden stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und das Zytokinprofil mit Hilfe des *Cytokine assay kits* im Luminex bestimmt. Der Graph repräsentiert die Mittelwerte der gemessenen Zytokine in % (WT = 100 %) mit Standardfehler aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$).

In Übereinstimmung mit der verminderten Proliferationsfähigkeit von $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen 7 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion (Abb. 4.18) produzierten $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen 7 Tage nach *P. yoelii*-Infektion weniger pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-2, TNF- α und IL-4. Wie bereits in Abbildung 4.17 dargestellt wurde, konnte eine deutlich erhöhte Sekretion von anti-inflammatorischem IL-10 detektiert werden (Abb. 4.19).

Insgesamt konnte durch die Microarray Analysen ein spezifisches Profil differentiell exprimierter Gene von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion erstellt werden. $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen zeigten 7 Tage nach der *P. yoelii*-Infektion eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich zu $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen aus nicht infizierten WT BALB/c. Während die Produktion der inflammatorische Zytokine, IL-2, IL-4 und TNF- α von stimulierten $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen 7 Tage nach *P. yoelii*-Infektion signifikant ($p < 0,05$) reduziert vorlag, so konnte eine signifikante Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen werden. Interessanterweise wurde die IL-10 Produktion nicht nur in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs sondern auch in $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen im Infektionsverlauf von *P. yoelii* induziert.

4.4 Isolation und Analyse von IL10⁺CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen mit Hilfe des „IL-10 Secretion Kits“

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und in der Lage pro-inflammatorische Immunantworten, wie z.B. die Proliferation von T-Helfer Zellen und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zu verhindern (Demangel et al., 2002; Moore et al., 2001). Aufgrund der erhöhten IL-10 Produktion von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion ergibt sich die Frage, ob diese IL-10⁺Foxp3⁻ T-Zellen einen suppressiven Phänotyp besitzen. Um dies zu untersuchen, sollten die IL-10 produzierenden T-Zellen 7 Tage nach *P. yoelii*-Infektion mit Hilfe des IL-10 Isolations Kit von Miltenyi isoliert werden.

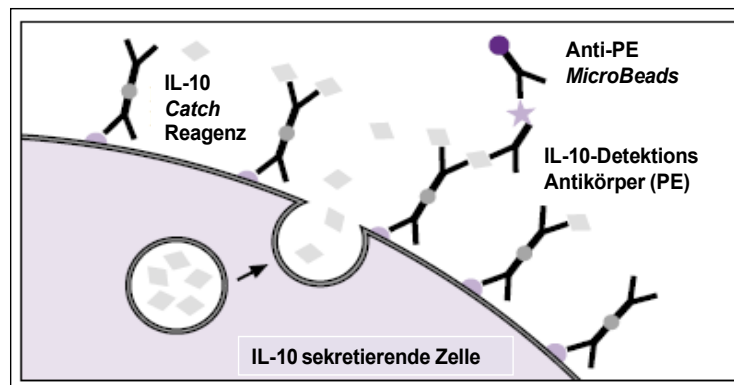


Abb. 4.20: Prinzip des „Mouse IL-10 Secretion Kit“. (Modifiziert aus: *Cytokine Secretion Assay*, Miltenyi, Biotec) Lymphozyten wurden aus *P. yoelii* infizierten Foxp3/eGFP Mäusen (7 d p.i.) isoliert und in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen sortiert. Diese wurden anschließend mit PMA und Ionomycin für 16 Stunden stimuliert und mit dem IL-10-spezifischen „Catch Reagenz“ inkubiert. Nach 45 minütiger IL-10 Sekretion erfolgte die Färbung der Zellen mit dem „Maus IL-10 Detektions Antikörper (PE)“. Darauffolgend wurden die Zellen an Anti-PE *MicroBeads* gekoppelt und abschließend mittels AutoMACS, über die Anti-PE *MicroBeads* in IL-10⁺ und IL-10⁻ Zellen, separiert.

Dafür wurden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen sortiert, mit PMA und Ionomycin über Nacht stimuliert und anschließend mit einem IL-10 „Catch Reagenz“ inkubiert. Nach einer 45 minütigen Sekretionsphase bei 37 °C wurden die Zellen mit einem „IL-10-Detektions Antikörper (PE)“ gefärbt und darauffolgend an Anti-PE *MicroBeads* gekoppelt. Abschließend erfolgte die Separation der CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen mit Hilfe des AutoMACS in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁻ T-Zellen.

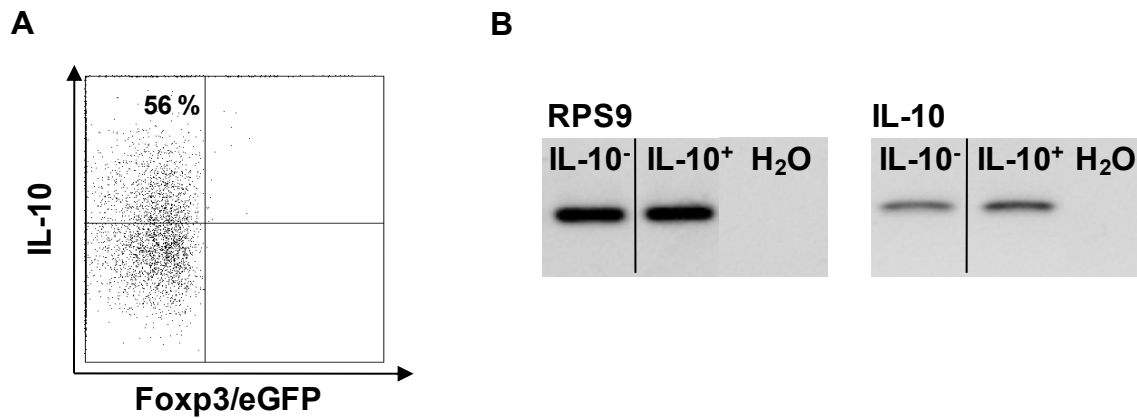


Abb. 4.21: Reinheitsanalyse des „IL-10 Secretion Kits“ nach Separation mittels AutoMACS. $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen wurden für weitere Analysen in $IL10^+$ und $IL10^-$ T-Zellen mit Hilfe des „IL-10 Secretion Kits“ und anschließend mittels AutoMACS separiert (Reinheit = 56 %; A). Abbildung B zeigt die mRNA Analyse mittels PCR der AutoMACS sortierten $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL10^+$ bzw. $IL10^-$ T-Zellen und spezifischen IL-10 Primern (B). RPS9 dient als *housekeeping* Gen, H_2O als Negativkontrolle. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt.

Die Effizienz des neu etablierten „IL-10 Secretion Kits“ wurde nach der Separation mit Hilfe des AutoMACS auf Proteinebene durchflusszytometrisch überprüft und die Spezifität auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR bestimmt. Mit dieser Separationsmethode wurde in $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL10^+$ T-Zellen (7 d p.i.) lediglich eine Reinheit von 56 % erreicht (Abb. 4.21, A). Die Intensitäten der Signale nach IL-10 spezifischer PCR waren bei $IL10^+$ T-Zellen etwas stärker als bei $IL10^-$ T-Zellen, zeigen aber eine nicht ausreichende Separation der Zellpopulationen (Abb. 4.21, B, rechts).

Vor der Separation durch das AutoMACS wurde zur Detektion der IL-10 produzierenden Zellen eine durchflusszytometrische Analyse über die PE-Fluoreszenz durchgeführt. Die in Abbildung 4.22 dargestellten *dot plots* zeigen unter $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 5 % IL-10 produzierende T-Zellen, während 3 % $IL10^+$ T-Zellen in der $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellpopulation festgestellt werden konnten (Abb. 4.22).

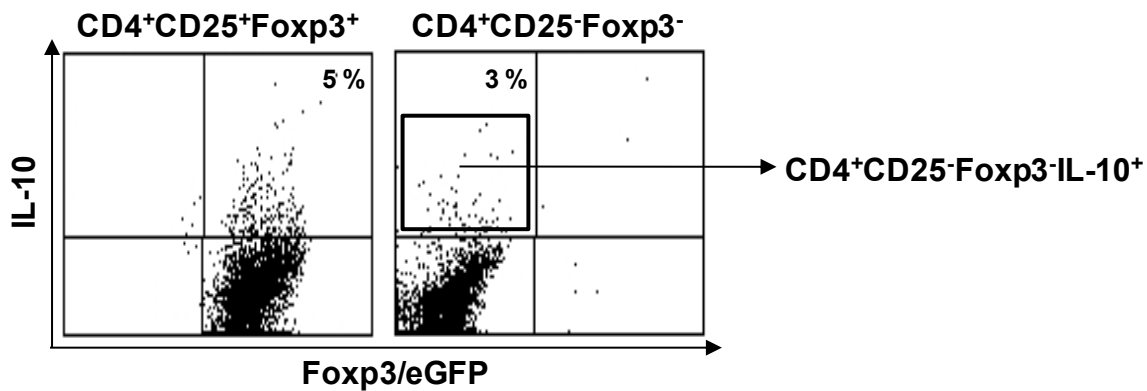


Abb. 4.22: FACS-Analyse zur Detektion der IL-10 produzierenden Zellen („IL-10 Secretion Kit“). Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der IL-10 Produktion nach der Verwendung des „IL-10 Secretion Kits“ von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (links) und $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen (rechts) (7 d p.i.). Ein repräsentativer *dot plot* von insgesamt drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt.

Da sich die Separation durch die AutoMACS Methode als nicht effizient genug erwies (Reinheit = 56 %), wurden die $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen für weitere Analysen über die PE-Fluoreszenz am FACS Aria II durchflusszytometrisch in $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ und $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^-$ T-Zellen sortiert.

Mit dieser Methode konnte eine Reinheit von 70 % erzielt werden (Abb. 4.23, A). Die Spezifität des „IL-10 Secretion Kits“ wurde nach der durchflusszytometrischen Sortierung in $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ und $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^-$ T-Zellen mit Hilfe der semiquantitativen PCR auf RNA Ebene überprüft. Die Bande der $IL-10^+$ T-Zellen zeigte ein sehr starkes Signal in der IL-10 PCR, im Gegensatz zu fast keinem Signal bei $IL-10^-$ T-Zellen (Abb. 4.23, B, rechts).

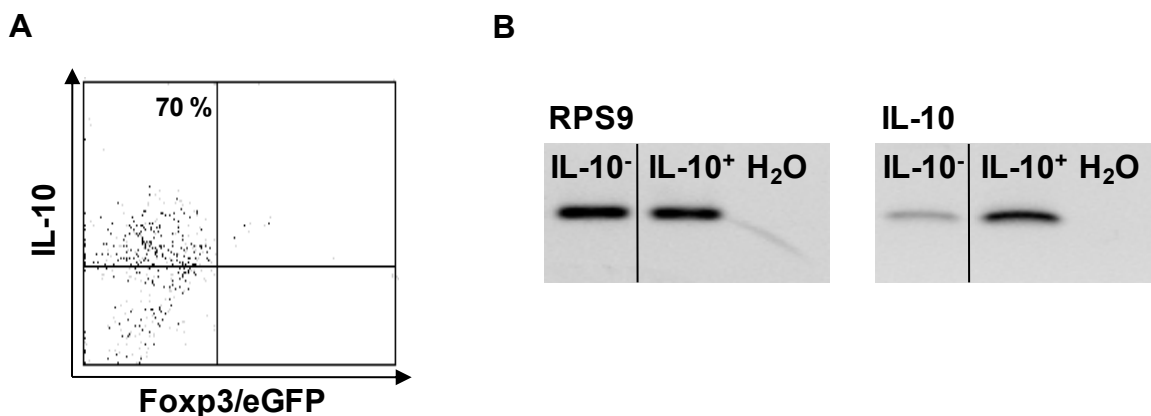


Abb. 4.23: Reinheitsanalyse des „IL-10 Secretion Kits“ nach durchflusszytometrischer Sortierung. $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen wurden für weitere Analysen in $IL10^+$ und $IL10^-$ T-Zellen mit Hilfe des „IL-10 Secretion Kits“ und anschließend mittels FACS ARIA II durchflusszytometrisch sortiert (Reinheit = 70 %; A). Abbildung B zeigt die mRNA Analyse mittels PCR der sortierten $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL10^+$ bzw. $IL-10^-$ T-Zellen und spezifischen IL-10 Primern (B). RPS9 dient als *housekeeping* Gen, H_2O als Negativkontrolle. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt.

Zur Darstellung möglicher funktioneller Unterschiede zwischen $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ und $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^-$ T-Zellen wurden diese hinsichtlich ihrer Suppressionsaktivität untersucht. Dazu wurden die $IL-10^-$ und $IL-10^+$ T-Zellen mit CFSE-gefärbten und mit naiven $CD4^+CD25^-$ *Responder* T-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden naive, nicht infizierte CFSE-gefärbte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen allein oder mit $CD4^+CD25^+$ Tregs, isoliert aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen kokultiviert. Die Proliferation der *Responder* T-Zellen wurde durch die Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt.

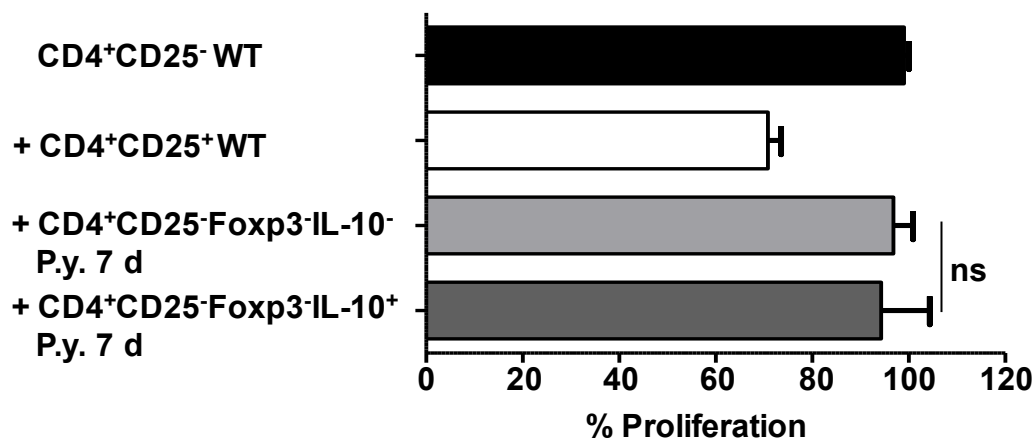


Abb. 4.24: Suppressionsfähigkeit von $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ T-Zellen. 1×10^5 sortierte $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ T-Zellen (dunkelgrauer Balken) oder 1×10^5 $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^-$ T-Zellen (hellgrauer Balken) isoliert aus Milzen von *P. yoelii* infizierten *Foxp3/eGFP* Mäusen 7 d p.i. wurden mit CFSE-gefärbten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen isoliert aus nicht infizierten WT Mäusen im Verhältnis 1:1 kokultiviert und in Anwesenheit von $2,5 \times 10^4$ $CD11c^+$ DCs und $\alpha CD3$ für 48 Stunden kostimuliert. Als Kontrolle wurden entweder 1×10^5 CFSE-gefärbte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen allein kultiviert (schwarzer Balken) oder mit 1×10^5 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen isoliert aus nicht infizierten WT Mäusen (weißer Balken) kokultiviert. Die Proliferationskapazität wurde auf das Proliferationsniveau der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (100 %) normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns = nicht signifikant).

Abbildung 4.24 zeigt, dass die Proliferationsrate der *Responder* T-Zellen weder durch die Kokultur von $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ T-Zellen noch $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^-$ T-Zellen beeinflusst wurde. Es konnte demnach keine suppressive Aktivität von $CD4^+CD25^-Foxp3^-IL-10^+$ T-Zellen beobachtet werden.

