

**Untersuchungen zur Funktion von Siglec-E  
(sialic acid-binding Ig-like lectin-E)  
im Verlauf der *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) - Infektion  
in der Maus (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

**Hanna Erdmann**

aus Hamburg

beim Department Biologie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 28. November 2008

Hamburg, den 14. November 2008



Jörg Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fleischer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung, das interessante Arbeitsthema und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Bruchhaus möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Besonders danke ich PD Dr. Thomas Jacobs für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der zur Durchführung der Arbeit benötigten Mittel sowie für die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch Frau Iris Gaworski und Frau Christiane Steeg, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ganz herzlich danke ich auch den Mitarbeitern der Abteilung für Immunologie für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Nolte für die Herstellung des anti-Siglec-E Immunsersums.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinem Freund Markus für die großartige Unterstützung während der Promotion.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> , der Erreger der Chagas-Krankheit	1
1.1.1 Die Chagas-Krankheit ist eine chronische Infektionserkrankung	1
1.1.2 Der Lebenszyklus von <i>T. cruzi</i> ist durch einen Wirtswechsel zwischen Säugetier und Insekt gekennzeichnet	2
1.1.3 <i>T. cruzi</i> benutzt den Wundheilungsmechanismus zur Zellinvasion	3
1.1.4 Die <i>Trans</i> -Sialidase von <i>T. cruzi</i> ist ein einzigartiges Enzym	4
1.1.5 <i>T. cruzi</i> wird in zwei phylogenetische Hauptgruppen unterteilt	6
1.2 Das Immunsystem	7
1.3 Die Immunantwort gegen <i>T. cruzi</i>	9
1.4 Siglecs sind Sialinsäure-bindende Lektine	11
1.4.1 Siglecs werden von Zellen des Immunsystems exprimiert	12
1.4.2 Die Sialinsäure als Ligand für Siglecs	13
1.4.3 Die meisten Siglecs besitzen inhibierende Signalmotive	15
1.4.4 Siglecs können angeborene und adaptive Immunantworten modulieren	16
1.4.5 <i>Cis</i> - und <i>trans</i> -Interaktionen	17
1.4.6 Liganden auf Pathogenen	17
1.4.7 Das murine Molekül Siglec-E wird auf Phagozyten und NK-Zellen exprimiert	18
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
<b>2 Material und Methoden</b>	20
2.1 Material	20
2.1.1 Mausstämme	20
2.1.2 Parasiten	20
2.1.3 Zelllinien	20
2.1.4 Bakterienstämme	20
2.1.5 Antikörper, Lektine, Fusionsproteine	21
2.1.6 Primer	21

---

2.1.7	Laborgeräte	22
2.1.8	Glas- und Plastikwaren	22
2.1.9	Material für molekularbiologisches Arbeiten	23
2.1.9.1	Reagenzien	23
2.1.9.2	Kulturmedien, Puffer, verwendete Stammlösungen	23
2.1.9.3	Plasmide	25
2.1.9.4	Enzyme	25
2.1.10	Material für biochemische Arbeiten	25
2.1.10.1	Reagenzien	25
2.1.10.2	Puffer, verwendete Stammlösungen	26
2.1.11	Material für zellbiologische Arbeiten	27
2.1.11.1	Reagenzien	27
2.1.11.2	Kulturmedien, Puffer, verwendete Stammlösungen	27
2.2	Methoden	29
2.2.1	<i>In vivo</i> -Infektion	29
2.2.1.1	Infektion von Mäusen mit <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2.2.1.2	Bestimmung der Parasitämie	29
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.2.2	RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen	30
2.2.2.3	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	30
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.2.5	Restriktion von DNA	31
2.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.2.7	Gelreinigung von DNA-Fragmenten	32
2.2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.2.9	Herstellung kompetenter Bakterien	32
2.2.2.10	Transformation von Bakterien	33
2.2.2.11	PCR-Screen zur Verifizierung positiver Klone	33
2.2.2.12	Plasmidpräparation aus Bakterien	33
2.2.2.13	Cryokonservierung von Bakterien	34
2.2.2.14	DNA-Fällung	34
2.2.2.15	DNA-Sequenzierung	34

---

2.2.3	Biochemische Methoden	34
2.2.3.1	Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.3.2	Coomassie-Färbung	35
2.2.3.3	Trocknung von Polyacrylamidgelen	35
2.2.3.4	Western Blot	35
2.2.3.5	Konzentrieren von Proteinlösungen	36
2.2.4	Zellbiologische Methoden	36
2.2.4.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	36
2.2.4.2	Zellzählung	36
2.2.4.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	36
2.2.4.4	Kultur von Zelllinien	37
2.2.4.5	<i>In vitro</i> Kultur von Trypanosomen	37
2.2.4.6	Neuraminidase-Behandlung, Laktose-Behandlung und CMFDA-Färbung	37
2.2.4.7	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen durch Elektroporation	37
2.2.4.8	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene	38
2.2.4.9	Aufreinigung von Fusionsmolekülen	38
2.2.4.10	Generierung eines Kaninchen anti-Siglec-E Immunsersums	39
2.2.4.11	Generierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen aus dem Knochenmark	39
2.2.4.12	Durchflusszytometrie	39
2.2.4.12.1	Charakterisierung von Zellen	40
2.2.4.12.2	Intrazelluläre FACS-Färbung	40
2.2.4.12.3	Färbung von Trypanosomen	40
2.2.4.12.4	Bindung von Siglec-E-Fc an Erythrozyten	40
2.2.4.12.5	FACS von Dynabeads	41
2.2.4.13	Immunfluoreszenzmikroskopie	41
2.2.4.13.1	Bindung von Siglec-E-Fc an extrazelluläre <i>T. cruzi</i>	41
2.2.4.13.2	Bindung von Siglec-E-Fc an intrazelluläre <i>T. cruzi</i>	41
2.2.4.13.3	Akkumulation von Siglec-E zwischen CHO-Siglec-E- Zellen und <i>T. cruzi</i>	42
2.2.4.14	Hämagglutintest zur Bestimmung der TS-Aktivität	42
2.2.4.15	Erythrozyten-Bindung an CHO-Siglec-E-Zellen	42