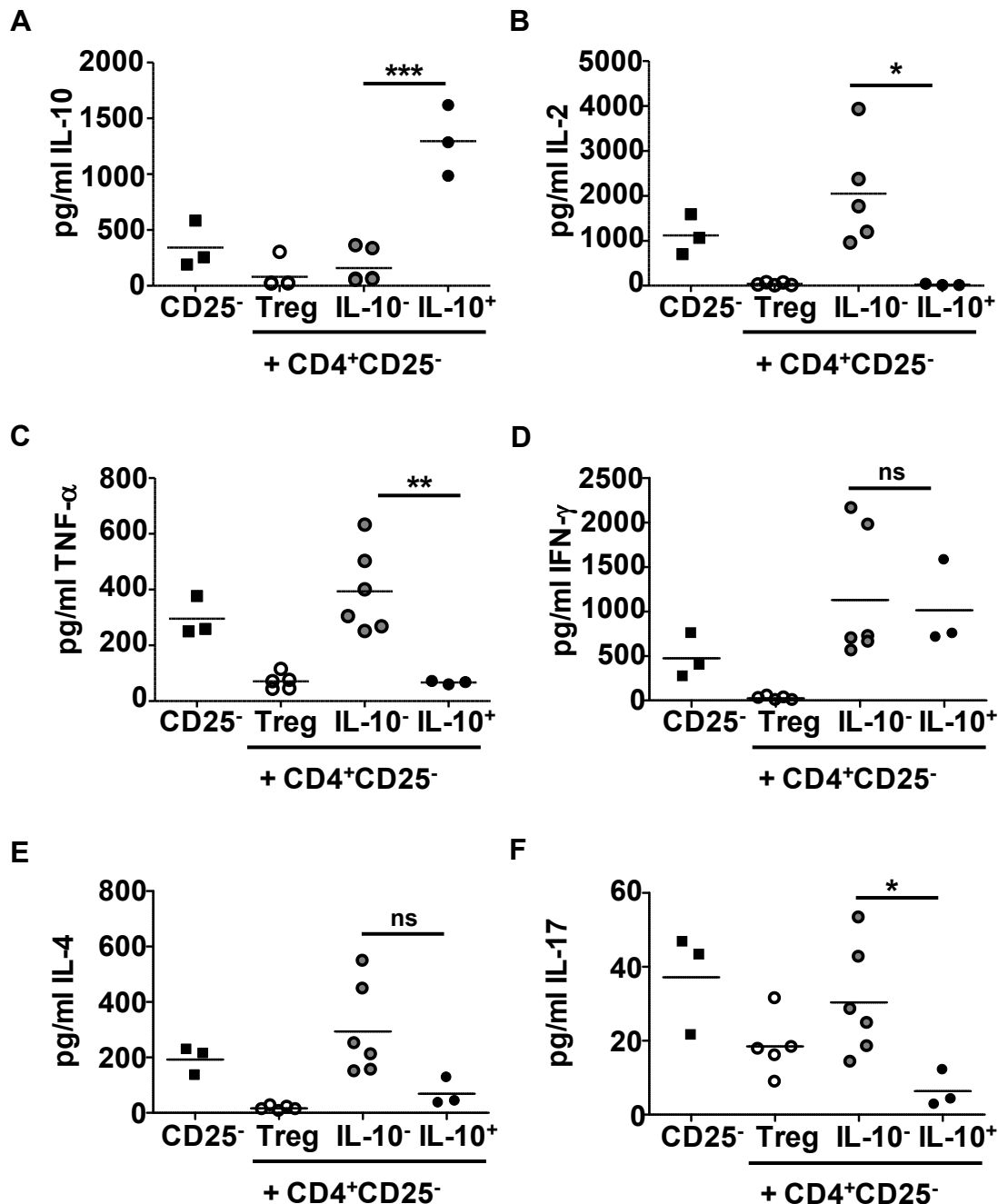


Abb. 4.25: Zytokinprofil von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺IL10⁺ und -IL10⁻ T-Zellen aus Kokulturen mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺IL10⁺ oder -IL10⁻ T-Zellen isoliert aus *P. yoelii* infizierten Mäusen 7 d p.i. bzw. CD4⁺CD25⁺ Tregs isoliert aus nicht infizierten WT Mäusen wurden mit naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus nicht infizierten WT Mäusen für 48 Stunden in Anwesenheit von $2,5 \times 10^4$ CD11c⁺ DCs und α CD3 (löslich, 1 μ g/ml) kostimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Sekretion von IL-10 (A), IL-2 (B), TNF- α (C), IFN- γ (D), IL-4 (E) und IL-17 (F) mit Hilfe des *Cytokine assay kits* im Luminex gemessen. Jeder Punkt repräsentiert einen Messwert. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (Balken) und Einzelmessungen (Punkte) in pg/ml aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,01; *p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Aus den Zellkulturüberständen der für 48 Stunden kokultivierten T-Zellen (vgl. Abb. 4.24) wurde das Zytokinprofil mittels Luminex Technologie bestimmt. Es konnte zwar kein suppressives Potential von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺IL-10⁺ T-Zellen festgestellt

werden, jedoch führte eine Kokultivierung mit CD4⁺CD25⁻ *Responder* T-Zellen zu einer geringeren Produktion von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-2, IL-17 und TNF- α und einer erhöhten Sekretion von IL-10. So konnte im Zellkulturüberstand von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen, kokultiviert mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, nahezu kein sekretiertes IL-2 und nur geringe Mengen TNF- α detektiert werden. Interessanterweise ergab die Analyse des Zellkulturüberstands von CD4⁺CD25⁺ Tregs kokultiviert mit *Responder* T-Zellen ein vergleichbares Resultat (Abb. 4.25).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass eine Infektion mit *P. yoelii* zur Induktion von IL-10 in CD4⁺CD25⁺ Tregs sowie auch in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt. Weiterhin ist es möglich diese IL-10⁺ T-Zellen mit Hilfe des „IL-10 Secretion Kit“ zu isolieren. Allerdings erwies sich die Separation mittels AutoMACS als nicht effizient genug, so dass eine weitere durchflusszytometrische Isolierung am FACS ARIA II erfolgte. Außerdem sind IL-10 sekretierende CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen zwar nicht in der Lage, die Proliferation von stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu inhibieren, jedoch konnte in Kokultur ein verringerter Gehalt an pro-inflammatorischen Zytokinen gemessen werden.

4.5 Die CD4⁺ T-Zell-spezifische Deletion der IL-10 Expression führt zu einer verstärkten T-Zellantwort nach *P. yoelii*-Infektion

Wie in den letzten Abschnitten gezeigt, führt die *P. yoelii*-Infektion zur Induktion der IL-10 Produktion sowohl in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs als auch in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen (Abb. 4.16 und Abb. 4.22). Weiterhin zeigten Kokultur-Experimente, dass CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL10⁺ T-Zellen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine *in vitro* verhindern (Abb. 4.25).

Um den Einfluss von CD4⁺ T-Zell-produziertem IL-10 auf den T-Zell-Phänotyp und die Parasitämie im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion auch *in vivo* zu analysieren, wurde eine CD4IL10-KO (CD4cre x IL-10^{fl/fl}) Maus, basierend auf dem „Cre/loxP-Rekombinationssystem“, generiert. Für dieses Vorhaben wurden CD4cre Mäuse, die aktive Cre-Rekombinase nur in CD4⁺ T-Zellen exprimieren, mit IL-10^{fl/fl} Mäusen, in denen das IL-10 Gen durch zwei loxP-Stellen flankiert ist, gekreuzt. Die CD4⁺ T-Zellen dieser doppeltransgenen Maus sind nicht in der Lage IL-10 zu sekretieren (Roers et al., 2004).

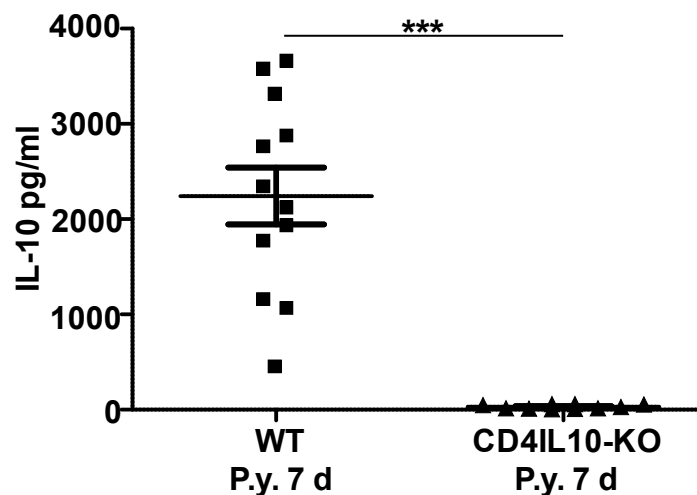


Abb. 4.26: IL-10-Produktion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT BALB/c und CD4IL10-KO Mäusen nach *P. yoelii*-Infektion. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert aus Milzen von *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen und infizierten CD4IL10-KO Mäusen 7 d p.i. wurden für 48 Stunden stimuliert und der Zellkulturüberstand hinsichtlich der IL-10 Produktion am Luminex analysiert. Gezeigt sind die Ergebnisse mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis vier Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,01).

In Abbildung 4.26 ist deutlich zu erkennen, dass *in vitro* stimulierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (7 d p.i.) aus WT Mäusen hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr IL-10 produzierten als CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (7 d p.i.) aus CD4IL10-KO Mäusen, bei denen wie erwartet keine IL-10 Produktion zu beobachten war.

Um den Einfluss der fehlenden IL-10 Produktion in CD4⁺ T-Zellen auf die T-Zellantwort nach *P. yoelii*-Infektion näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Absolutzellzahl der Milz sowie die Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von nicht infizierten, naïven WT BALB/c (Kontrolle = Ktrl), infizierten WT BALB/c (WT) und infizierten CD4IL10-KO Mäusen (KO) bestimmt.

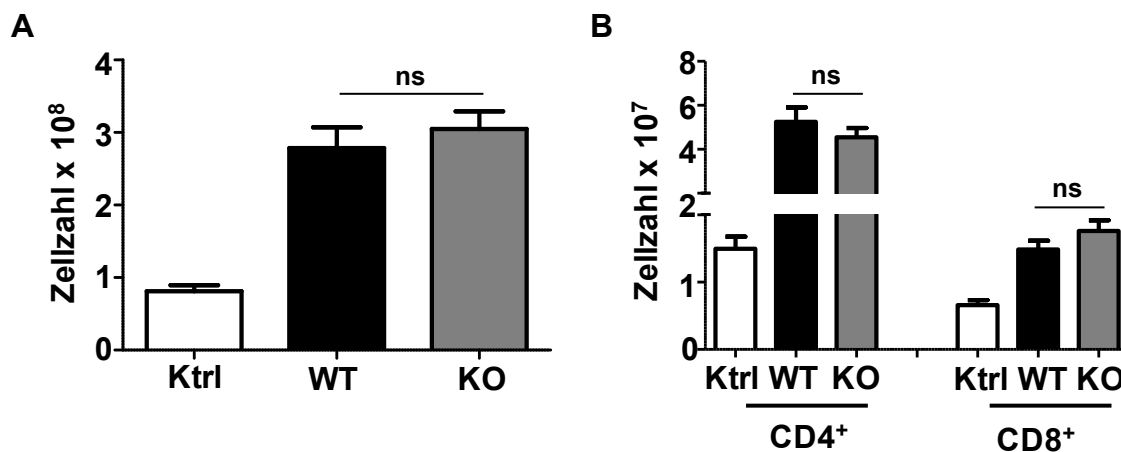


Abb. 4.27: Zellzahl von *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO im Vergleich zu WT BALB/c Mäusen. An Tag 7 nach *P. yoelii*-Infektion wurde die Milz aus nicht infizierten BALB/c WT Mäusen (Kontrolle = Ktrl, weiße Balken) sowie aus *P. yoelii* infizierten BALB/c WT Mäusen (WT, schwarze Balken) und infizierten CD4IL10-KO Mäusen (KO, dunkelgraue Balken) entnommen, die Lymphozyten isoliert und die absolute Anzahl an Milzzellen mikroskopisch bestimmt (A). Nach durchflusszytometrischer Analyse wurde die absolute Zellzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt (B). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns = nicht signifikant).

Die Ergebnisse zeigen zwar einen Anstieg der Gesamtmilzzellzahl (Abb. 4.27, A) sowie der Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen 7 Tage nach der Infektion mit *P. yoelii*, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen infizierten BALB/c WT und infizierten CD4IL10-KO Mäusen. Während bei CD4IL10-KO Mäusen nach *P. yoelii*-Infektion im Vergleich zu infizierten WT BALB/c eine leicht verminderte Anzahl CD4⁺ T-Zellen vorlag, war die CD8⁺ T-Zellzahl leicht erhöht (Abb. 4.27, B).

Für die folgende phänotypische Analyse von T-Zellen, isoliert aus CD4IL10-KO Mäusen im Vergleich zu WT BALB/c nach *P. yoelii*-Infektion, wurden diese durchflusszytometrisch untersucht und miteinander verglichen. Dabei zeigten T-Zellen aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen signifikant ($p < 0,01$) weniger CD62L⁺CD8⁺ T-Zellen (19,5 % vs. 30 %; Abb. 4.28, A) und signifikant mehr

GzmB⁺CD8⁺ T-Zellen (vgl. Abb. 4.28, B), als CD8⁺ T-Zellen aus infizierten WT Mäusen. Insgesamt konnte somit bei CD8⁺ T-Zellen aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen eine stärkere Aktivierung im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen aus infizierten WT Mäusen beobachtet werden.

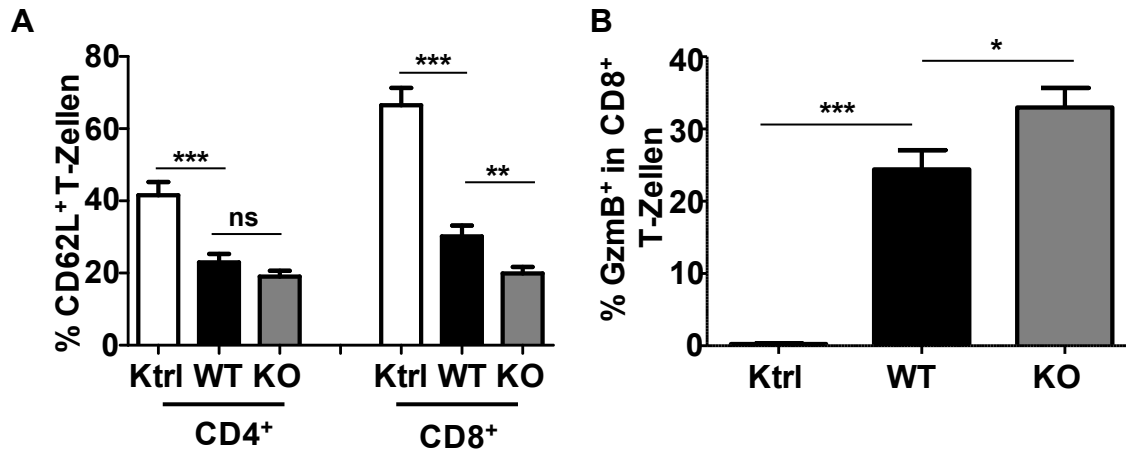


Abb. 4.28: Erhöhte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen aus CD4IL10-KO-Mäusen nach *P. yoelii*-Infektion. Lymphozyten wurden aus der Milz von nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (Ktrl, weiße Balken), *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen (WT, schwarze Balken) und *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen (KO, dunkelgraue Balken) an Tag 7 p.i. isoliert, anschließend mit α CD4, α CD8 und α CD62L (A) oder α GzmB (B) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Um herauszufinden, ob funktionelle Unterschiede zwischen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus infizierten WT BALB/c Mäusen bestehen, wurde ein *in vitro* Proliferationstest durchgeführt. Dafür wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen (7 d p.i.), infizierten WT BALB/c (7 d p.i.) und nicht infizierten WT BALB/c Mäusen isoliert, CFSE gefärbt und zusammen mit DCs und α CD3 stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferationsrate über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt.

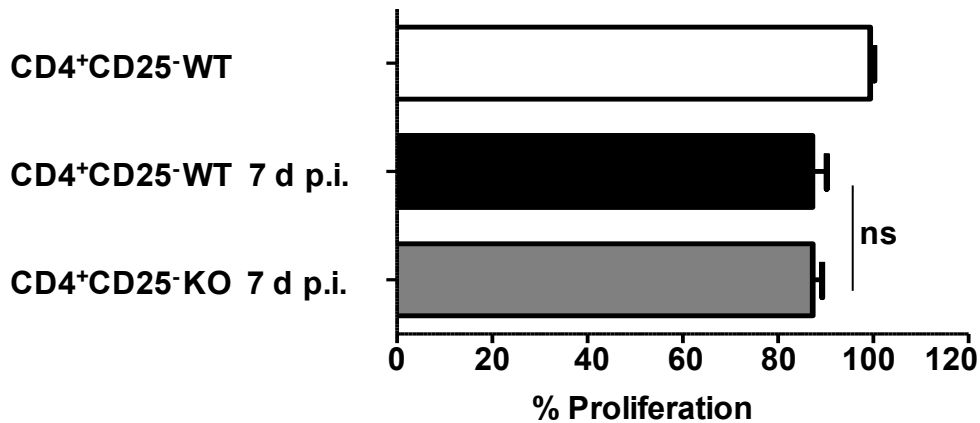


Abb. 4.29: Proliferationsaktivität von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden 7 Tage nach *P. yoelii*-Infektion aus infizierten WT BALB/c Mäusen (schwarze Balken), infizierten CD4IL10-KO Mäusen (dunkelgrauer Balken) oder aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (weiße Balken) isoliert, CFSE-markiert und in Gegenwart von CD11c⁺ DCs und αCD3 stimuliert. Die Proliferationsrate der CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes gemessen. Die Proliferationskapazität wurde auf das Proliferationsniveau der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (100 %) normalisiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns = nicht signifikant).

Wie in Abbildung 4.29 dargestellt wurde, konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus infizierten WT BALB/c und infizierten CD4IL10-KO Mäusen festgestellt werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass IL-10 aus CD4⁺ T-Zellen die Proliferationsrate von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion nicht beeinflusst. Darauf folgend wurde das Zytokinprofil der stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen, infizierten und nicht infizierten WT BALB/c Mäusen bestimmt.

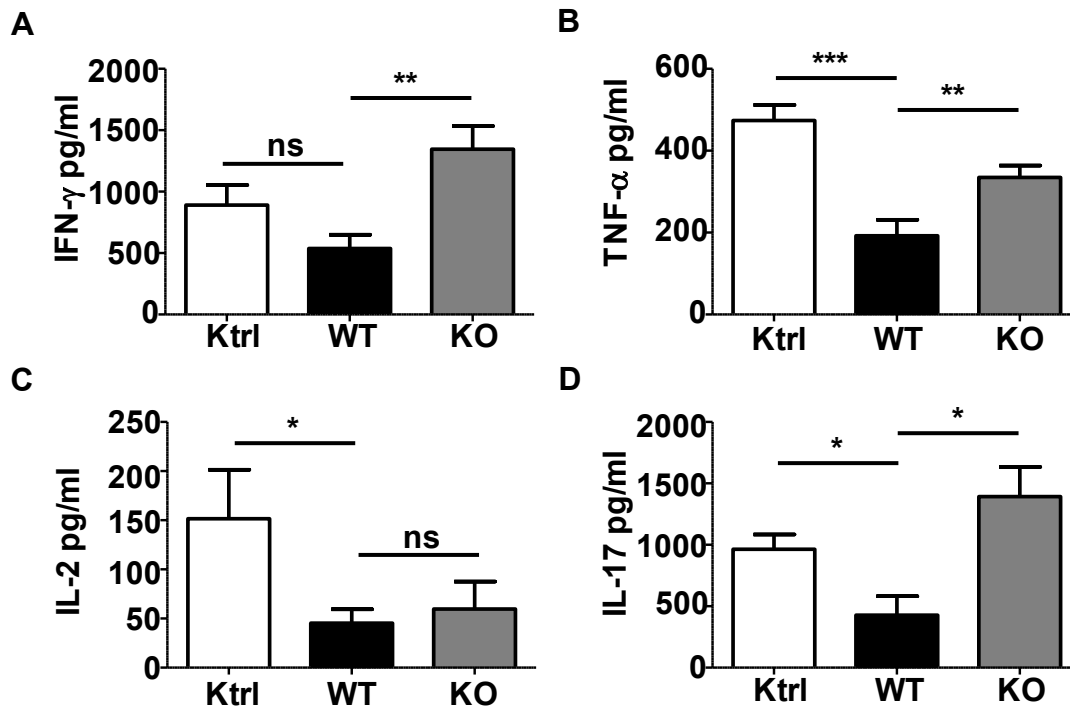


Abb. 4.30: Zytokinprofil von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen isoliert aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (Ktrl, weiße Balken), *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen (WT, schwarze Balken) und *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen 7 d p.i (KO, dunkelgraue Balken) wurden in Anwesenheit von CD11c⁺ DCs und α CD3 stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Sekretion von IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C) und IL-17 (D) mit Hilfe des *Cytokine assay kits* im Luminex gemessen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte in pg/ml mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen mit zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die Analyse des Zytokinprofils von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ (p < 0,01), TNF- α (p < 0,01) und IL-17 (p < 0,05) in infizierten CD4IL10-KO Mäusen (Abb. 4.30). In Übereinstimmung mit der verringerten proliferativen Aktivität von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus infizierten CD4IL10-KO und infizierten WT BALB/c Mäusen, ist die Sekretion von IL-2 in restimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen im gleichem Maße reduziert wie bei CD4⁺ T-Zellen aus infizierten WT BALB/c Mäusen (Abb. 4.30).

Zusammengefasst hat IL-10 aus CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion. Der IL-10 KO in CD4⁺ T-Zellen führt jedoch zu einer Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine sekretiert durch CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen und resultiert in einer signifikant verstärkten Aktivierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen nach *P. yoelii*-Infektion.

Da IL-10 während der *P. yoelii*-Infektion auch von Tregs erhöht exprimiert wird, stellte sich die Frage, wie sich der CD4⁺ T-Zell-spezifische IL-10-KO auf die Anzahl, den Phänotyp und auf das suppressive Potential von CD4⁺CD25⁺ Tregs nach der *P. yoelii*-Infektion auswirkt. Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, wurden CD4⁺Foxp3⁺ Tregs zuerst durchflusszytometrisch analysiert. Die FACS-Analyse zeigte, dass der Prozentsatz an CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in infizierten CD4IL10-KO Mäusen mit dem in infizierten WT BALB/c Mäusen vergleichbar war (Abb. 4.31, A). Es konnte zwar eine Erhöhung in der Absolutzellzahl an CD4⁺Foxp3⁺ Tregs bei *P. yoelii* infizierten WT BALB/c (WT) Mäusen und infizierten CD4IL10-KO (KO) Mäusen im Vergleich zu nicht infizierten, naiven WT BALB/c (Ktrl) Mäusen festgestellt werden, dieser wies allerdings keine Differenz zwischen infizierten WT BALB/c Mäusen und infizierten CD4IL10-KO Mäusen auf (Abb. 4.31, B).

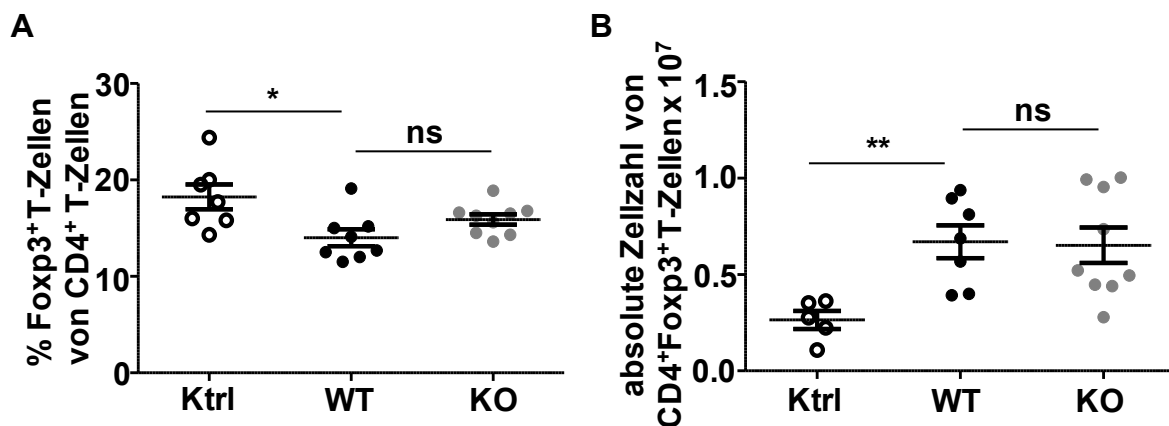


Abb. 4.31: Prozentuale und absolute Anzahl CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen. Lymphozyten wurden aus der Milz von nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (Ktrl), *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen (WT) und *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen (KO) an Tag 7 p.i. isoliert, anschließend mit αCD4, αCD25 und αFoxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (A) sowie die Absolutzellzahl bestimmt (B). Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (**p < 0,01; *p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Für die weitere durchflusszytometrische Analyse von CD4⁺CD25⁺ Tregs, isoliert aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ Tregs aus infizierten WT BALB/c und nicht infizierten WT BALB/c, wurden die Moleküle Garp und CD103 ausgewählt. Garp (*glycoprotein-A repetitions predominant*) stellt einen kürzlich beschriebenen Aktivierungsmarker dar, der nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptors auf Tregs hochreguliert wird und maßgeblich zu ihrem suppressiven Phänotyp beiträgt (Probst-Kepper et al., 2009). CD103⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs repräsentieren eine Subpopulation von Tregs, die eine höhere suppressive Fähigkeit

als CD103⁻CD4⁺CD25⁺ Tregs besitzen (Lehmann et al., 2002). Die phänotypische Analyse von CD4⁺CD25⁺ Tregs isoliert aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen und *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen zeigte einen signifikant höheren Anteil Garp⁺ Tregs im Vergleich zu nicht infizierten, naïven WT BALB/c Mäusen. Jedoch war der Anteil Garp⁺ Tregs in *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen signifikant geringer als in *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen (Abb. 4.32, A). Auf CD4⁺CD25⁺ Tregs isoliert aus *P. yoelii* infizierten, naïven WT BALB/c konnte im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ Tregs aus nicht infizierten, naïven WT BALB/c Mäusen eine signifikant erhöhte Expression von CD103 gemessen werden, die auf CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen noch weiter signifikant anstieg (Abb. 4.32, B). Somit waren Tregs aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen weniger aktiviert, exprimierten jedoch einen höheren Anteil CD103.

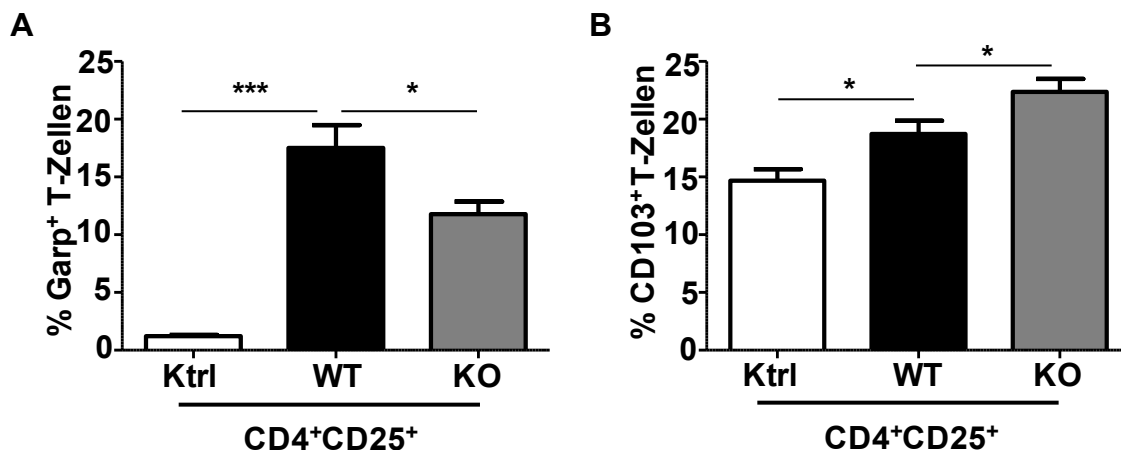
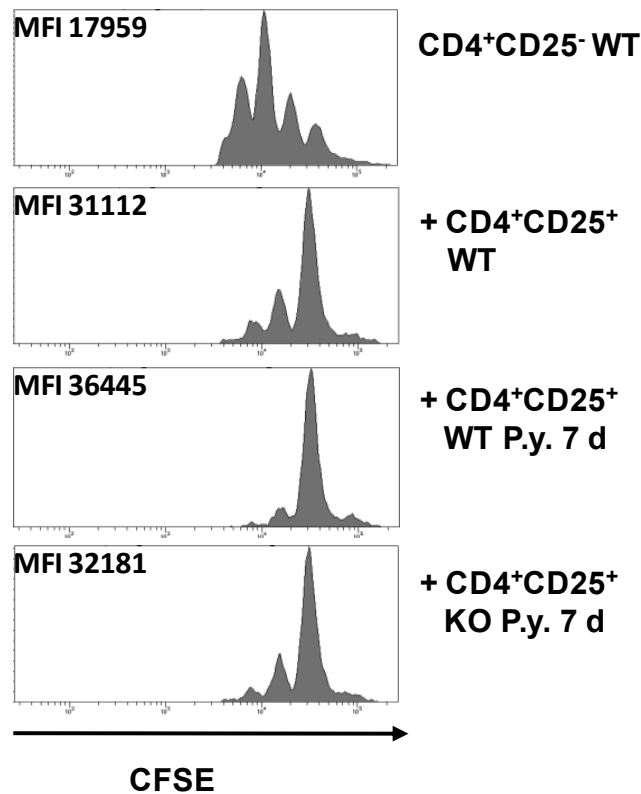


Abb. 4.32: Reduzierte Garp- und erhöhte CD103-Expression auf CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen. Lymphozyten wurden aus der Milz von nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (Ktrl, weiße Balken), *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen (WT, schwarze Balken) und *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen (KO, dunkelgraue Balken) an Tag 7 p.i. isoliert, anschließend mit α CD4, α CD25 und mit α Garp (A) oder α CD103 (B) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Mäusen. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (***p < 0,001; *p < 0,05).

Um zu untersuchen, ob die Detektion der CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10-Produktion zudem einen Einfluss auf das immunsuppressive Potential von Tregs hat, wurde ein *in vitro* Inhibitionstest durchgeführt. Dafür wurden sortierte CD4⁺CD25⁺ Tregs aus nicht infizierten WT BALB/c, *P. yoelii* infizierten WT BALB/c und *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen 7 d p.i. isoliert und jeweils mit CFSE-gefärbten CD4⁺CD25⁻ Responder T-Zellen, isoliert aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen 1:1 kostimuliert. Als Kontrolle dienten CFSE-gefärbte, kultivierte CD4⁺CD25⁻ Responder T-Zellen

ohne Tregs. Die Proliferationsrate der $CD4^+CD25^-$ Responder T-Zellen wurde über die Abnahme von CFSE durchflusszytometrisch bestimmt.

A



B

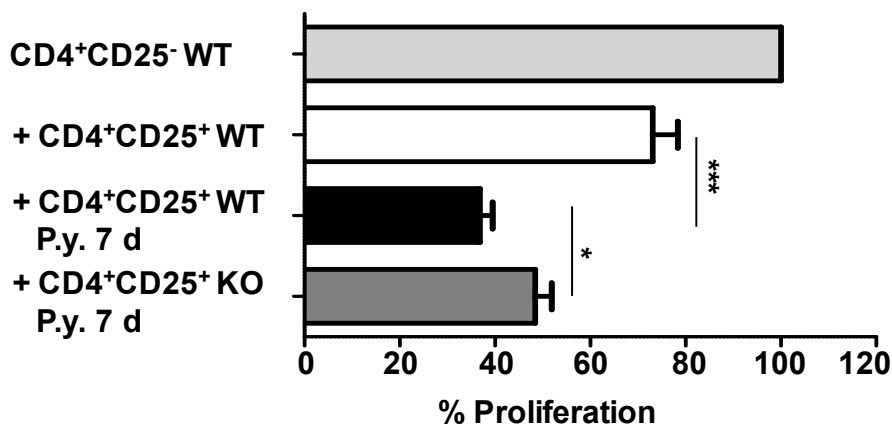


Abb. 4.33: Verringerte suppressive Fähigkeit von $CD4^+CD25^+$ Tregs aus *P. yoelii* infizierten $CD4IL10$ -KO Mäusen. $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen isoliert aus *P. yoelii* infizierten $CD4IL10$ -KO Mäusen, infizierten WT BALB/c oder nicht infizierten WT BALB/c Mäusen, wurden im Verhältnis 1:1 zusammen mit CFSE-markierten, naiven $CD4^+CD25^-$ Responder T-Zellen kostimuliert. Die Proliferationsrate der CFSE-markierten $CD4^+CD25^-$ Responder T-Zellen wurde über die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt. Die Histogramme des *in vitro* Inhibitionstests zeigen die Proliferation von CFSE-markierten $CD4^+CD25^-$ Responder T-Zellen und stellen ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen dar. Angegeben ist der *Mean Fluorescent Intensity* (MFI) (A). Die Proliferationskapazität wurde auf das Proliferationsniveau der $CD4^+CD25^-$ Responder T-Zellen aus nicht infizierten WT BALB/c Mäusen (100 %) normalisiert. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit zwei bis drei Mäusen (B). Die statistischen Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$).