2.2.4.16	Präparation einer Milz und Isolierung von T-Zellen	42
2.2.4.17	Einfluss von <i>T. cruzi</i> auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen	43
2.2.4.18	Stimulationstest von Dendritischen Zellen mit Dynabeads	43
2.2.4.19	Statistische Auswertung	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Charakterisierung der <i>T. cruzi</i> Stämme Tulahuen und Tehuantepec	44
3.2	Im peripheren Blut werden neutrophile Granulozyten und Makrophagen als erste Zellen von <i>T. cruzi</i> infiziert	47
3.3	Siglec-E wird auf Phagozyten und Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert	48
3.4	DNA-Vakzinierung eines Kaninchens zur Herstellung eines anti-Siglec-E Immunserrums	50
3.4.1	Klonierung und Expressionstest des Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6- Vektors	50
3.4.2	DNA-Vakzinierung eines Kaninchens und Test des Immunserrums	50
3.5	Generierung eines Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls	52
3.5.1	Klonierung des Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektors	52
3.5.2	Stabile Transfektion von CHO-Zellen	52
3.5.3	SDS-Page, Western Blot und Funktionstest des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls	53
3.6	Das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül bindet an Sialinsäuren auf der Oberfläche von extrazellulären <i>T. cruzi</i>	55
3.7	Bindung des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls an intrazelluläre Stadien von <i>T. cruzi</i>	58
3.8	Generierung von CHO-Siglec-E Transfektanten	59
3.8.1	Klonierung des Siglec-E/pcDNA3.1-Vektors	59
3.8.2	Stabile Transfektion von CHO-Zellen	60
3.8.3	Funktionstest der CHO-Siglec-E-Zellen	60
3.9	Akkumulation von Siglec-E in der Kontaktzone von CHO-Siglec-E-Zellen und <i>T. cruzi</i>	61
3.10	Die extrazelluläre Lyse von Trypanosomen durch NK-Zellen	63
3.11	Siglec-E ist kein primärer Rezeptor für die Zellinvasion	66

---

3.12	<i>T. cruzi</i> moduliert die Funktion von Dendritischen Zellen	68
3.13	Die Siglec-E Ligation auf Dendritischen Zellen inhibiert die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine	70
3.14	Die Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen beeinflusst die T-Zell-Aktivierung	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	Die Interaktion von <i>T. cruzi</i> mit Siglec-E	78
4.2	Untersuchungen zur Funktion der Siglec-E - <i>T. cruzi</i> - Interaktion	81
4.2.1	Siglec-E als Rezeptor für die <i>T. cruzi</i> Zellinvasion	81
4.2.2	Immunmodulation durch Siglec-E	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APCs	antigenpräsentierende Zellen ( <i>antigen presenting cells</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
B-Zellen	Lymphocyten-Zelle benannt nach der Bursa Fabricii der Vögel
C	konstant
CAPS	N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonsäure
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
CHO	Chinesische-Hamster-Ovarzellen
Ci	Curie
CMFDA	5-Chlormethylfluorescein-diacetat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
Da	Dalton
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
F	Farad
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
F <sub>C</sub>	konstanter Abschnitt eines Antikörpers ( <i>fragment crystallized</i> )
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsscatter ( <i>forward scatter</i> )
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal

ITAM	Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
ITIM	Tyrosininaktivierungssequenz von Immunrezeptoren ( <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> )
kb	Kilobasen
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein ( <i>myelin-associated glycoprotein</i> )
MAL II	<i>Maackia amurensis</i> Lektin II
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein-1 ( <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
Nase	Neuraminidase
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-L1	PD-Ligand-1 ( <i>programmed death receptor-1-ligand-1</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an $H_3O^+$
PNA	Erdnuss-Agglutinin ( <i>peanut agglutinin</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt ( <i>severe combined immunodeficiency disorder</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHP	SH2-Domäne enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase ( <i>SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase</i> )
Sn	Sialoadhesin
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Lektin
SSC	Seitwärtsscatter ( <i>side scatter</i> )
T-Zelle	im Thymus generierte Lymphozyten-Zelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Drosophila</i> -Toll-Protein homologer Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

---

Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TS	<i>Trans</i> -Sialidase
UTR	untranslatierte Region
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UV	ultraviolett
V	variabel
WGA	Weizenkeim-Agglutinin ( <i>wheat germ agglutinin</i> )
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

# 1 Einleitung

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit

Der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi* ist der Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit. An dieser chronischen Infektionserkrankung sterben jährlich mehrere Zehntausend Menschen. Die Überträger von *T. cruzi* sind 3-4 cm große Raubwanzen der Familie der Reduviiden, wobei *Triatoma infestans* den wichtigsten Zwischenwirt darstellt. Das Endemiegebiet der Raubwanzen ist ausschließlich auf Mittel- und Südamerika begrenzt, weshalb die Krankheit auch nur hier vorkommt.

Benannt ist die Chagas-Krankheit nach dem brasilianischen Arzt Dr. Carlos Chagas. Diesem gelang es 1909 die Raubwanzen als Überträger und *T. cruzi* als Ursache der Krankheit zu identifizieren. In umfassenden Studien konnte er den Lebenszyklus von *T. cruzi* und den Verlauf der Krankheit aufklären (Chagas, 1909).

Systematisch wird *T. cruzi* wie folgt eingeordnet:

System Protozoa

Stamm Sarcomastigophora

Unterstamm Flagellata

Klasse Zoomastigophora

Ordnung Kinetoplastida

Familie Trypanosomatidae

### 1.1.1 Die Chagas-Krankheit ist eine chronische Infektionserkrankung

Die Chagas-Krankheit ist durch eine lebenslange Persistenz der Parasiten im Wirt gekennzeichnet. Zurzeit sind ca. 18 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert und 90 Millionen Menschen sind dem Risiko einer Infektion ausgesetzt (WHO, 2004).