Wie bereits in Abbildung 4.6 gezeigt wurde, konnte das höhere immunsuppressive Potential von CD4⁺CD25⁺ Tregs isoliert aus *P. yoelii* infizierten WT BALB/c im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ Tregs aus nicht infizierten WT BALB/c erneut bestätigt werden. CD4⁺CD25⁺ Tregs aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen hingegen besitzen ein signifikant geringeres ($p < 0,01$) suppressives Potential, als CD4⁺CD25⁺ Tregs aus infizierten WT BALB/c. Jedoch war ihr suppressives Potential immer noch größer, als das von CD4⁺CD25⁺ Tregs aus nicht infizierten WT BALB/c (Abb. 4.33). Des Weiteren wurde der Einfluss des CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10 *knock-outs* auf die Parasitämie während des *P. yoelii*-Infektionsverlaufs zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Analyse der Parasitämie während der *P. yoelii*-Infektion von CD4IL10-KO Mäusen, zeigte eine verminderte Parasitämie an Tag 7, 12 und 15 p.i. im Vergleich zu infizierten WT BALB/c Mäusen (Abb. 4.34).

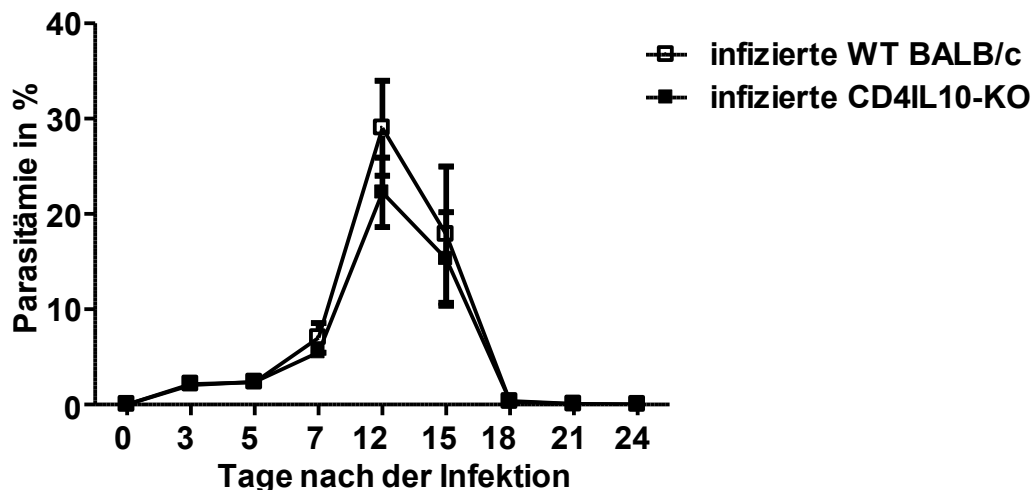


Abb. 4.34: Verlauf der Parasitämie in CD4IL10-KO Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen nach *P. yoelii*-Infektion. An Tag 3, 5, 7, 12 bis Tag 24 nach *P. yoelii*-Infektion von CD4IL10-KO (schwarze Quadrate) und WT BALB/c Mäusen (weiße Quadrate) mit 1×10^5 *P. yoelii*-iRBCs wurde aus der Schwanzvene der infizierten Maus ein Tropfen Blut entnommen, auf einem Objektträger ein *Monolayer* von Erythrozyten erzeugt und darauffolgend eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Die Parasitämie von insgesamt 6 *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO und infizierten WT BALB/c Mäusen wurde unter dem Lichtmikroskop mittels 100 x Okular bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Insgesamt führte die Infektion mit *P. yoelii* zur Induktion der IL-10 Produktion in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. Durch die CD4⁺ T-Zell-spezifische Deletion von IL-10 konnte gezeigt werden, dass IL-10 auch tatsächlich an der Aktivierung und suppressiven Fähigkeit von Tregs im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion beteiligt war. So zeigten IL-10 defiziente CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten Tieren eine geringere Expression von Garp und eine geringere suppressive Aktivität, als CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten WT Mäusen. Allerdings führte die

Depletion der IL-10 Produktion in CD4⁺ T-Zellen nicht zu einer signifikanten Änderung der Parasitämie.

5 Diskussion

Eine effektive, adäquate Immunantwort ist wichtig, um eine Infektion mit *Plasmodium spec.* erfolgreich zu bekämpfen. Die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems ist dabei von großer Bedeutung. Während einer Infektion mit *Plasmodium* entsteht eine starke pro-inflammatorische Reaktion des Immunsystems, die zum einen durch Toleranzmechanismen kontrolliert werden muss, aber andererseits ausreichenden Schutz gegen das invadierende Pathogen gewährleisten sollte. Jedoch führt eine maßlose, unkontrollierte Immunantwort während der Infektion mit *Plasmodium* zu Immunpathologien wie Leberentzündungen und zerebraler Malaria (Belkaid, 2007; Hafalla et al., 2011). Bei der Aufrechterhaltung und Induktion von Immuntoleranz spielen Tregs eine große Rolle (Sakaguchi und Powrie, 2007). In den letzten Jahren gewann die Relevanz von Tregs im Verlauf von Infektionskrankheiten zunehmend an Bedeutung (Belkaid, 2007).

Während der Koevolution von Parasit und Wirt hat *Plasmodium* mehrere Mechanismen entwickelt, um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. So verzögert die Änderung des Antigenphänotyps während der Entwicklungsphase vom Sporozoiten zum Merozoiten die Eliminierung durch das Immunsystem und führt folglich zu einer chronischen Infektion (Hafalla et al., 2011; Tarun et al., 2008; Williams und Azad, 2010). Des Weiteren umgehen die Parasiten, durch den Transport von Merozoiten in einem aus Wirtsmembran bestehenden vesikulären Merosom vom Hepatozyten bis zum Erythrozyten, die Gefahr z.B. von Makrophagen erkannt und phagozytiert zu werden (Baer et al., 2007; Sturm et al., 2006). Die Induktion von Tregs durch den Parasiten und die damit zusammenhängende Suppression pro-inflammatorischer Immunantworten, könnte einen weiteren Immunfluchtmechanismus von *Plasmodium* darstellen.

Tatsächlich zeigte die Analyse der T-Zellen im Infektionsverlauf von *P. yoelii* eine Expansion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (Abb. 4.5), die ein verstärktes suppressives Potential aufwies (Abb. 4.6), sowie eine reduzierte Aktivierung und eine verminderte Proliferationsfähigkeit von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen (Abb. 4.18 und Abb. 4.9). Eine Erhöhung von Foxp3⁺ Tregs konnte auch in anderen *Plasmodien*-Infektionen beobachtet werden. So führte die *P. falciparum* Infektion ebenfalls zu einer Erhöhung von Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs und TGF- β in PBMCs von infizierten

Individuen (Walther et al., 2005). Scholzen et al. beobachteten, dass $CD25^{\text{high}}Foxp3^{\text{high}}CD4^+$ T Zellen während der *P. falciparum*-Infektion abhängig von IL-2, IL-10 und TGF- β induziert wurden und keine Stimulierung des TCRs durch APCs benötigen. Sie postulierten, dass die Induktion der Tregs durch den Parasiten antigenunspezifisch erfolgt (Scholzen et al., 2009). Darüber hinaus wurde während der *P. yoelii*-Infektion auch eine erhöhte Menge TGF- β , sekretiert durch in die Milz migrierte DCs, festgestellt (Ocana-Morgner et al., 2007). Es ist bekannt, dass TGF- β zum einen selbst suppressive Fähigkeiten besitzt und zum anderen aber auch an der Induktion von Tregs beteiligt ist (Shevach, 2006; Vignali et al., 2008). So konnten Kretschmer und Kollegen durch antigenbeladene DCs in Anwesenheit von TGF- β , in der Peripherie $Foxp3^+$ Tregs induzieren (Kretschmer et al., 2005). Darüber hinaus führte die Stimulierung des TCRs in Gegenwart von TGF- β *in vitro* zu einer Konversion von murinen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (W. Chen et al., 2003). Die erhöhten Mengen an $Foxp3^+$ Tregs während der *P. yoelii*-Infektion könnten also durch Parasiten Antigene selbst oder durch die Induktion der TGF- β Sekretion in peripheren lymphatischen Organen hervorgerufen worden sein. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch weitgehend unverstanden.

Eine Möglichkeit den Einfluss von Tregs auf den Krankheitsverlauf der *Plasmodium*-Infektion zu analysieren, bietet die Treg-Depletion durch die Applikation von anti-CD25-Antikörper. Jedoch zeigten die bisherigen Experimente dieser Depletionsstudien, im Hinblick auf die Funktion und Relevanz von Tregs während der *Plasmodium*-Infektion, kontroverse Ergebnisse. Die Resultate variieren abhängig vom *Plasmodium*-Stamm, des Zeitpunkts der Versuchsdurchführung sowie der verwendeten Mauslinie. So verzögerte die Treg-Depletion in *P. berghei* NK65 infizierten BALB/c Mäusen den Infektionsverlauf, endete aber dennoch tödlich (Long et al., 2003). Wohingegen ein tödlicher Verlauf durch Treg-Depletion im *P. yoelii* lethal C57BL/6 Maus-Infektionsmodell verhindert werden konnte (Hisaeda et al., 2004). *P. berghei* ANKA infizierte C57BL/6 Mäuse produzierten nach Applikation eines anti-CD25-Antikörpers erhöhte Mengen IFN- γ und reduzierte Mengen an IL-10. Weiterhin konnte eine weniger stark ausgeprägte CM beschrieben werden (Amante et al., 2007).

Allerdings exprimieren nicht nur $Foxp3^+$ Tregs CD25 auf ihrer Oberfläche. Unter $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ T-Zellen können sich auch kürzlich aktivierte T-Zellen befinden,

die durch diese Methode ebenfalls depletiert werden würden. Des Weiteren gibt es neben CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs auch eine kleine Population von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (Fontenot et al., 2005; Roncador et al., 2005), die kein CD25 exprimieren (wie in dieser Arbeit in Abb. 4.5 gezeigt ist) und der Depletionsmethode durch die Injektion von anti-CD25-Antikörpern entgehen würden.

Um den Einfluss von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs auf den Infektionsverlauf von *P. yoelii* zu untersuchen, wurden CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in dieser Arbeit mit Hilfe des DEREK-Mausmodells depletiert. Transgene DEREK Mäuse exprimieren einen Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors. Eine effiziente und spezifische Depletion von Foxp3⁺ Tregs erfolgt durch die Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) (Lahl et al., 2007) (Abb. 4.7, B). Daher stellt die DEREK Maus zurzeit das beste Mausmodell zur gezielten und effizienten Depletion von Foxp3⁺ Tregs dar.

Die Depletion von Tregs in *P. yoelii* infizierten DEREK BALB/c Mäusen durch die Injektion von DT, führte zu einer signifikant verstärkten Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie zu einer signifikanten Reduktion der Parasitämie im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion (Abb. 4.8, Abb. 4.9 und 4.10, C).

Steeg und Kollegen verwendeten kürzlich ebenfalls das DEREK Mausmodell zur Analyse der CM bei der *P. berghei* ANKA Infektion von C57BL/6 Mäusen. Nach erfolgreicher Treg-Depletion konnten Steeg und Kollegen allerdings weder eine signifikante Veränderung in der Parasitämie noch in der Häufigkeit und Intensität der CM feststellen (Steeg et al., 2009). Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Anzahl an Tregs in naiven und infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen sein. CM resistente BALB/c Mäuse weisen einen höheren Anteil an CD4⁺Foxp3⁺ Tregs auf, als für CM anfällige C57BL/6 Mäuse (X. Chen et al., 2005; Griffith et al., 2007). Haque und Kollegen bestätigten diese Vermutung. Sie beobachteten nach DT vermittelter Treg-Depletion ebenfalls keine signifikante Veränderung der Parasitämie und keine Erhöhung der CM in *P. berghei* ANKA infizierten C57BL/6 DEREK Mäusen. Allerdings konnte nach Erhöhung der CD4⁺Foxp3⁺ Tregs durch die Applikation von IL-2/anti-IL-2 Antikörper-Komplexen die Entstehung einer CM in *P. berghei* ANKA infizierten C57BL/6 DEREK Mäusen verhindert werden. Die anschließende Depletion der Foxp3⁺ Tregs durch die Injektion von DT hob diesen Effekt auf (Haque et al., 2010). Demzufolge scheint die

Anzahl und Funktion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs für den Verlauf der *Plasmodium* Infektion von großer Relevanz zu sein.

Innerhalb der ethnischen Gruppe der Fulani, die nach einer Infektion mit *P. falciparum* selten eine schwere klinische Malaria entwickeln, konnte eine verminderte Treg-Funktion, charakterisiert durch die reduzierte Foxp3-Expression, festgestellt werden (Torcia et al., 2008). Die phänotypischen Treg-Analysen von Malariapatienten aus West Papua offenbarte eine erhöhte Expression von Foxp3 zusammenhängend mit verstärkter suppressiver Treg-Funktion in Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf, aber nicht in Patienten mit einer unkomplizierten, milden Malaria (Minigo et al., 2009). Weiterhin korrelierte die Expansion von Tregs während der *P. vivax* Infektion mit einer Erhöhung der Parasitämie (Jangpatarapongsa et al., 2008; Walther et al., 2009).

Insgesamt zeigte sich somit, dass Tregs den Verlauf der *Plasmodium*-Infektion stark beeinflussen. Somit stellen sie ein vielversprechendes *Target* für die Therapie der Malaria dar.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte stellt dabei allerdings das Verständnis der Mechanismen die zu ihrer Expansion führen, sowie die Identifizierung der während einer *Plasmodium*-Infektion zum Einsatz kommenden Suppressionsmechanismen dar. Um einen genaueren Einblick in den molekularen Treg-Phänotyp während der *P. yoelii*-Infektion zu erlangen, wurden Microarray Analysen durchgeführt. Unsere Microarraydaten zeigten ein *P. yoelii* spezifisches Profil differentiell exprimierter Gene in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion. So konnte z.B. eine erhöhte Expression von Treg-spezifischen Genen wie CD103, GzmB, SOCS2, GITR, Penk-1, Garp, Klr1, Lag3, CTLA-4, PD-1 und IL-10 in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs nach der *P. yoelii*-Infektion festgestellt und durchflusszytometrisch sowie mittels Real-Time PCR bestätigt werden (vgl. Abb. 4.14, Abb. 4.15 und Abb. 4.16).

Tregs, die CD103 exprimieren, repräsentieren eine Subpopulation von Tregs mit hohen suppressiven Fähigkeiten (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002). Während der Infektion von *Heligmosomoides polygyrus* konnte eine Expansion von CD103⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs beobachtet werden (Finney et al., 2007). Des Weiteren konnten McSorley et al. bei der Infektion von *Brugia malayi* ebenfalls eine erhöhte Expression von CD103⁺ auf Tregs nach der Infektion feststellen (McSorley et

al., 2008). Suffia und Kollegen postulierten, dass die beobachtete, erhöhte Expression von CD103 auf Tregs während der Infektion mit *Leishmania major* massiv dazu beiträgt Tregs am Ort der Infektion zu halten, um dadurch inflammatorische Immunantworten zu unterdrücken. So waren CD103-KO Mäuse resistent gegen eine Infektion mit *Leishmania major* (Suffia et al., 2005). Daher könnten CD103⁺ Tregs, isoliert von Milzen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen eine Subpopulation rekrutierter Tregs darstellen.