In den ersten drei Monaten der Infektion, der so genannten akuten Phase, können Übelkeit, Erbrechen und leichtes Fieber auftreten. Oft verläuft die akute Phase jedoch vollkommen symptomfrei, was eine rechtzeitige Diagnose der Krankheit erschwert. Am Infektionsort ist bei rund der Hälfte aller Fälle eine Schwellung, ein so genanntes Chagom, zu erkennen. Da die Raubwanzen mit Vorliebe in die weiche Haut am Auge stechen, tritt oft eine typische

Schwellung des Auges, das Romana-Zeichen, auf (Abbildung 1.1). Während der akuten Phase sind die Parasiten lichtmikroskopisch in Blutaussstrichen erkennbar. Eine starke Suppression des Immunsystems begünstigt, dass sich die Parasiten im Wirt verbreiten und beinahe sämtliche Wirtszellen infizieren können. Generell können alle Gewebe von den Parasiten befallen werden, mit deutlicher Präferenz werden jedoch die Muskulatur des Herzens und des



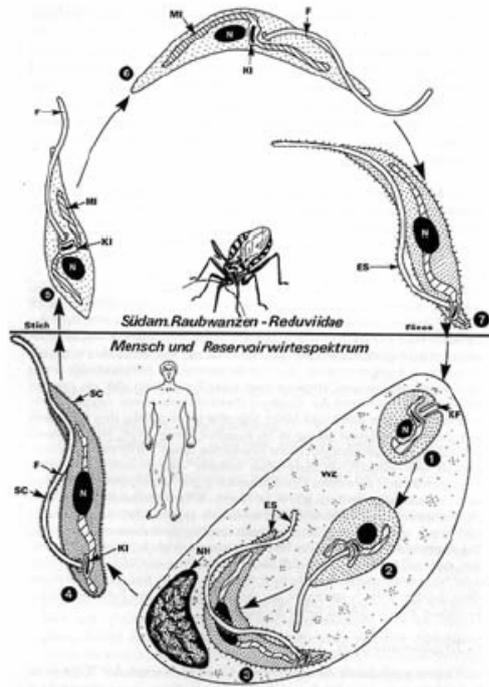
**Abbildung 1.1:**  
**Romana-Zeichen**  
(WHO-Homepage)

Verdauungstraktes infiziert. An die akute Phase schließt sich die intermediäre Phase an, ein Übergangsstadium mit sehr wenigen Trypanosomen im Blut. Bis zu 20 Jahre nach der Infektion geht die intermediäre Phase in die chronische Phase über. Aufgrund der Persistenz der Parasiten in Wirtszellen kommt es zu erheblichen Dilatationen der betroffenen Organe und letztendlich zum Tode der Patienten. Der Grund für die Dilatationen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert (Kierszenbaum, 1999; Tarleton und Zhang, 1999; Tarleton, 2003). Nach der „Inflammationstheorie“ löst die Persistenz der Parasiten eine Entzündungsreaktion in den betroffenen Organen aus, welche zu erheblichen Organschädigungen führt (Higuchi, 1997; Tarleton, 2001). Im Gegensatz dazu postulieren andere Wissenschaftler, dass durch die Persistenz der Parasiten Autoimmunreaktionen induziert werden, welche für die Organschädigungen verantwortlich sind (Cunha-Neto und Kalil, 1995; Leon und Engman, 2001). So konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Chagas-Krankheit gebildete Antikörper und auch aktivierte T-Zellen eine Kreuzreaktivität gegenüber körpereigenen Proteinen besitzen (McCormick und Rowland, 1989; Rizzo et al., 1989, Girones et al., 2001).

### **1.1.2 Der Lebenszyklus von *T. cruzi* ist durch einen Wirtswechsel zwischen Säugetier und Insekt gekennzeichnet**

*T. cruzi* vermehrt und verbreitet sich durch einen Wirtswechsel zwischen Säugetier und Insekt, wobei in beiden Wirten eine massive Vermehrung durch Zweiteilung stattfindet (Abbildung 1.2). Raubwanzen infizieren sich entweder bei der Blutaufnahme oder durch den Kot anderer Wanzen mit Trypanosomen. Im Verdauungstrakt der Raubwanzen replizieren die Trypanosomen als Epimastigote durch einfache Zweiteilung. Nach Durchwanderung des Darms transformieren die Epimastigoten im Enddarm der Raubwanze in metazyklische

Trypomastigote. Diese infektiösen Stadien gelangen bei der Blutmahlzeit der Raubwanzen über die Fäzes auf die Haut des Säugetierwirtes. Hier infizieren sie über den Stichkanal, über



**Abbildung 1.2: Entwicklungszyklus von *T. cruzi***

(aus Mehlhorn und Piekarski, 2002)

Wunden oder Schleimhäute den Säugetierwirt, verteilen sich über den Blutstrom und dringen in Wirtszellen ein. Nach der Zellinvasion gelangt der Parasit aus der parasitophoren Vakuole in das Cytosol der Wirtszelle. Hier kommt es zur Umwandlung in das amastigote Stadium und es beginnt eine massive Vermehrung. Nach einer erneuten Umwandlung in das trypomastigote Stadium wird die Wirtszelle zerstört und die Trypomastigoten gelangen in das extrazelluläre Medium oder die Blutbahn. Die Parasiten können dann sowohl neue Wirtszellen als auch blutsaugende Wanzen infizieren.

### 1.1.3 *T. cruzi* benutzt den Wundheilungsmechanismus zur Zellinvasion

*T. cruzi* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der eine Vielzahl von Zellarten infizieren kann. Die Zellinvasion ist notwendig für sein Überleben im Säugetierwirt, da seine Vermehrung ausschließlich intrazellulär stattfindet. Im Gegensatz zu anderen Parasiten, wie z.B. Leishmanien, deren Wirtszellen professionell phagozytierende Zellen sind, infiziert *T. cruzi* vor allem nicht-phagozytierende Zellen. Hierzu benutzt er ein ganzes Arsenal an heterogenen Oberflächen-Glykoproteinen, sezernierten Proteasen und signalgebenden Molekülen. Obwohl die Zellinvasion noch nicht vollständig geklärt ist, wird allgemein angenommen, dass der Parasit den Lysosomen-vermittelten Wundheilungsmechanismus der Wirtszellen benutzt, um in Zellen einzudringen (Rodriguez et al., 1997; Reddy et al., 2001; Rodriguez et al., 1999). Zwei von *T. cruzi* exprimierte Proteasen scheinen für die Zellinvasion von besonderer Bedeutung zu sein: die Serin-Endopeptidase Oligopeptidase B (Burleigh und Andrews, 1995; Burleigh et al., 1997; Caler et al., 1998) und die Cystein-Protease Cruzipain (Scharfstein et al., 2000). Beiden Peptidasen ist gemeinsam, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonisten erzeugen, die in den

Wirtszellen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Rekrutierung von Lysosomen entlang von Mikrotubuli zu der Plasmamembran auslösen (Tardieux et al., 1992; Rodriguez et al., 1996). An dem Bereich der Membran, an dem der Parasit angeheftet ist, fusioniert die Membran der Lysosomen mit der Plasmamembran, um daraufhin wieder zusammen mit den Parasiten re-internalisiert zu werden. Hierdurch entsteht die so genannte parasitophore Vakuole (Tardieux et al., 1992). Ungefähr 1 Stunde nach der Zellinvasion wird die Membran der Vakuole zerstört und die Parasiten gelangen in das Cytosol der Wirtszellen. Für die Zerstörung der Vakuolenmembran ist das von *T. cruzi* sezernierte Molekül TcTox verantwortlich. Dieses Molekül wird durch eine Ansäuerung der parasitophoren Vakuole aktiviert (Andrews und Whitlow, 1989; Andrews et al., 1990). Gleichzeitig induziert der niedrige pH-Wert die Transformation der Trypanosomen in das amastigote Stadium (Tomlinson et al., 1995).

Neben diesen oben genannten Molekülen, gibt es eine ganze Reihe weiterer Moleküle, die an der Zellinvasion beteiligt sind. Hierzu gehören auch einige Mitglieder der gp85/*Trans*-Sialidase-Superfamilie, die sowohl bei der Zellinvasion als auch der Zerstörung der Vakuolenmembran eine Rolle spielen (Rubin-de-Celis et al., 2006; Yoshida, 2006). Ein Mitglied dieser Superfamilie ist die *Trans*-Sialidase, welche ein entscheidender Virulenzfaktor von *T. cruzi* ist.

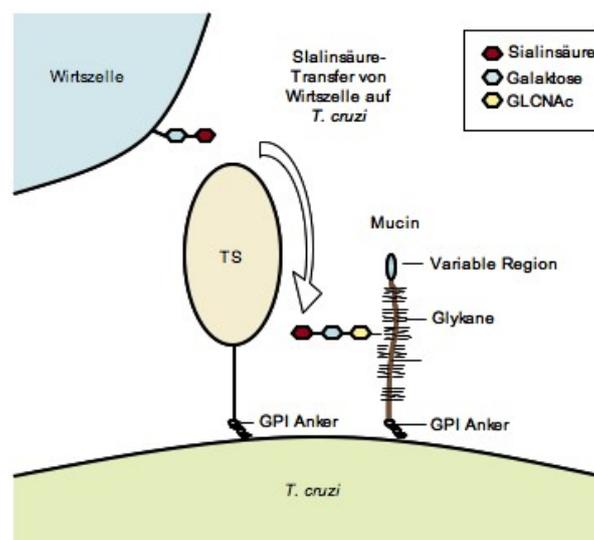
#### **1.1.4 Die *Trans*-Sialidase von *T. cruzi* ist ein einzigartiges Enzym**

Die gesamte Oberfläche der Trypanosomen ist mit Sialinsäuren bedeckt, welche für das Überleben im Säugetierwirt essentiell sind (Schauer et al., 1983). Trypanosomen können jedoch diese Sialinsäuren nicht selbst synthetisieren. Sie exprimieren ein einzigartiges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS), welches als entscheidender Virulenzfaktor beschrieben wurde. Dieses Enzym spaltet Sialinsäuren von Wirtszellen ab und überträgt diese auf Mucin-artige Moleküle auf der Oberfläche des Parasiten (Colli, 1993; Schenkman et al., 1994; Wilson et al., 2000; Frasch, 2000; Buschiazzo et al., 2002).

Die TS gehört der gp85-Superfamilie an. Die katalytische Domäne des Enzyms zeigt drei Aktivitäten: Die Sialidase-Aktivität spaltet - wie herkömmliche Sialidasen - Sialinsäuren von Kohlenhydratstrukturen ab. Die Transferase-Aktivität dagegen ist einzigartig und überträgt Sialinsäure zwischen Glykokonjugaten. Die Lektin-artige Domäne bindet terminale Galaktose-Reste, auf welche die Sialinsäure übertragen wird. Es werden jeweils nur  $\alpha$ 2-3-verknüpfte Sialinsäuren transferiert (Vandekerckhove et al., 1992).

Die TS wird sowohl GPI-verankert auf der Oberfläche von Trypanosomen exprimiert als auch ins extrazelluläre Milieu sezerniert (de Titto und Araujo, 1988; Prioli et al., 1991). Die sezernierte Form der TS spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunsuppression während der akuten Phase der Infektion. Sie verteilt sich über den Blutstrom des Wirtes und kann weit entfernt vom Infektionsort wirken. Sie ist für die Depletion von Thymocyten verantwortlich (Mucci et al., 2002) und spielt eine entscheidende Rolle bei der polyklonalen Aktivierung von Lymphozyten (Todeschini et al., 2002), wodurch keine geordnete Immunantwort mehr stattfinden kann. Die Bedeutung der sezernierten TS wurde im Mausmodell untersucht, in dem eine Gabe von rekombinanter TS vor der Infektion zu einer erhöhten Suszeptibilität der Mäuse führte (Chuencova und Pereira, 1995).