GzmB ist ein zytolytisches Protein, das als Effektormolekül für CTLs von großer Bedeutung ist. Es wird auch von murinen Tregs exprimiert (McHugh et al., 2002; Russell und Ley, 2002). und kann die gezielte Zytolyse von *Targetzellen* bewirken (Cao et al., 2007; Gondek et al., 2005). Die erhöhte Expression in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs nach der *P. yoelii*-Infektion deutet auf eine verstärkte zytolytische Aktivität dieser Zellen hin. Weiterhin konnte durch die Depletion von Tregs eine signifikante Erhöhung GzmB⁺CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Abb. 4.10, C).

SOCS2 supprimiert Zytokin vermittelte Signale und wird erhöht von Tregs exprimiert (Sugimoto et al., 2006). Eine SOCS2-Defizienz resultiert in einer unkontrollierten inflammatorischen Immunantwort (Machado et al., 2006). Dies könnte darauf hindeuten, dass die erhöhte Produktion von SOCS2 auf CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs nach der *P. yoelii*-Infektion auch ein Grund für die reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen sein könnte (Abb. 4.19).

GITR repräsentiert einen inhibitorischen Rezeptor und Treg-Marker, der nach Stimulation in der Lage ist, inhibitorische Funktionen zu modulieren (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002).

Penk-1 ist ein Vorläuferprotein für opioide Neuropeptide (Noda et al., 1982). Es scheint einen negativen Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen zu haben (Hook et al., 2003; Kamphuis et al., 1998). Die Funktion von Penk-1 während der *P. yoelii*-Infektion ist allerdings noch nicht bekannt.

Das Treg-spezifische Gen Garp wird nach Aktivierung von Tregs hochreguliert und trägt zu ihrem suppressiven Phänotyp bei (Probst-Kepper et al., 2009). Die signifikante Erhöhung von Garp⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs im Infektionsverlauf indiziert einen aktivierten Phänotyp dieser Tregs nach *P. yoelii*-Infektion (Abb. 4.32, A). Dies könnte ein weiterer Grund für die erhöhte suppressive Aktivität von Tregs aus *P. yoelii* infizierten Mäusen sein.

Die erhöhte Expression von CD103, SOCS2, GITR, Penk-1 und Garp auf Tregs könnten für das verstärkte suppressive Potential von Tregs aus *P. yoelii* infizierten Mäusen verantwortlich sein. Interessanterweise identifizierten Layland et al. bei Genexpressionsanalysen mittel Microarray-Technologie von CD4⁺CD25⁺ Tregs aus Mäusen, die mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* infiziert waren, ein Genexpressionsprofil, in dem ebenfalls Gene wie CTLA-4, GzmB, Klr1, Penk-1 und SOCS2 erhöht exprimiert vorlagen (Layland et al., 2010). Zurzeit ist jedoch noch weitestgehend unklar, welche dieser Moleküle und welche Suppressionsmechanismen während der *P. yoelii*-Infektion von BALB/c Mäusen zum Einsatz kommen. Die Daten dieser Arbeit präsentieren jedoch gute Ansatzpunkte für in Frage kommende Suppressionsmechanismen von Tregs während der *Plasmodium* Infektion.

Im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion kommt es außerdem zu einer verstärkten Expression der Moleküle Lag3, CTLA-4 und PD-1 auf CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und auch auf CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen (Abb. 4.15 A-C). Darüber hinaus konnten auch erhöhte Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in beiden Populationen nachgewiesen werden (Abb. 4.16, D). Diese inhibitorischen Moleküle können die Proliferation und Aktivierung von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen ebenfalls negativ beeinflussen und darüber hinaus zum verstärkten suppressiven Phänotyp von Tregs beitragen.

Lag3 ist als CD4 Homolog dazu fähig an MHC Klasse-II Moleküle zu binden und so Reifungssignale für DCs zu unterbinden (Liang et al., 2008). Okamura et al. konnten zeigen, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen die Lag3 exprimieren: suppressive Eigenschaften aufweisen und IL-10 produzieren (Okamura et al., 2009). Ob die während der Infektion mit *Plasmodium* beobachtete Expansion von CD4⁺CD25⁻Lag3⁺ T-Zellen (Abb. 4.15, B) auch eine Population mit suppressiven Fähigkeiten darstellt und ebenfalls eine mögliche Quelle an IL-10 produzierenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ist, muss in weiterführenden Experimenten noch genauer untersucht werden. Durch die Depletion von Foxp3⁺ Tregs nach *P. yoelii*-Infektion stieg der prozentuale Anteil Lag3⁺CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen noch weiter signifikant an ($p < 0,05$). Dies könnte auf einen eventuellen regulatorischen Effekt von Lag3 hindeuten, der die ausbleibende Immunsuppression durch Foxp3⁺ Tregs kompensieren soll (Abb. 4.10, A).

Das CD28 Homolog CTLA-4 kann die Aktivierung von T-Zellen verhindern, indem es an die kostimulatorischen Bindungsstellen CD80/CD86 auf DCs bindet und darüber hinaus die Induktion vonIDO fördert (Fallarino et al., 2003; Mellor et al., 2004; Read et al., 2000). Mutationen im *ctla-4* Gen resultieren in Autoimmunkrankheiten (Ueda et al., 2003). Darüber hinaus ist CTLA-4 in die komplexen Mechanismen der peripheren Toleranz involviert (Ueda et al., 2003) und für die suppressive Funktion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs entscheidend (Wing et al., 2008).

Während der akuten Malaria einer *P. falciparum* Infektion und während der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *P. berghei* konnte ebenfalls ein immenser Anstieg von CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden (Jacobs et al., 2002; Schlotmann et al., 2000). Lepenies und Kollegen zeigten, dass die Applikation von anti-CTLA-4 während der *P. yoelii non lethal* Infektion von BALB/c Mäusen mit einer erhöhten Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, vermehrten IFN- γ Produktion und geringerer Parasitämie einhergeht. Wohingegen die Blockade von CTLA-4 während der Infektion mit *P. yoelii lethal* in einem immensen Anstieg von TNF- α , erhöhter Entzündungsrate und reduziertem Überleben resultierte (Lepenies et al., 2007). Sie postulierten, dass der schnelle Anstieg von CTLA-4⁺CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine kritische Rolle in der negativen Regulation der starken, inflammatorischen Immunantwort während einer Malariainfektion spielt, um Immunpathologien wie CM zu vermeiden. Sie beobachteten einen größeren Anteil CTLA4⁺CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen als CTLA4⁺CD4⁺Foxp3⁺ Tregs während der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *P. berghei* (Jacobs et al., 2002; Lepenies et al., 2007).

Im Gegensatz dazu zeigten die T-Zellanalysen dieser Arbeit einen höheren prozentualen Anteil von CTLA4⁺CD4⁺Foxp3⁺ Tregs nach der *P. yoelii*-Infektion von BALB/c Mäusen. Diese Beobachtung könnte eventuell auf die ohnehin erhöhte Anzahl von Tregs in BALB/c Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen zurückzuführen sein (X. Chen et al., 2005).

PD-1 gehört ebenfalls zu der CD28-Familie, wird nach Aktivierung von T-Zellen erhöht exprimiert und beeinflusst ihre Funktion negativ, was bei einer starken Immunantwort die Aktivität des Immunsystems reduzieren soll (Freeman et al., 2000; Lechner et al., 2001). Während der Infektion mit dem HI-Virus, konnte eine PD-1/PD-1L Blockade in HIV-spezifischen, *exhausted* CD8⁺ T-Zellen wieder eine effektive Immunantwort hervorrufen (Freeman et al., 2006). Eine kombinierte Blockade von

PD-1 und CTLA-4 während der Hepatitis-C-Virus Infektion führte ebenfalls zur Wiedererlangung der Funktionalität von CD8⁺ T-Zellen (Nakamoto et al., 2009).

Eine spezifische Blockade der oben aufgeführten nach *P. yoelii*-Infektion hochregulierten Moleküle wie CTLA-4, PD-1 und Lag3, allein oder in Kombination, könnte zu einer Wiedererlangung der Proliferationskapazität sowie zu einer erhöhten Produktion anti-inflammatorischer Zytokine und somit zu einem verstärkten aktivierten Phänotyp von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen führen. Inwieweit dieser Ansatz tatsächlich zur vollständigen Beseitigung des Parasiten führt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Insgesamt konnte durch die vergleichenden Genexpressionsanalysen eine Reihe an Molekülen identifiziert werden, die im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion verstärkt exprimiert werden. Diese Moleküle könnten zum einen direkt in den suppressiven Phänotyp der Tregs involviert sein, Treg-Subpopulationen mit erhöhter inhibitorischer Kapazität identifizieren oder aber im Zusammenhang mit Treg-Aktivierung stehen. Ob ein oder mehrere Moleküle wichtig für die Expansion und erhöhte suppressive Fähigkeit von Tregs sind und wie genau es zu einer Expansion, Rekrutierung oder Induktion von Tregs während der *P. yoelii*-Infektion kommt, erfordert detailliertere Untersuchungen und muss in zukünftigen Experimenten noch genauer analysiert werden. Die Identifizierung pathogen-spezifischer Treg-Oberflächenmoleküle, könnte dazu beitragen pathogen-spezifischen Subpopulationen aus dem Zellgemisch zu isolieren, um sie phänotypisch weiter zu charakterisieren und letztendlich zu modulieren.

Interessanterweise konnte im Infektionsverlauf von *P. yoelii* die Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nicht nur in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sondern auch in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen festgestellt werden. Es ist bekannt, dass IL-10 im Verlauf einer Infektion eine große Rolle spielt. IL-10 ist dazu fähig, die inflammatorischen Immunreaktionen, durch die Inhibition der Effektorfunktionen von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen zu hemmen und so die vollständige Beseitigung des Pathogens zu verhindern, aber gleichzeitig das Risiko von kollateralen Gewebeschäden zu reduzieren. IL-10 kann neben T-Zellen auch von B-Zellen, Makrophagen und DCs produziert werden (Couper et al., 2008a). So führte die Neutralisierung von IL-10 und TGF- β während einer Infektion mit *P. yoelii* *lethal* in

40 % der Fälle zu einer vollständigen Genesung der Tiere (Omer et al., 2003). Wohingegen die Infektion von IL-10-defizienten Mäusen mit *Toxoplasma gondii* in einer unkontrollierten Immunreaktion endete und die Tiere letztendlich schweren Immunpathologien erlagen (Gazzinelli et al., 1996).

Ferner können auch andere Pathogene, wie *Bordatella pertussis* die Produktion von IL-10 in kontaktierten Zielzellen des Immunsystems induzieren oder sogar selbst IL-10 Homologe produzieren wie z.B. das Epstein Barr Virus (McGuirk et al., 2002; Moore et al., 1990). Dadurch inhibieren sie das Immunsystem des Wirtes und schaffen vorteilhafte Bedingungen für ihr eigenes Überleben (Belkaid, 2007).

Urban und Kollegen konnten erstmals *in vitro* einen inhibierenden Einfluss von *P. falciparum* (*P.f.*) Parasiten auf die Reifung von DCs zeigen. Die Interaktion von *P.f. encoded erythrocyte membrane Protein (PfEMP)-1* des infizierten Erythrozyten und CD36 der DC, inhibiert die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Erhöhung des MHC-Klasse-II Komplexes, ICAM, CD40, CD80 und CD86. Dieses Phänomen führte folglich zu einer verringerten Antigenpräsentation und damit zusammenhängend zu einer reduzierten Immunantwort (Urban et al., 1999).

Durch die Sekretion von IL-10 besitzen tolerogene DCs darüber hinaus die Fähigkeit Tr1-Zellen zu induzieren (Jonuleit et al., 2000; Rutella et al., 2006). So führte die Sekretion von IL-10 durch von *Bordatella pertussis* modifizierten DCs im Infektionsverlauf zu einer Induktion von Tr1-Zellen (McGuirk et al., 2002). Ocana-Morgner et al. beobachteten weiterhin, dass DCs, die direkten Kontakt mit *P. yoelii* Parasiten der Blutphase aufwiesen eher anti-inflammatorisches IL-10 als pro-inflammatorisches IL-12 produzieren und nicht in der Lage waren CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen zu aktivieren (Ocana-Morgner et al., 2003; Ocana-Morgner et al., 2008).

Zusammengefasst ist IL-10 während Infektionen äußerst wichtig. Die zelluläre Quelle von IL-10 im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion ist jedoch noch nicht eindeutig bestimmt. Couper et al. identifizierten CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺CD127⁻ T-Zellen als Hauptproduzenten von IL-10 während der *P. yoelii*-Infektion und postulierten, dass es sich hierbei um immunsupprimierende Tr1-Zellen handelt (Couper et al., 2008b). Auch wir haben während der *P. yoelii*-Infektion eine erhöhte Produktion von IL-10 in CD25⁻ T-Zellen festgestellt. Um zu untersuchen, ob diese CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺IL-10⁺ T-Zellen tatsächlich suppressive Eigenschaften besitzen wurden in dieser Arbeit IL-10

produzierende CD4⁺ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Tieren mit Hilfe des neu etablierten „IL-10 Secretion Kits“ analysiert. Die erfolgreiche Isolierung der CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL10⁺ T-Zellen mittels „IL-10 Secretion Kit“ und die anschließende Analyse dieser Zellen zeigte, dass sie die Proliferation von stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht inhibieren konnten, jedoch in Kokultur die Menge an proinflammatorischen Zytokinen verringerten (Abb. 4.24 und Abb. 4.25). In Kokulturen von stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ T-Zellen konnte vermehrt das Zytokin IL-10 jedoch kein IL-2 und kaum TNF- α oder IL-4 gemessen werden.

Kürzlich konnten während der Infektion von *Leishmania major* und *Toxoplasma gondii* IL-10 produzierende T_H1-Zellen identifiziert werden (Anderson et al., 2007; Jankovic et al., 2007). Allerdings sind auch Tr1-Zellen in der Lage IL-10 und IFN- γ zu produzieren (Levings et al., 2001). Aufgrund der fehlenden IL-4 Produktion lassen sich T_H2-Zellen als IL-10 Produzenten ausschließen. Das fehlende suppressive Potential der IL-10 produzierenden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen lässt vermuten, dass es sich bei diesen Zellen nicht, wie von Couper et al. postuliert, um Tr1-Zellen handelt, sondern um sich selbst regulierende, IL-10 produzierende T_H1-Zellen. T_H1-Zellen beseitigen einerseits durch eine massive inflammatorische Immunantwort die Infektion im Wirt, können jedoch andererseits auch zu Immunpathologien führen (O'Garra und Vieira, 2007). Jedoch könnte sich unter den IL-10 produzierenden CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen auch eine Subpopulation Tr1-Zellen mit suppressiven Eigenschaften verbergen, die während der *P. yoelii*-Infektion induziert worden ist. Diese Tr1-Zellen könnten ebenfalls zu der verminderten Proliferation von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen *P. yoelii* infizierten WT BALB/c und zu dem festgestellten reduziert aktivierten T-Zell-Phänotyp geführt haben. Bisher ist allerdings kein spezifischer Oberflächenmarker für die Identifizierung von Tr1-Zellen bekannt.

Weitere Untersuchungen zur Rolle von IL-10 in CD4⁺ T-Zellen wurden mit der CD4IL10-KO Maus durchgeführt, deren CD4⁺ T-Zellen kein funktionsfähiges IL-10 produzieren (Roers et al., 2004). Der CD4⁺ T-Zell-spezifische IL-10-KO hatte keinen Einfluss auf die prozentuale sowie absolute Anzahl der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (Abb. 4.31). Vermutlich hat CD4⁺ T-Zell-produziertes IL-10 also keinen Einfluss auf

die Expansion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion. Darüber hinaus zeigten CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen eine geringere Suppressionsfähigkeit, als CD4⁺CD25⁺ Tregs aus *P. yoelii* infizierten WT BALB/c Mäusen, die jedoch immernoch stärker war, als die von CD4⁺CD25⁺ Tregs aus naiven, nicht infizierten WT Mäusen (Abb. 4.33). Dieses Resultat lässt schlussfolgern, dass IL-10 an der suppressiven Fähigkeit von Tregs in *P. yoelii* infizierten Mäusen beteiligt ist. Weiterhin wurde durch den CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10-KO auch die Garp-Expression auf Tregs signifikant reduziert ($p < 0,05$), was ein zusätzlicher Grund für die verminderte suppressive Aktivität von CD4⁺CD25⁺ Tregs aus infizierten CD4IL10-KO Mäusen sein könnte (Abb. 4.32, A). In dieser Arbeit konnten wir eine Erhöhung von CD103 auf Tregs aus *P. yoelii* infizierten Mäusen feststellen, die durch den CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10-KO noch weiter anstieg (Abb. 4.32, B). Der Anstieg von CD103⁺ Tregs (mit hoher suppressiver Aktivität, Lehmann et al., 2002), könnte mit der Kompensation des CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10-KO und der damit verbundenen verminderten suppressiven Treg-Aktivität zusammenhängen. Inwieweit die IL-10 Produktion direkt an der Expression von Garp und CD103 beteiligt ist, ist noch ungeklärt. Es könnte sich dabei auch um sekundäre Effekte handeln.