Die GPI-verankerte Form der TS ist für den Transfer von Sialinsäuren von Wirtszellen auf Mucin-artige Moleküle auf der Oberfläche der Trypanosomen verantwortlich (Abbildung 1.3). Die Bedeutung der Sialinsäure-Übertragung wird durch die enorme Anzahl von Genen, die für die TS und für Mucine codieren, verdeutlicht. Im *T. cruzi* Genom codieren 1430 Gene für die TS, was ungefähr 1% des gesamten Genoms ausmacht (El-Sayed et al., 2005). Allerdings sind rund die Hälfte der Gene Pseudogene. Die Mucine werden von 863 Genen codiert; zusätzlich sind 1377 Gene für Mucin-assoziierte Proteine vorhanden (El-Sayed et al., 2005). Obwohl der Sialinsäure-Transfer essentiell für das Überleben des Parasiten im Säugetierwirt ist, sind der genaue Mechanismus und die Bedeutung der Sialylierung der Trypanosomen-Oberfläche jedoch unbekannt. Bemerkenswert ist jedoch, dass die TS-Aktivität mit der Virulenz verschiedener *T. cruzi* Stämme einhergeht (Risso et al., 2004).



**Abbildung 1.3: Die Trans-Sialidase von *T. cruzi***

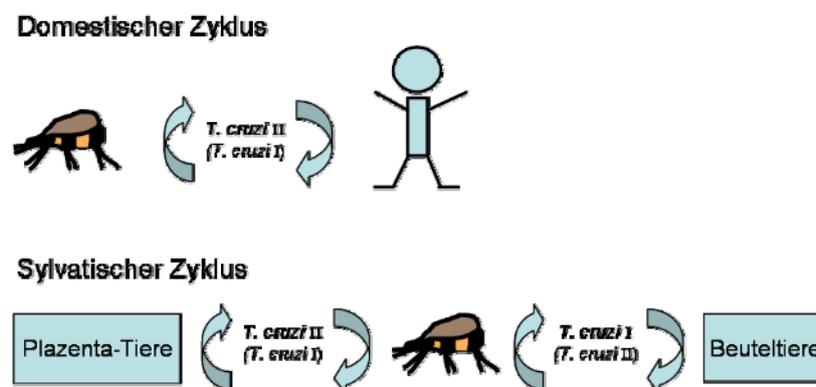
Die *Trans*-Sialidase (TS) ist ein einzigartiges Enzym, das Sialinsäuren von Wirtszellen absplattet und diese auf Mucin-artige Moleküle auf der Oberfläche des Parasiten überträgt.

### 1.1.5 *T. cruzi* wird in zwei phylogenetische Hauptgruppen unterteilt

Das Krankheitsbild der Chagas-Krankheit ist hoch variabel. Der Grund hierfür liegt in der hohen Heterogenität von *T. cruzi*-Populationen. Aufgrund der Analyse von Isoenzymen, rRNA-Promotoren, Microsatelliten-Markern und Mini-Exon-Sequenzen verschiedener *T. cruzi* Isolate wird *T. cruzi* in zwei phylogenetische Hauptlinien eingeteilt. Diese werden mit *T. cruzi* I und *T. cruzi* II bezeichnet (Souto et al., 1996; Zingales et al., 1999).

*T. cruzi* II Stämme kommen im domestischen Infektionszyklus vor. Sie befallen hauptsächlich Säugetiere und sind hoch infektiös. Infektionen mit *T. cruzi* II Parasiten sind durch hohe Parasitämien gekennzeichnet und die Persistenz dieser Stämme führt zu den schweren Symptomen der Chagas-Krankheit (Di Noia et al., 2002; Buscaglia und Di Noia, 2003; Manoel-Caetano und Silva, 2007). *T. cruzi* I Stämme hingegen kommen im sylvatischen Infektionszyklus vor und sind an Beuteltiere adaptiert. Sie können in Plazentatieren keine Parasitämien verursachen und nicht persistieren. Es gibt allerdings Berichte über Co-Infektionen von *T. cruzi* I und *T. cruzi* II Parasiten im Menschen. Hierbei wird angenommen, dass die *T. cruzi* I Parasiten als opportunistische Krankheitserreger die Immunsuppression von *T. cruzi* II-infizierten Menschen ausnutzen (Buscaglia und Di Noia, 2003).

Die *Trans*-Sialidase ist der erste beschriebene Virulenzfaktor, der sich in den beiden *T. cruzi* Linien unterscheidet. *T. cruzi* II Stämme exprimieren und sezernieren höhere Mengen an *Trans*-Sialidase als *T. cruzi* I Stämme (Risso et al., 2004). Aus diesem Grund wird angenommen, dass *T. cruzi* II Stämme höhere Mengen an Sialinsäuren auf der Oberfläche tragen, als die nicht-pathogenen Stämme der *T. cruzi* I Gruppe.



**Abbildung 1.4: Die beiden Infektionszyklen von *T. cruzi***

Aufgrund der unterschiedlichen geographischen Verteilung von Wirten und Vektoren können zwei Infektionszyklen von *T. cruzi* unterschieden werden. *T. cruzi* II Stämme sind infektiös für Menschen und domestizierte Tiere, während *T. cruzi* I Stämme dem sylvatischen Infektionszyklus angehören und Beuteltiere infizieren.

## 1.2 Das Immunsystem

Alle lebenden Organismen sind ständig einer Vielzahl von Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten) ausgesetzt. Das Immunsystem der Vertebraten dient dem Schutze des Organismus vor diesen Pathogenen. Darüber hinaus ist es an der Eliminierung anomaler Körperzellen beteiligt. Das Immunsystem höherer Vertebraten gliedert sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem stellt den entwicklungs geschichtlich älteren Teil der Pathogenabwehr dar. Es dient der sofortigen Abwehr eines Organismus gegen ein Pathogen. Wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind die Phagozyten. Dabei handelt es sich um Makrophagen und neutrophile Zellen, welche Krankheitserreger aufnehmen und zerstören können. Auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spielen bei der angeborenen Immunität vor allem gegen Viren und andere intrazelluläre Krankheitserreger eine wichtige Rolle.

Eine entscheidende Eigenschaft des angeborenen Immunsystems ist, dass es zwischen „fremd“ und „selbst“ unterscheiden kann. Dies wird durch keimbahncodierte Rezeptoren realisiert, welche häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen. Einige dieser Rezeptoren, wie beispielsweise der Mannoserezeptor der Makrophagen, lösen direkt die Phagozytose aus. Andere Rezeptoren sind an der Weitergabe von Signalen beteiligt und lösen induzierte Antworten der angeborenen Immunität aus. Hier spielt die Familie signalgebender Rezeptoren eine große Rolle, die man als Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet.

Kann ein Pathogen nicht durch das angeborene Immunsystem beseitigt werden, so wird letztendlich die adaptive Immunantwort ausgelöst. Die Zellen der angeborenen Immunität spielen dabei sowohl bei der Induktion als auch bei der Effektorfunktion der adaptiven Immunität eine wichtige Rolle. Außerdem beeinflussen die im Laufe der angeborenen Immunität gebildeten Cytokine die funktionelle Differenzierung von T-Zellen und lenken damit die adaptive Immunantwort in eine bestimmte Richtung.

Die adaptive bzw. erworbene Immunantwort wird durch antigenspezifische Lymphozyten vermittelt. Die Rezeptoren der Lymphozyten werden nicht in der Keimbahn codiert. Sie entstehen durch somatische Rekombinationsprozesse, die dazu führen, dass jeder Lymphozyt einen einzigartigen hochspezifischen Rezeptor auf seiner Oberfläche exprimiert (Tonegawa, 1983). Werden nun Lymphozyten durch ihr entsprechendes Antigen stimuliert, so

prolifrieren diese Zellen zunächst. Dadurch wird die Anzahl der zuvor seltenen antigenspezifischen Zellen rasch erhöht. Anschließend differenzieren die Lymphozyten zu Effektorzellen, welche das Pathogen in den meisten Fällen vernichten können. Durch die klonale Vermehrung und Differenzierung dauert es einige Tage, bis die adaptive Immunantwort einsetzt.

Zu den antigenspezifischen Lymphozyten gehören die B- und die T-Zellen. Sie entstehen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (Lemischka et al., 1986). Während die B-Zellen im Knochenmark heranreifen, wandern die Vorläufer der T-Zellen in den Thymus und reifen dort.

Der Antigenrezeptor auf B-Zellen ist ein Zelloberflächenimmunglobulin. Nach der Aktivierung durch ein Antigen differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen, welche Antikörper sezernieren. Sie spielen bei der Abwehr gegen extrazelluläre Krankheitserreger eine wichtige Rolle.

Der Antigenrezeptor von T-Zellen erkennt das Antigen in Form eines MHC-Peptid-Komplexes auf der Oberfläche anderer Zellen. Es gibt zwei Untergruppen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen. Sie lassen sich durch die Corezeptoren CD4 und CD8 und durch die Klassen von MHC-Molekülen, die sie erkennen, unterscheiden.

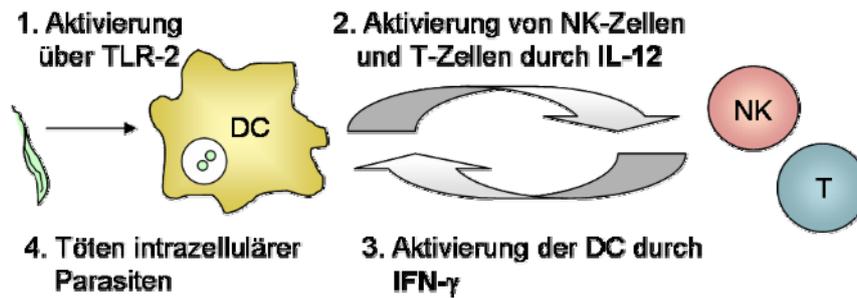
CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen MHC-I-Moleküle, die Peptide aus dem Cytosol präsentieren. Werden diese Zellen aktiviert, differenzieren sie zu cytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen abtöten. Sie lösen dabei über Freisetzung cytotoxischer Granula oder über den membrangebundenen Fas-Liganden eine Apoptose in der Zielzelle aus. Somit schützen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen den Wirt gegen intrazelluläre Krankheitserreger. Ein wichtiges Effektorcytokin der cytotoxischen T-Zellen ist IFN- $\gamma$ , welches in Makrophagen die induzierbare NO-Synthase (iNOS) aktiviert. Durch dieses Enzym wird reaktives Stickstoffoxid (NO) gebildet, das eine breite antimikrobielle Aktivität besitzt.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen dagegen MHC-II-Moleküle, die Peptide aus intrazellulären Vesikeln präsentieren. Nach Aktivierung differenzieren sie zu T-Helferzellen. Ihre Aufgabe ist es, andere Zellen zu aktivieren. Die T<sub>H</sub>1-Zellen aktivieren infizierte Makrophagen über IFN- $\gamma$  und spielen bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene eine wichtige Rolle. Die T<sub>H</sub>2-Zellen aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und sind somit an der Eliminierung extrazellulärer Krankheitserreger beteiligt. Die vor kurzem entdeckten T<sub>H</sub>17-Zellen sezernieren das pro-inflammatorische Cytokin IL-17, welches Neutrophile zum Infektionsherd rekrutieren kann, und sind an der Eliminierung von extrazellulären Krankheitserregern beteiligt, die nicht von T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen bekämpft werden können.

Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Vorläufer-T-Zellen (T<sub>H</sub>0-Zellen) zu einer der beschriebenen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Subpopulationen hängt entscheidend von dem Cytokinmilieu ab, das zum Zeitpunkt der T-Zell-Aktivierung herrscht. Das Cytokin IL-12, das von Dendritischen Zellen sezerniert wird, veranlasst die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen. IL-4 löst dagegen die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen aus und TGF-β ist zusammen mit IL-6 für eine Differenzierung zu T<sub>H</sub>17-Zellen verantwortlich.