Die Analyse der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten IL-10-KO Mäusen zeigte, dass der CD4⁺ T-Zell-spezifische IL-10-KO nicht zu einer Wiedererlangung der Proliferationsfähigkeit von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen führte (Abb. 4.29). Allerdings konnte eine Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine sekretiert durch CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten CD4IL10-KO Mäusen beobachtet werden (Abb. 4.30). Des Weiteren konnte nach CD4⁺ T-Zell-spezifischem IL-10-KO auch ein signifikanter Anstieg GzmB⁺CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Abb. 4.28, B). Diese Erhöhung war jedoch geringer, als nach der Foxp3⁺ Treg-Depletion in DT-behandelten *P. yoelii* infizierten DEREK Mäusen (Abb. 4.10, C), was darauf hindeutet, dass eventuell andere inhibitorische Treg-spezifische Moleküle, als IL-10 die GzmB Induktion in CD8⁺ T-Zellen unterbinden.

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass CD4⁺ T-Zell-spezifisches IL-10 zwar an der erhöhten suppressiven Kapazität von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion beteiligt ist, allerdings nur einen limitierten Einfluss auf die

Beseitigung des Parasiten hat, da keine signifikanten Unterschiede in der Parasitämie im Infektionsverlauf beobachtet wurden.

In dieser Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass Foxp3⁺ Tregs eine wichtige Rolle während der *P. yoelii*-Infektion spielen, da eine Foxp3⁺ Treg-spezifische Depletion mit Hilfe der DEREK Maus zu einer signifikant verringerten Parasitämie und einer signifikant verstärkten Aktivierung von CD4⁺ sowie auch von CD8⁺ T-Zellen geführt hat. Des Weiteren ist IL-10 in die Treg Funktion während der *P. yoelii*-Infektion involviert, aber nicht allein für die verstärkte suppressive Funktion von Tregs verantwortlich. Zusätzlich scheinen noch andere immunsuppressive Mechanismen und weitere inhibitorische Moleküle, wie z.B. CTLA-4, Lag3, GITR oder PD-1 eine tragende Rolle während der *P. yoelii*-Infektion zu spielen. Ein CD4⁺ T-Zell-spezifischer IL-10-KO führte zwar zu einer verminderten Parasitämie, jedoch lag diese in infizierten CD4IL10-KO Mäusen nicht signifikant reduziert vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden noch eine Reihe an weiteren Molekülen identifiziert, die während der *P. yoelii*-Infektion ausschließlich auf Tregs hochreguliert vorlagen. Zusammen mit den Ergebnissen von Layland et al., die ebenfalls Moleküle identifizieren konnten, die nach Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* spezifisch in CD4⁺CD25⁺ Tregs verstärkt exprimiert wurden (Layland et al., 2010), könnten so Parasiten-spezifische-Treg-Gene identifiziert werden. So konnte beispielsweise für Penk-1 eine verstärkte Expression auf Tregs sowohl nach *Schistosoma mansoni* (Layland et al., 2010), als auch nach *P. yoelii*-Infektion (Abb. 4.16) nachgewiesen werden, was eine Beteiligung dieses Moleküls an der Funktion von Tregs während Parasiteninfektionen nahelegt und in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden soll.

Insgesamt ist das genaue Verständnis der Rolle von Tregs und inhibitorischen Molekülen während der *Plasmodium*-Infektion für die Bekämpfung der Malaria durch die Entwicklung neuer Medikamente oder eines effizienten Impfstoffes von äußerster Relevanz. Die Balance zwischen Immunantwort und Toleranzinduktion ist dabei der kritische Faktor. Die Identifizierung spezifischer Moleküle, die ausschließlich während der Infektion mit Parasiten bzw. *Plasmodium* erhöht auf Tregs exprimiert werden und an der Treg-Funktion beteiligt sind, würde gute *Targets* für eine gezielte Modifikation pathogen-spezifischer Tregs bzw. ausgewählter Moleküle während der murinen und

humanen Malaria bereitstellen. Die spezifische und temporäre Modulation der Immunantwort ist dabei von großer Bedeutung, um Immunpathologien vorzubeugen, jedoch gleichzeitig eine Beseitigung des Parasiten zu gewährleisten.

6 Zusammenfassung

Der Verlauf einer Infektion mit *Plasmodium* wird durch die Homöostase des Immunsystems bestimmt. Es muss einerseits die Eliminierung des Parasiten durch eine adäquate Immunantwort garantieren, jedoch andererseits Immunpathologien, die durch eine starke pro-inflammatorische Immunantwort verursacht werden, verhindern. Welchen Einfluss Tregs auf den Infektionsverlauf haben, sowie ihr genauer molekularer Phänotyp ist noch weitestgehend unverstanden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es während der *P. yoelii*-Infektion zu einer Expansion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs kommt, die zudem eine verstärkte suppressive Fähigkeit aufweisen. Außerdem ist die Proliferationskapazität von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen eingeschränkt. Die spezifische Depletion von Foxp3⁺ Tregs in *P. yoelii* infizierten, Diphtherie-Toxin behandelten DEREK Mäusen zeigte, dass Foxp3⁺ Tregs den *P. yoelii*-Infektionsverlauf stark beeinflussen. So resultiert die Treg-Depletion während der *P. yoelii*-Infektion, in einer signifikanten Reduktion der Parasitämie, sowie einer signifikant verstärkten Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Durch vergleichende Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technologie konnte ein großes Repertoire an Molekülen identifiziert werden, die während der *P. yoelii*-Infektion ausschließlich auf CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und/oder CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen hochreguliert sind. So ist die Expression der Treg-spezifischen Gene, wie CD103, GzmB, SOCS2, GITR, Penk-1, Garp, Klrp1, Lag3, CTLA-4, PD-1 und IL-10 in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs nach *P. yoelii*-Infektion erhöht, was auch durchflusszytometrisch sowie mittels Real-Time PCR bestätigt werden konnte.

Interessanterweise wird im Infektionsverlauf das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 nicht nur von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, sondern auch von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T-Zellen verstärkt produziert. Die Analyse von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻IL-10⁺ T-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion zeigte, dass diese nicht in der Lage sind, die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu inhibieren, jedoch in Kokultur mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-2 und TNF- α reduzieren. Die CD4⁺ T-Zell-spezifische Deletion von IL-10 in CD4^{cre} x IL-10^{fl/fl} (CD4IL10-KO) Mäusen geht mit einer signifikanten Reduktion der suppressiven Kapazität von Tregs nach *P. yoelii*-Infektion einher. Jedoch ist diese im Vergleich zu Tregs aus nicht infizierten Wildtyp (WT) Mäusen immer noch erhöht. Die Proliferationsfähigkeit von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *P. yoelii* infizierten Mäusen wird

durch den CD4⁺ T-Zell-spezifischen IL-10-KO nicht beeinflusst. Die Parasitämie während der Infektion von CD4IL10-KO Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu *P. yoelii* infizierten WT Mäusen. Folglich hat CD4⁺ T-Zell-spezifisches IL-10 nur einen limitierenden Einfluss auf die Beseitigung des Parasiten. Demzufolge sind wahrscheinlich noch andere inhibitorische Moleküle, sowie auch andere Suppressionsmechanismen an der Inhibition der pro-inflammatorischen Immunantwort während der *P. yoelii*-Infektion beteiligt, die in weiterführenden Studien, basierend auf den in dieser Arbeit identifizierten Molekülen, untersucht werden sollen. Somit könnten geeignete *Targets* für eine gezielte effiziente Modulation der T-Zellantwort während der *P. yoelii*-Infektion identifiziert werden, was letztendlich zu einer erfolgreichen Bekämpfung des Parasiten führen soll.

7 Literatur

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. und Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-793.
- Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. et al. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*, 8(5), 765-772.
- Amante, F. H., Stanley, A. C., Randall, L. M., Zhou, Y., Haque, A., McSweeney, K. et al. (2007). A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol*, 171(2), 548-559.
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F. et al. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, 12(2), 220-224.
- Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. und Sacks, D. (2007). CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 204(2), 285-297.
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. und Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*, 24, 607-656.
- Apostolou, I. und von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*, 199(10), 1401-1408.
- Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G. et al. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, 1(4), 247-260.
- Artavanis-Tsakonas, K. und Riley, E. M. (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol*, 169(6), 2956-2963.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. und Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190(7), 995-1004.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., Jr., van Rooijen, N., Schnieder, T. und Frevert, U. (2007). Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol*, 9(2), 397-412.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J. et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- Bate, C. A., Taverne, J. und Playfair, J. H. (1988). Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology*, 64(2), 227-231.
- Beier, J. C. (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol*, 43, 519-543.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. und Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, 420(6915), 502-507.
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, 7(11), 875-888.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L. et al. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27(1), 20-21.

- Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C. und Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol*, 175(1), 246-253.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E. et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204(6), 1303-1310.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R. et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225-1232.
- Bruce-Chwatt, L. (1988). History of malaria from prehistory to eradication. *Wernsdorfer WH, McGregor I, ed. Malaria: Principles and Practice of Malariology, Edinburgh: Churchill Livingstone*, 1-59.
- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K. et al. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 34(3), 623-630.
- Bueno, L. L., Morais, C. G., Araujo, F. F., Gomes, J. A., Correa-Oliveira, R., Soares, I. S. et al. (2010). Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*, 5(3), e9623.
- Butler, N. S., Schmidt, N. W. und Harty, J. T. (2010). Differential effector pathways regulate memory CD8 T cell immunity against Plasmodium berghei versus P. yoelii sporozoites. *J Immunol*, 184(5), 2528-2538.
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Pivnica-Worms, D. R. et al. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4), 635-646.
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigario, A. M., Silva, S. et al. (2003). Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med*, 9(11), 1363-1369.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. und Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184(2), 747-752.
- Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L. und Brenner, M. B. (1993). Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol*, 150(8 Pt 1), 3459-3470.
- Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacchi, J. B. und Zavala, F. (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med*, 13(9), 1035-1041.
- Chambers, C. A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol*, 22(4), 217-223.
- Chen, G., Liu, J., Wang, Q. H., Wu, Y., Feng, H., Zheng, W. et al. (2009). Effects of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+)regulatory T cells on early Plasmodium yoelii 17XL infection in BALB/c mice. *Parasitology*, 136(10), 1107-1120.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N. et al. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12), 1875-1886.
- Chen, X., Oppenheim, J. J. und Howard, O. M. (2005). BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression

- of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice. *J Leukoc Biol*, 78(1), 114-121.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. und Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265(5176), 1237-1240.
- Chen, Z. und O'Shea, J. J. (2008). Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res*, 41(2), 87-102.
- Choudhury, H. R., Sheikh, N. A., Bancroft, G. J., Katz, D. R. und De Souza, J. B. (2000). Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect Immun*, 68(11), 6127-6132.
- Clark, L. B., Appleby, M. W., Brunkow, M. E., Wilkinson, J. E., Ziegler, S. F. und Ramsdell, F. (1999). Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol*, 162(5), 2546-2554.
- Cogswell, F. B. (1992). The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev*, 5(1), 26-35.
- Cohen, J., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R., Vekemans, J. und Leach, A. (2010). From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Hum Vaccin*, 6(1), 90-96.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M. et al. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566-569.
- Coomes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. et al. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204(8), 1757-1764.
- Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B. et al. (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*, 102(12), 4107-4114.
- Couper, K. N., Blount, D. G. und Riley, E. M. (2008a). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180(9), 5771-5777.
- Couper, K. N., Blount, D. G., Wilson, M. S., Hafalla, J. C., Belkaid, Y., Kamanaka, M. et al. (2008b). IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog*, 4(2), e1000004.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S. et al. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, 46(2), 165-171.
- Cox-Singh, J. und Singh, B. (2008). *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol*, 24(9), 406-410.
- Crispe, I. N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol*, 3(1), 51-62.
- De Souza, J. B., Williamson, K. H., Otani, T. und Playfair, J. H. (1997). Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun*, 65(5), 1593-1598.
- de Souza, J. B., Hafalla, J. C., Riley, E. M. und Couper, K. N. (2010). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*, 137(5), 755-772.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A. et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204(6), 1257-1265.

- Demangel, C., Bertolino, P. und Britton, W. J. (2002). Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol*, 32(4), 994-1002.
- Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. und Hoffman, S. L. (1996). Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med*, 183(4), 1739-1746.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R. et al. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(12), 1206-1212.
- Fields, M. L., Hondowicz, B. D., Metzgar, M. H., Nish, S. A., Wharton, G. N., Picca, C. C. et al. (2005). CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit the maturation but not the initiation of an autoantibody response. *J Immunol*, 175(7), 4255-4264.
- Finney, C. A., Taylor, M. D., Wilson, M. S. und Maizels, R. M. (2007). Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur J Immunol*, 37(7), 1874-1886.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. und Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G. und Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3), 329-341.
- Fontenot, J. D. und Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*, 6(4), 331-337.
- Fortin, A., Stevenson, M. M. und Gros, P. (2002). Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Hum Mol Genet*, 11(20), 2469-2478.
- Frank, M. M. und Fries, L. F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 12(9), 322-326.
- Franks, S., Koram, K. A., Wagner, G. E., Tetteh, K., McGuinness, D., Wheeler, J. G. et al. (2001). Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis*, 183(5), 796-804.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H. et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034.
- Freeman, G. J., Wherry, E. J., Ahmed, R. und Sharpe, A. H. (2006). Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*, 203(10), 2223-2227.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K. et al. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol*, 3(6), e192.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J. C. et al. (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol*, 6(7), 687-694.

- Garnham, P. (1988). Malaria parasites of man: life cycles and morphology. . *Wernsdorfer WH, McGregor I, ed. Malaria: Principles and Practice of Malariology, Edinburgh: Churchill Livingstone*, 61-69.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R. et al. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*, 157(2), 798-805.
- Gershon, R. K. und Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21(6), 903-914.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R. und Liebhaber, S. A. (1972). Suppressor T cells. *J Immunol*, 108(3), 586-590.
- Gillies, M. (1988). Anopheline mosquitos: vector behaviour and bionomics. *Wernsdorfer WH, McGregor I, ed. Malaria: Principles and Practice of Malariology, Edinburgh: Churchill Livingstone*, 453-485.
- Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. und Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174(4), 1783-1786.
- Good, M. F. und Doolan, D. L. (1999). Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*, 11(4), 412-419.
- Good, M. F. (2001). Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol*, 1(2), 117-125.
- Gorelik, L., Constant, S. und Flavell, R. A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*, 195(11), 1499-1505.
- Grewal, I. S. und Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, 111-135.
- Griffith, J. W., O'Connor, C., Bernard, K., Town, T., Goldstein, D. R. und Bucala, R. (2007). Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. *J Infect Dis*, 196(10), 1553-1564.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. und Ley, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), 2840-2848.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. et al. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), 737-742.
- Hafalla, J. C., Silvie, O. und Matuschewski, K. (2011). Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*, 240(1), 297-316.
- Hansen, W., Loser, K., Westendorf, A. M., Bruder, D., Pfoertner, S., Siewert, C. et al. (2006). G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+CD25- T cells leads to the induction of Foxp3+ regulatory T cells in vivo. *J Immunol*, 177(1), 209-215.
- Hansen, W., Westendorf, A. M., Reinwald, S., Bruder, D., Deppenmeier, S., Groebe, L. et al. (2007). Chronic antigen stimulation in vivo induces a distinct population of antigen-specific Foxp3 CD25 regulatory T cells. *J Immunol*, 179(12), 8059-8068.
- Haque, A., Best, S. E., Amante, F. H., Mustafah, S., Desbarrieres, L., de Labastida, F. et al. (2010). CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS Pathog*, 6(12), e1001221.

- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M., Truong, N., Williams, C. B. und Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol*, 178(5), 2961-2972.
- Heath, V. L., Murphy, E. E., Crain, C., Tomlinson, M. G. und O'Garra, A. (2000). TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol*, 30(9), 2639-2649.
- Hershfield, M. S. (2005). New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol*, 35(1), 25-30.
- Heussler, V., Rennenberg, A. und Stanway, R. (2010). Host cell death induced by the egress of intracellular Plasmodium parasites. *Apoptosis*, 15(3), 376-385.
- Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K. et al. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med*, 10(1), 29-30.
- Hisaeda, H., Hamano, S., Mitoma-Obata, C., Tetsutani, K., Imai, T., Waldmann, H. et al. (2005). Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during Plasmodium yoelii infection. *Eur J Immunol*, 35(12), 3516-3524.
- Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S. et al. (2008). Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol*, 180(4), 2496-2503.
- Hoffman, S. L. (1996). Artemether in severe malaria--still too many deaths. *N Engl J Med*, 335(2), 124-126.
- Hook, S., Camberis, M., Prout, M. und Le Gros, G. (2003). Absence of preproenkephalin increases the threshold for T cell activation. *J Neuroimmunol*, 140(1-2), 61-68.
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.
- Horowitz, A., Newman, K. C., Evans, J. H., Korbel, D. S., Davis, D. M. und Riley, E. M. (2010). Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol*, 184(11), 6043-6052.
- Huang, C. T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G. et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), 503-513.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M. et al. (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 199(3), 303-313.
- Jacobs, T., Graefe, S. E., Niknafs, S., Gaworski, I. und Fleischer, B. (2002). Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J Immunol*, 169(5), 2323-2329.
- Jameson, S. C. und Bevan, M. J. (1998). T-cell selection. *Curr Opin Immunol*, 10(2), 214-219.
- Janeway, C. A., Jr. (1988). Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand J Immunol*, 27(6), 621-623.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002). *Immunologie* (L. S. Kurt Beginnen, Ingrid Haußer-Siller, Trans. 5 ed.).
- Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S. et al. (2008). Plasmodium vivax

- parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 38(10), 2697-2705.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M. et al. (2007). Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med*, 204(2), 273-283.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 192(9), 1213-1222.
- Josefowicz, S. Z. und Rudensky, A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*, 30(5), 616-625.
- Jung, T. M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L. und Dailey, M. O. (1988). Down-regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol*, 141(12), 4110-4117.
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S. et al. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265(5171), 528-530.
- Kamanaka, M., Kim, S. T., Wan, Y. Y., Sutterwala, F. S., Lara-Tejero, M., Galan, J. E. et al. (2006). Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity*, 25(6), 941-952.
- Kamphuis, S., Eriksson, F., Kavelaars, A., Zijlstra, J., van de Pol, M., Kuis, W. et al. (1998). Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *J Neuroimmunol*, 84(1), 53-60.
- Killick-Kendrick, R. und Peters, R. (1978). Rodent Malaria. *Academic Press*.
- Klein, I. und Crispe, I. N. (2006). Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. *J Exp Med*, 203(2), 437-447.
- Klotz, C. und Frevert, U. (2008). Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *Int J Parasitol*, 38(14), 1639-1650.
- Knolle, P. A. und Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 174, 21-34.
- Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J. und Mosmann, T. R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol*, 177(10), 6780-6786.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. und von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, 6(12), 1219-1227.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S. et al. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*, 280(9), 8606-8616.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G. et al. (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, 204(1), 57-63.
- Langhorne, J., Quin, S. J. und Sanni, L. A. (2002). Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol*, 80, 204-228.

- Laveran, C. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. . *Bull Acad Med*(9), 1235.
- Layland, L. E., Mages, J., Loddenkemper, C., Hoerauf, A., Wagner, H., Lang, R. et al. (2010). Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *J Immunol*, 184(2), 713-724.
- Lechner, O., Lauber, J., Franzke, A., Sarukhan, A., von Boehmer, H. und Buer, J. (2001). Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol*, 11(8), 587-595.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyrna, F., Kretschmer, U., Krenn, V. et al. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 13031-13036.
- Lepenius, B., Gaworski, I., Tartz, S., Langhorne, J., Fleischer, B. und Jacobs, T. (2007). CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal Plasmodium yoelii infections. *Microbes Infect*, 9(6), 687-694.
- Levings, M. K., Sangregorio, R. und Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, 193(11), 1295-1302.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L. et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*, 180(9), 5916-5926.
- Long, T. T., Nakazawa, S., Onizuka, S., Huaman, M. C. und Kanbara, H. (2003). Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*, 33(2), 175-183.
- Machado, F. S., Johndrow, J. E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C. N. et al. (2006). Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med*, 12(3), 330-334.
- Mackintosh, C. L., Beeson, J. G. und Marsh, K. (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*, 20(12), 597-603.
- Martin, B., Banz, A., Bienvenu, B., Cordier, C., Dautigny, N., Becourt, C. et al. (2004). Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*, 172(6), 3391-3398.
- Mbugi, E. V., Meijerink, M., Veenemans, J., Jeurink, P. V., McCall, M., Olomi, R. M. et al. (2010). Effect of nutrient deficiencies on in vitro Th1 and Th2 cytokine response of peripheral blood mononuclear cells to Plasmodium falciparum infection. *Malar J*, 9, 162.
- McGuirk, P., McCann, C. und Mills, K. H. (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. *J Exp Med*, 195(2), 221-231.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M. et al. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16(2), 311-323.
- McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D. und Maizels, R. M. (2008). Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi. *J Immunol*, 181(9), 6456-6466.
- Meding, S. J. und Langhorne, J. (1991). CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to Plasmodium chabaudi chabaudi. *Eur J Immunol*, 21(6), 1433-1438.

- Mellor, A. L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A. M., Marshall, B., Pihkala, J. et al. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol*, 16(10), 1391-1401.
- Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H. et al. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity*, 25(1), 129-141.
- Menard, R. (2005). Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature*, 433(7022), 113-114.
- Miller, L. H., Good, M. F. und Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. *Science*, 264(5167), 1878-1883.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. und Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673-679.
- Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K. A., Salwati, E., Tjitra, E., Kenangalem, E. et al. (2009). Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog*, 5(4), e1000402.
- Mohan, K., Moulin, P. und Stevenson, M. M. (1997). Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol*, 159(10), 4990-4998.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. und Mosmann, T. R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248(4960), 1230-1234.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. und O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765.
- Mosmann, T. R. und Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S. et al. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291(5501), 141-144.
- Mota, M. M., Hafalla, J. C. und Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*, 8(11), 1318-1322.
- Mucida, D., Pino-Lagos, K., Kim, G., Nowak, E., Benson, M. J., Kronenberg, M. et al. (2009). Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity*, 30(4), 471-472; author reply 472-473.
- Nagata, S. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 406, 119-124.
- Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M. E., Kaminski, M. et al. (2009). Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000313.
- Nakamura, K., Kitani, A. und Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194(5), 629-644.
- Nelson, B. H. und Willerford, D. M. (1998). Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol*, 70, 1-81.
- Nishimura, H. und Honjo, T. (2001). PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol*, 22(5), 265-268.

- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S. et al. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295(5846), 202-206.
- Nussler, A. K., Geller, D. A., Sweetland, M. A., Di Silvio, M., Billiar, T. R., Madariaga, J. B. et al. (1993a). Induction of nitric oxide synthesis and its reactions in cultured human and rat hepatocytes stimulated with cytokines plus LPS. *Biochem Biophys Res Commun*, 194(2), 826-835.
- Nussler, A. K., Renia, L., Pasquetto, V., Miltgen, F., Matile, H. und Mazier, D. (1993b). In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants. *Eur J Immunol*, 23(4), 882-887.
- O'Garra, A. und Vieira, P. (2007). T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*, 7(6), 425-428.
- Ocana-Morgner, C., Mota, M. M. und Rodriguez, A. (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med*, 197(2), 143-151.
- Ocana-Morgner, C., Wong, K. A., Lega, F., Dotor, J., Borrás-Cuesta, F. und Rodriguez, A. (2007). Role of TGF-beta and PGE2 in T cell responses during Plasmodium yoelii infection. *Eur J Immunol*, 37(6), 1562-1574.
- Ocana-Morgner, C., Wong, K. A. und Rodriguez, A. (2008). Interactions between dendritic cells and CD4+ T cells during Plasmodium infection. *Malar J*, 7, 88.
- Okamura, T., Fujio, K., Shibuya, M., Sumitomo, S., Shoda, H., Sakaguchi, S. et al. (2009). CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 13974-13979.
- Omer, F. M., de Souza, J. B. und Riley, E. M. (2003). Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections. *J Immunol*, 171(10), 5430-5436.
- Overstreet, M. G., Chen, Y. C., Cockburn, I. A., Tse, S. W. und Zavala, F. (2011). CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites. *PLoS One*, 6(1), e15948.
- Pain, A., Bohme, U., Berry, A. E., Mungall, K., Finn, R. D., Jackson, A. P. et al. (2008). The genome of the simian and human malaria parasite Plasmodium knowlesi. *Nature*, 455(7214), 799-803.
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A. et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(6), 1919-1924.
- Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A. M. et al. (2004). Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol*, 172(8), 4926-4933.
- Ponnudurai, T., Lensen, A. und van-Gemert, G. (1991). Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected Anopheles stephensi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*(85), 175-180.
- Probst-Kepper, M., Geffers, R., Kroger, A., Viegas, N., Erck, C., Hecht, H. J. et al. (2009). GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med*, 13(9B), 3343-3357.

- Read, S., Malmstrom, V. und Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192(2), 295-302.
- Read, S. und Powrie, F. (2001). CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*, 13(6), 644-649.
- Reiner, S. L. und Locksley, R. M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13, 151-177.
- Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W. et al. (2004). T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med*, 200(10), 1289-1297.
- Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Ling, K. L. et al. (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*, 35(6), 1681-1691.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. und Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*, 212, 28-50.
- Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *BM J*(2), 1786-1788.
- Russell, J. H. und Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 20, 323-370.
- Rutella, S., Danese, S. und Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*, 108(5), 1435-1440.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), 1151-1164.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4), 345-352.
- Sakaguchi, S. und Sakaguchi, N. (2005). Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol*, 24(3-4), 211-226.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z. et al. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 212, 8-27.
- Sakaguchi, S. und Powrie, F. (2007). Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 317(5838), 627-629.
- Sarween, N., Chodos, A., Raykundalia, C., Khan, M., Abbas, A. K. und Walker, L. S. (2004). CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol*, 173(5), 2942-2951.
- Scheffold, A., Huhn, J. und Hofer, T. (2005). Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol*, 35(5), 1336-1341.
- Schlitzer, M. (2008). Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch Pharm (Weinheim)*, 341(3), 149-163.
- Schlotmann, T., Waase, I., Julch, C., Klauenberg, U., Muller-Myhsok, B., Dietrich, M. et al. (2000). CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *J Infect Dis*, 182(1), 367-370.

- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R. und Nussenzweig, V. (1987). Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature*, 330(6149), 664-666.
- Schofield, L., Hewitt, M. C., Evans, K., Siomos, M. A. und Seeberger, P. H. (2002). Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*, 418(6899), 785-789.
- Scholzen, A., Mittag, D., Rogerson, S. J., Cooke, B. M. und Plebanski, M. (2009). Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. *PLoS Pathog*, 5(8), e1000543.
- Scott, P. und Trinchieri, G. (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol*, 7(1), 34-40.
- Seguin, M. C., Klotz, F. W., Schneider, I., Weir, J. P., Goodbary, M., Slayter, M. et al. (1994). Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J Exp Med*, 180(1), 353-358.
- Serghides, L., Smith, T. G., Patel, S. N. und Kain, K. C. (2003). CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol*, 19(10), 461-469.
- Sher, A., Pearce, E. und Kaye, P. (2003). Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 15(4), 421-429.
- Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25(2), 195-201.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. und Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 3(2), 135-142.
- Simpson, J., Aarons, L. und Collins, W. (2002). Population dynamics of the Plasmodium falciparum parasite within the adult human host in the absence of antimalarial drugs. *Parasitology* (124), 247-263.
- Sojka, D. K., Hughson, A., Sukiennicki, T. L. und Fowell, D. J. (2005). Early kinetic window of target T cell susceptibility to CD25+ regulatory T cell activity. *J Immunol*, 175(11), 7274-7280.
- Sojka, D. K., Huang, Y. H. und Fowell, D. J. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 124(1), 13-22.
- Steeg, C., Adler, G., Sparwasser, T., Fleischer, B. und Jacobs, T. (2009). Limited role of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria. *J Immunol*, 183(11), 7014-7022.
- Stevenson, M. M., Su, Z., Sam, H. und Mohan, K. (2001). Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect*, 3(1), 49-59.
- Stevenson, M. M. und Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*, 4(3), 169-180.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A. et al. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313(5791), 1287-1290.
- Sturm, A. und Heussler, V. (2007). Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med Microbiol Immunol*, 196(3), 127-133.
- Su, Z. und Stevenson, M. M. (2000). Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. *Infect Immun*, 68(8), 4399-4406.

- Su, Z. und Stevenson, M. M. (2002). IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol*, 168(3), 1348-1355.
- Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. und Belkaid, Y. (2005). A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 174(9), 5444-5455.
- Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T. et al. (2006). Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol*, 18(8), 1197-1209.
- Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R. et al. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204(8), 1775-1785.
- Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A. et al. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 203(3), 505-511.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M. et al. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10(12), 1969-1980.
- Takeda, K. und Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17(1), 1-14.
- Taniguchi, T. (1992). Structure and function of IL-2 and IL-2 receptors. *Behring Inst Mitt*(91), 87-95.
- Tarun, A. S., Peng, X., Dumpit, R. F., Ogata, Y., Silva-Rivera, H., Camargo, N. et al. (2008). A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1), 305-310.
- Testi, R., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1989). T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol*, 143(4), 1123-1128.
- Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2), 287-296.
- Torcia, M. G., Santarasci, V., Cosmi, L., Clemente, A., Maggi, L., Mangano, V. D. et al. (2008). Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 646-651.
- Torgler, R., Bongfen, S. E., Romero, J. C., Tardivel, A., Thome, M. und Corradin, G. (2008). Sporozoite-mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88-mediated NF-kappa B activation and inducible NO synthase expression. *J Immunol*, 180(6), 3990-3999.
- Trowbridge, I. S. und Thomas, M. L. (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, 12, 85-116.
- Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G. et al. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423(6939), 506-511.
- Urban, B. C., Ferguson, D. J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J. M. et al. (1999). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, 400(6739), 73-77.