### 1.3 Die Immunantwort gegen *T. cruzi*

Bei einer *T. cruzi* Infektion kommt es kurz nach der Invasion zu einer starken Aktivierung des Immunsystems (Abbildung 1.5). Dendritische Zellen und Makrophagen werden über den TLR-2 aktiviert, welcher GPI-Anker auf der Oberfläche von *T. cruzi* erkennt (Campos et al., 2001). Diese Aktivierung löst eine starke Produktion von IL-12 aus. IL-12 aktiviert NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Frosch et al., 1996; Aliberti et al., 1996; Meyer zum Büschenfelde et al., 1997) und leitet darüber hinaus die Differenzierung von T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen ein. Die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Antwort ist essentiell für die Bekämpfung einer *T. cruzi* Infektion (Kumar und Tarleton, 2001). NK-Zellen, CD8<sup>+</sup>- und T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren das Cytokin IFN-γ, welches Makrophagen und Dendritische Zellen dazu veranlasst, aufgenommene Trypanosomen iNOS-abhängig zu töten (Torrice et al., 1991; Golden und Tarleton, 1991; Silva et al., 1992; Hölscher et al., 1998; Säftel et al., 2001; Lieke et al., 2004). Die Bedeutung der Cytokine IL-12 und IFN-γ wurde anhand von IL-12- bzw. IFN-γ-defizienten Mäusen gezeigt, welche eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *T. cruzi* Infektion aufweisen (Michailowsky et al., 2001). iNOS-defiziente Mäuse versterben ähnlich schnell, wie IL-12- und IFN-γ-defiziente Mäuse (Säftel et al., 2001). Auch die Depletion von NK-Zellen *in vivo* führt zu höheren Parasitämien und einer erhöhten Sterberate von infizierten Mäusen (Cardillo et al., 1996; Cardillo et al., 2002; Lieke et al., 2004). Die Bedeutung von T-Zellen während einer *T. cruzi* Infektion konnte unter Verwendung von infizierten MHC-I- und MHC-II-defizienten Mäusen gezeigt werden, welche keine CD8<sup>+</sup>-, bzw. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen besitzen. Diese Mäuse sind ebenfalls suszeptibel für eine *T. cruzi* Infektion (Rottenberg et al., 1993; Tarleton et al., 1992; Tarleton et al., 1996).



**Abbildung 1.5: Die protektive Immunantwort gegen *T. cruzi***

Dendritische Zellen (DC) werden über den TLR-2 aktiviert, welcher GPI-verankerte Moleküle auf der Trypanosomen-Oberfläche erkennt. Sie sezernieren daraufhin IL-12, welches NK-Zellen und T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion aktiviert. IFN- $\gamma$  aktiviert Dendritische Zellen dazu, aufgenommene Trypanosomen zu töten.

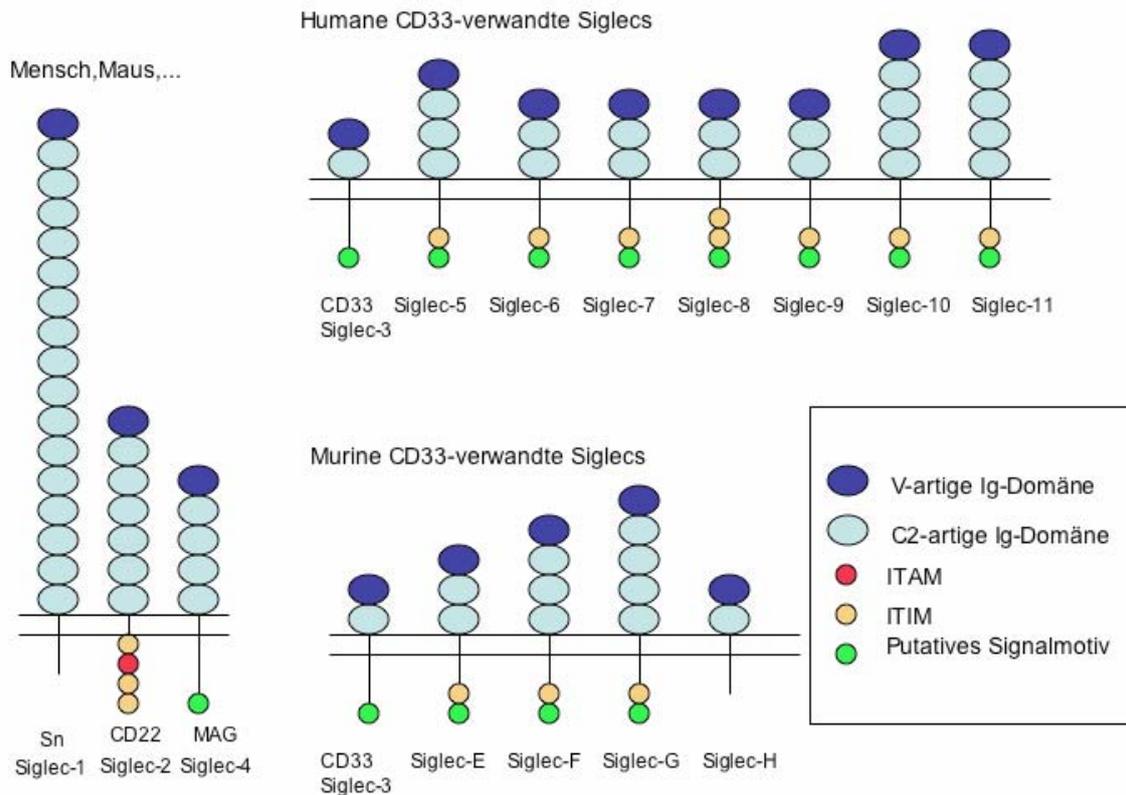
Die oben beschriebenen Mechanismen spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Trypanosomen. NK-Zellen können darüber hinaus extrazelluläre Parasiten direkt angreifen und diese durch kontaktabhängige Lyse zerstören (Lieke et al., 2004). Diese Lyse wird durch cytotoxische Granula vermittelt und ist abhängig von der Aktivierung der NK-Zellen durch IL-12.

Aufgrund der protektiven Immunantwort gegen *T. cruzi* kann das Parasitenwachstum in der akuten Phase der Infektion begrenzt werden. Nichtsdestotrotz kommt es zu einer starken Suppression des Immunsystems, wodurch sich die Parasiten im Wirt verbreiten und Wirtszellen infizieren können. Die *Trans*-Sialidase spielt bei der Immunsuppression eine entscheidende Rolle. Die sezernierte Form der *Trans*-Sialidase induziert im Thymus eine Apoptose von Thymocyten und kann darüber hinaus Lymphozyten polyklonal aktivieren, so dass diese nicht mehr zu einer geordneten *T. cruzi* Abwehr fähig sind. Auch die membranständige *Trans*-Sialidase spielt eine Rolle bei der Immunsuppression. Lange Zeit wurde angenommen, dass der Transfer von Sialinsäuren auf die Trypanosomen-Oberfläche nur dazu dient, den Parasiten vor Erkennung durch das wirtseigene Immunsystem zu schützen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass viele sialylierte Krankheitserreger direkt mit Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems interagieren und so ihre Infektiosität fördern. Zu derartigen Rezeptoren gehören unter anderem die Siglecs.