- van der Heyde, H. C., Pepper, B., Batchelder, J., Cigel, F. und Weidanz, W. P. (1997). The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Exp Parasitol*, 85(2), 206-213.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A. et al. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 172(10), 5986-5993.
- Vigario, A. M., Gorgette, O., Dujardin, H. C., Cruz, T., Cazenave, P. A., Six, A. et al. (2007). Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol*, 37(8-9), 963-973.
- Vignali, D. A., Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 523-532.
- Waldmann, H., Adams, E., Fairchild, P. und Cobbold, S. (2006). Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev*, 212, 301-313.
- Walker, L. S. und Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*, 2(1), 11-19.
- Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H. et al. (2005). Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, 23(3), 287-296.
- Walther, M., Jeffries, D., Finney, O. C., Njie, M., Ebonyi, A., Deininger, S. et al. (2009). Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Pathog*, 5(4), e1000364.
- Warrell, D. A. (1989). Cerebral malaria. *Q J Med*, 71(265), 369-371.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P. et al. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*, 270(5238), 985-988.
- Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182, 207-214.
- Weiss, L., Donkova-Petrini, V., Caccavelli, L., Balbo, M., Carbonneil, C. und Levy, Y. (2004). Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood*, 104(10), 3249-3256.
- White, N. (2009). Malaria. [Chapter]. *Tropical Diseases*(73), 1201-1300.
- WHO. (2010). World Health Organisation: Malaria Report. *WHO*.
- Williams, C. T. und Azad, A. F. (2010). Transcriptional analysis of the pre-erythrocytic stages of the rodent malaria parasite, Plasmodium yoelii. *PLoS One*, 5(4), e10267.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z. et al. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899), 271-275.
- Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A., Graninger, W. et al. (1998). Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun*, 66(12), 6040-6044.
- Xu, D., Liu, H., Komai-Koma, M., Campbell, C., McSharry, C., Alexander, J. et al. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions

-
- of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. *J Immunol*, 170(1), 394-399.
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J. et al. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 111(1), 251-259.
- Zheng, Y. und Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*, 8(5), 457-462.
- Zhou, L., Chong, M. M. und Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30(5), 646-655.
- Ziegler, S. F. (2007). FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol*, 37(1), 21-23.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| °C | Grad Celsius |
| A _{2A} R | Adenosin-Rezeptor 2A |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Allophycocyanin |
| (Farbstoff) | |
| APC | engl. <i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle |
| (Zelltyp) | |
| AICD | engl. <i>activation induced cell death</i> , Aktivierungs-induzierte Apoptose |
| C ₂ H ₇ NO ₂ | Ammoniumacetat |
| cAMP | engl. <i>cyclic Adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CD | engl. <i>cluster of differentiation</i> |
| Cdc42 | engl. <i>cell division control protein 42 homolog</i> |
| cDNA | engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| CFSE | Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester |
| CM | engl. <i>cerebral malaria</i> , zerebrale Malaria |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanin |
| CSP | engl. <i>circumsporozoite protein</i> |
| CT-Wert | engl. <i>cycle threshold</i> , Fluoreszenzschwellenwert |
| CTL | engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> , Zytotoxische T-Lymphozyte |
| CTLA-4 | engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> |
| Cre | engl. <i>cyclization recombination</i> |
| Cxcl10 | engl. <i>C-X-C motif chemokine 10 (IP-10)</i> |
| D | engl. <i>day</i> , Tag |
| DC | engl. <i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle |
| DDT | Dichlorodiphenyltrichloroethan |
| DEPC-H ₂ O | Diethyldicarbonat-Wasser |
| DEREG | engl. <i>DEpletion of REgulatory T-cells</i> |
| dNTP | Desoxy-Nukleotid-Triphosphate |

| | |
|------------------|--|
| DNA | engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DMSO | Dimethyl-Sulfoxid |
| DNase | Deoxyribonuclease |
| DT | Diphtherie-Toxin |
| DTT | Dithiothreitol |
| Dusp4 | engl. <i>dual specificity phosphatase 4</i> |
| eGFP | engl. <i>enhanced-green fluorescent protein</i> , <i>enhanced-Grün fluoreszierendes Protein</i> |
| Ecm1 | engl. <i>extracellular matrix protein 1</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| engl. | englisch |
| et al. | lat. <i>et altera</i> (und andere) |
| FACS | engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung |
| FCS | engl. <i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| Foxp3 | engl. <i>forkhead box protein P3</i> |
| FSC | engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht |
| Garp | engl. <i>glycoprotein-A repetitions predominant</i> |
| GFP | engl. <i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein |
| GITR | engl. <i>glucocorticoid induced TNFR family related gene</i> , TNFRSF18 |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GPR-83 | engl. <i>G protein-coupled receptor 83</i> |
| GVHD | engl. <i>graft versus host diseases</i> , |
| GzmA | Granzym A |
| GzmB | Granzym B |
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| HI-Virus | Humanes Immundefizienz-Virus |
| ICAM-1 | engl. <i>intracellular adhesion molecule-1</i> , intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 |
| Id2 | engl. <i>Inhibitor of DNA binding 2</i> |
| IDO | Indolamin 2,3-dioxygenase |
| IFN- γ | Interferon- γ |

| | |
|---------------------------------|--|
| Ig | Immunglobulin |
| iNOS | engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare NO Synthase |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| IL | Interleukin |
| Il1r1 | engl. <i>Interleukin 1 receptor-like 1</i> |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium |
| IPEX-Syndrom | engl. <i>Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i> Syndrom |
| itgaE | integrin alpha E β 7 ,CD103 |
| iTregs | induzierte regulatorische T-Zellen |
| IVC | engl. <i>individual ventilated cage</i> , Individuell ventilierter Käfig |
| iRBC | engl. <i>infected red blood cell</i> , infizierter Erythrozyt |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KHCO ₃ | Kaliumdihydrogencarbonat |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumhydrogenphosphat |
| Klrg1 | engl. <i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i> |
| KO | engl. <i>knock-out</i> |
| Ktrl | Kontrolle |
| Lag3 | engl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i> |
| lat. | lateinisch |
| Lgals | engl. <i>galectin-1</i> |
| LPA | Lineares Polyacrylamid |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | engl. <i>magnetic activated cell sorting</i> |
| MFI | engl. <i>mean fluorescent intensity</i> |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex |
| min | Minuten |
| MLN | Mesenterische Lymphknoten |
| M-MLV | Moloney-muriner Leukämie Virus |
| MyD88 | engl. <i>myeloid differentiation gene 88</i> |
| n | Stichprobenumfang |

| | |
|---|---|
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NFκB | engl. <i>nuclear factor kappa of activated B-cells</i> |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| ns | nicht signifikant |
| nTregs | natürliche regulatorische T-Zellen |
| Nrp1 | Neuropilin-1 |
| P | Parasit |
| PB | Pacific Blue |
| PBMC | engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut |
| PBS | engl. <i>phosphate buffer solution</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion |
| PD-1 | engl. <i>programmed cell death-1</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| Penk-1 | <i>proenkephalin-1</i> |
| PfEMP | engl. <i>P.f. encoded erythrocyte membrane Protein</i> |
| p.i. | engl. <i>post infection</i> , nach der Infektion |
| PMA | engl. <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> |
| PRR | engl. <i>pattern recognition receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren |
| <i>P. spec</i> | <i>Plasmodium spec</i> |
| <i>P. yoelii</i> (Py) | <i>Plasmodium yoelii</i> |
| RBC | engl. <i>red blood cell</i> , Erythrozyt |
| RAG-1 | engl. <i>recombination activation gene-1</i> |
| RNA | engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RPS9 | Ribosomales Protein9 |
| RT | Reverse Transkription |
| ROR | engl. <i>retinoid related orphan receptor</i> |

| | |
|------------------|--|
| SCID | engl. <i>Severe Combined Immunodeficient</i> , schwerer kombinierter Immundefekt |
| SDS | engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SOCS2 | engl. <i>suppressor of cytokine signaling 2</i> |
| SPF | spezifisch-pathogen-frei |
| SSC | engl. <i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht |
| Swap70 | engl. <i>Switch-associated protein 70</i> |
| T _A | Annealing Temperatur |
| Tab. | Tabelle |
| T-bet | engl. <i>T-box transcription factor expressed in T-cells</i> |
| TCR | engl. <i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor |
| TE | Tris/EDTA |
| TGF- β | engl. <i>transforming growth factor-β</i> |
| Tgfr2 | engl. <i>transforming growth factor-β receptor 2</i> |
| T _{H1} | T-Helfer Zellen Typ 1 |
| T _{H2} | T-Helfer Zellen Typ 2 |
| T _{H3} | T-Helfer Zellen Typ 3 |
| T _{H17} | T-Helfer Zellen Typ 17 |
| TLR | engl. <i>toll like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor |
| TNF- α | engl. <i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor- α |
| Tnfrsf | engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member</i> |
| T _{r1} | regulatorische T-Zelle Typ 1 |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| VCAM-1 | engl. <i>vascular adhesion molecule-1</i> , vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 |
| WHO | engl. <i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation |
| WT | Wildtyp |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Tregs können verschiedene Stadien der Zellaktivität inhibieren. | 17 |
| Abb. 1.2: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen..... | 19 |
| Abb. 1.4: Lebenszyklus von <i>Plasmodium spec.</i> | 26 |
| Abb. 1.3: Interaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems während der Blutphase der Malariainfektion. | 30 |
| Abb. 2.1: Prinzip des „Mouse IL-10 Secretion Kit“ | 54 |
| Abb. 4.1: Verlauf der Parasitämie nach Infektion mit <i>P. yoelii</i> | 60 |
| Abb. 4.2: Schematische Darstellung für die Infektion und Analyse von <i>P. yoelii</i> infizierten Mäusen. | 61 |
| Abb. 4.3: Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektion in BALB/c Mäusen. | 61 |
| Abb. 4.4: Aktivierter Phänotyp von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach der Infektion mit <i>P. yoelii</i> | 62 |
| Abb. 4.5: Expansion von CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs nach der Infektion mit <i>P. yoelii</i> | 64 |
| Abb. 4.6: Erhöhte suppressive Fähigkeit von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs nach der Infektion mit <i>P. yoelii</i> | 65 |
| Abb. 4.7: Effiziente Depletion von Foxp3 ⁺ Tregs in DEREK Mäusen durch die Injektion von DT. | 66 |
| Abb. 4.8: Die Depletion von Foxp3 ⁺ Tregs durch DT resultiert in einer reduzierten Parasitämie in <i>P. yoelii</i> infizierten DEREK Mäusen. | 67 |
| Abb. 4.9: Verstärkte T-Zellaktivierung in Treg-depletierten Mäusen während der <i>P.</i> <i>yoelii</i> -Infektion. | 68 |
| Abb. 4.10: Die Depletion von Tregs führt zu einem Anstieg an Lag3 ⁺ und PD- 1 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen sowie GzmB ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen in <i>P. yoelii</i> infizierten Mäusen..... | 69 |
| Abb. 4.11: Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie. | 71 |
| Abb. 4.12: Genexpressionsanalysen von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs aus nicht infizierten WT Foxp3/eGFP Mäusen und <i>P. yoelii</i> infizierten Foxp3/eGFP Mäusen 3 d und 5 d p.i. | 72 |
| Abb. 4.13: Schnittmengendiagramm differentiell exprimierter Gene in CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs verglichen mit CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen, aus nicht infizierten und <i>P. yoelii</i> infizierten Foxp3/eGFP 3 d oder 5 d p.i. | 73 |

| | |
|---|----|
| Abb. 4.14: Auswahl differentiell exprimierter Gene in CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs verglichen mit CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen aus nicht infizierten oder <i>P. yoelii</i> infizierten Foxp3/eGFP Mäusen 3 d und 5 d p.i. | 74 |
| Abb. 4.15: Durchflusszytometrische Analyse der CTLA-4, Lag3, PD-1 und GzmB Expression in CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen im Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektion..... | 76 |
| Abb. 4.16: Erhöhte mRNA Expression von SOCS2 (A), GITR (B) und Penk-1 (C) in CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs und IL-10 (D) in CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs sowie in CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen nach <i>P. yoelii</i> -Infektion..... | 77 |
| Abb. 4.17: IL-10 Sekretion von CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen im Verlauf der <i>P. yoelii</i> - Infektion..... | 78 |
| Abb. 4.18: Reduzierte Proliferationsrate von CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen 5 und 7 Tage nach <i>P. yoelii</i> -Infektion. | 79 |
| Abb. 4.19: Zytokinprofil von CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen nach <i>P. yoelii</i> -Infektion | 80 |
| Abb. 4.20: Prinzip des „Mouse IL-10 Secretion Kit“ | 81 |
| Abb. 4.21: Reinheitsanalyse des „IL-10 Secretion Kits“ nach Separation mittels AutoMACS | 82 |
| Abb. 4.22: FACS-Analyse zur Detektion der IL-10 produzierenden Zellen („IL-10 Secretion Kit“). | 83 |
| Abb. 4.23: Reinheitsanalyse des „IL-10 Secretion Kits“ nach durchflusszytometrischer Sortierung. | 83 |
| Abb. 4.24: Suppressionsfähigkeit von CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ IL10 ⁺ T-Zellen..... | 84 |
| Abb. 4.25: Zytokinprofil von CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ IL10 ⁺ und -IL10 ⁻ T-Zellen aus Kokulturen mit CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen..... | 85 |
| Abb. 4.26: IL-10-Produktion von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen aus WT BALB/c und CD4IL10- KO Mäusen nach <i>P. yoelii</i> -Infektion. | 87 |
| Abb. 4.27: Zellzahl von <i>P. yoelii</i> infizierten CD4IL10-KO im Vergleich zu WT BALB/c Mäusen..... | 88 |
| Abb. 4.28: Erhöhte Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen aus CD4IL10-KO-Mäusen nach <i>P.</i> <i>yoelii</i> -Infektion. | 89 |
| Abb. 4.29: Proliferationsaktivität von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen aus <i>P. yoelii</i> infizierten CD4IL10-KO Mäusen..... | 90 |

| | |
|---|----|
| Abb. 4.30: Zytokinprofil von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen aus <i>P. yoelii</i> infizierten CD4IL10-KO Mäusen..... | 91 |
| Abb. 4.31: Prozentuale und absolute Anzahl CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen..... | 92 |
| Abb. 4.32: Reduzierte Garp- und erhöhte CD103-Expression auf CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs aus <i>P. yoelii</i> infizierten CD4IL10-KO Mäusen..... | 93 |
| Abb. 4.33: Verringerte suppressive Fähigkeit von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs aus <i>P. yoelii</i> infizierten CD4IL10-KO Mäusen. | 94 |
| Abb. 4.34: Verlauf der Parasitämie in CD4IL10-KO Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen nach <i>P. yoelii</i> -Infektion. | 95 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1.1: Positive und negative Treg-Funktionen während einer Infektion | 21 |
| Tab. 1.2: Humane Malaria-Parasiten | 25 |
| Tab. 2.1: Chemikalien | 38 |
| Tab. 2.2: Oligonukleotide | 41 |
| Tab. 2.3: Antikörper für die Durchflusszytometrie | 42 |
| Tab. 2.4: Fluorochrome | 43 |
| Tab. 2.5: Geräte | 43 |
| Tab. 2.6: Oligonukleotidprimerpaare zur Genotypisierung transgener Mäuse | 44 |
| Tab. 2.7: PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mauslinien | 45 |
| Tab. 2.8: Programm der semiquantitativen PCR | 47 |

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau PD Dr. Wiebke Hansen für ihre Geduld und fürsorgliche Betreuung bedanken: Danke für deine andauernde Motivation, professionelle und herzliche Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Prof. Dr. Jan Buer danke ich dafür, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen konnte und ebenso für hilfreiche und nette Gespräche.

Ich danke euch auch für die Bereitstellung des hochinteressanten und aktuellen Themas, sowie für die Ermöglichung einer hervorragenden Ausbildung.

Frau Prof. Dr. Astrid M. Westendorf danke ich für die Übernahme des Hauptreferates und natürlich für die zahlreichen fachlichen sowie auch freundschaftlichen Diskussionen.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Kai Matuschewski und Carolin Nahar für die zur Verfügung gestellten Blutstabilate und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Dem gesamten „Graduiertenkolleg 1045“ möchte ich für die letzten gemeinsamen Jahre und die vielen inspirierenden Diskussionen danken. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Von Ganzem Herzen bedanke ich mich für das tolle Arbeitsklima, das ein oder andere helfende, aufmunternde und anregende Gespräch, sowie für die Kaffeepausen und freizeithlichen Aktivitäten wie z.B. das „Zwiebelkuchenessen“, bei unseren Arbeitsgruppen „Immunregulation“ und „Mukosale Immunität“. Danke Marina, besonders für die letzten Monate, Danke Diana, für die letzten gemeinsamen Jahre, Danke Christina, Danke Katrin, Danke Torben und Danke Munisch. Ein riesengroßer Dank geht an Tanja, Annika, Caro, Mechthild und Witold. Ohne eure tatkräftige Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte mich auch ganz herzlich bei den Mitarbeitern des Parasitenlabors für nette Stunden am Mikroskop bedanken. Ein Dankesgruß für einige unterhaltsame Monate geht auch nach „Down Under“ an Hubertus.

Meinen „Mitdoktoranden“ und Freunden Marina, Kathrin, Marianne, Milena, Susanne und Anna möchte ich ganz besonders für die vielen unvergesslichen, netten Abende danken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Freunden außerhalb des Labors und Ruhrgebiets, Miriam und Julia sowie Dirk, Nicole, Carina, Marie und Simone, für abwechslungsreiche Telefonate, Tage und Nächte. Danke, dass es euch gibt!

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich auf diesem Wege für ihre immer währende Unterstützung danken. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und für mich da seid.

Last but not least möchte ich meinem lieben Freund Arne danken, der stets an meiner Seite steht, immer an mich glaubt und mir mit seiner Liebe und seinen Kochkünsten die letzten Jahre „schmackhaft“ gemacht hat.

Ohne euch **alle** wäre mir all das ein großes Stück schwerer gefallen. Danke.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunregulation während der *Plasmodium yoelii*-Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Simone Abel befürworte.

Essen, den _____
Wiebke Hansen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Simone Abel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Simone Abel