## 1.4 Siglecs sind Sialinsäure-bindende Lektine

Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) sind Sialinsäure-bindende Lektine der Ig-Superfamilie, die hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Sie gehören zu den Typ-I Transmembranproteinen. Der extrazelluläre aminoterminaler Teil besteht aus einer V-artigen Ig-Domäne, welche für die Sialinsäure-Bindung verantwortlich ist, und einer variablen Anzahl an C2-artigen Domänen. Der cytosolische Carboxy-Terminus enthält bei den meisten Siglecs inhibitorische Tyrosin-basierte Signalmotive (zusammengefasst von Varki und Angata, 2006; Crocker, Paulson und Varki, 2007).

Siglecs werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit und ihrer evolutionären Konservierung in zwei Hauptgruppen eingeteilt (Abbildung 1.6). Eine Gruppe umfasst die Siglecs Sialoadhesin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), MAG (myelin-associated glycoprotein, Siglec-4) und Siglec-15. Diese Siglecs sind hochkonserviert, aber wenig miteinander verwandt (25-30% Sequenzidentität). Man findet direkte Orthologe dieser Siglecs in allen Säugetierarten. Zur zweiten Gruppe gehören CD33 (Siglec-3) und CD33-verwandte Siglecs (Mensch: Siglec-5 bis -11 und Siglec-14, Maus: Siglec-E bis -H). Diese Siglecs sind eng miteinander verwandt (50-99% Sequenzidentität), zeichnen sich aber durch eine schnelle Evolution über unterschiedliche Mechanismen, wie Genduplikation, Genkonversion und Genumlagerung, aus (Angata et al., 2004). Daher findet man auch keine direkten Orthologe der CD33-verwandten Siglecs in verschiedenen Säugetierarten.



**Abbildung 1.6: humane und murine Siglecs**

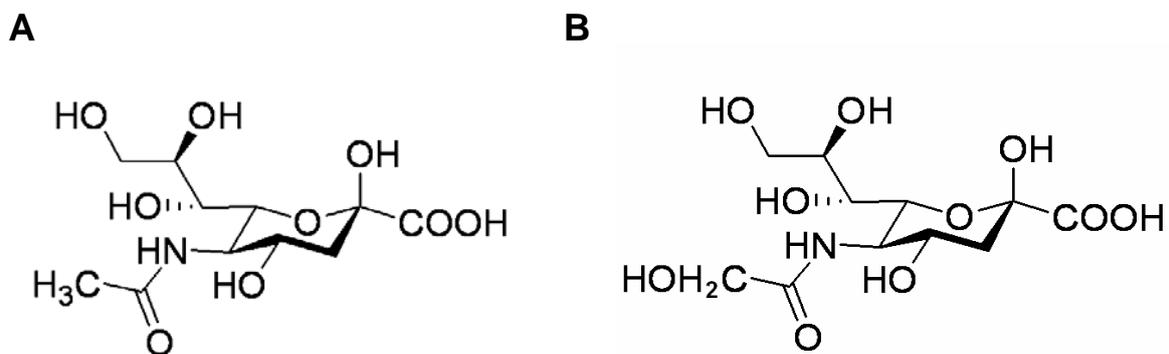
Siglecs können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die CD33-verwandten Siglecs (rechts), welche sich durch eine schnelle Evolution auszeichnen und sich in verschiedenen Säugetierarten unterscheiden und die Siglecs der konservierten Gruppen (links), welche direkte Orthologe in allen Säugetieren besitzen.

### 1.4.1 Siglecs werden von Zellen des Immunsystems exprimiert

Mit Ausnahme von Siglec-4 und Siglec-6, welche auf Glia-Zellen bzw. auf Trophoblasten exprimiert sind, werden alle anderen Siglecs von Zellen des Immunsystems exprimiert. Das Expressionsmuster der Siglecs auf den verschiedenen Zelltypen des Immunsystems ist zwar überlappend, aber dennoch hochspezifisch, was impliziert, dass jedes Siglec eine einzigartige Funktion ausübt. Während einige Siglecs nur auf einem Zelltyp vorkommen - die selektive Expression von Siglec-1, Siglec-2 und Siglec-4 auf Makrophagen, B-Zellen bzw. Glia-Zellen ist in allen Säugetieren konserviert - werden andere Siglecs von mehreren Zellarten exprimiert. Die Ausnahme bilden ruhende T-Zellen mit einer sehr geringen Siglec-Expression (Razi und Varki, 1999). Das Expressionsmuster der einzelnen Siglecs ist in den Tabellen 1.1 und 1.2 zusammengefasst.

## 1.4.2 Die Sialinsäure als Ligand für Siglecs

Die Bindung von Sialinsäure ist wichtig für die Funktion der Siglecs bei der Zell-Zell-Adhäsion, der Signalübertragung oder der Endozytose (Crocker, 2002; Nitschke, 2005). Generell ist die Bindungsstärke von Siglecs an Sialinsäure niedrig. Die Affinität der Interaktion von Siglecs mit N-Acetylneuraminsäure  $\alpha$ 2-3 verknüpft mit Galaktose (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal) liegt zwischen Kd 0,1-3 mM (Blixt et al., 2003). Diese Form der Sialinsäure kommt üblicherweise als terminaler Rest von Zuckerstrukturen in Glykoproteinen und Glykolipiden vor. Neben der N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) kommt eine weitere Sialinsäure, die N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc), vor (Abbildung 1.7). Diese wird aufgrund einer Mutation des Cytosin-Monophosphat-Neu5Ac-Hydroxylase-Gens im Menschen nicht exprimiert, ist aber in allen anderen Säugetieren vorhanden (Chou et al., 1998; Muchmore et al., 1998; Chou et al., 2002; Varki, 2002). Jedes Siglec besitzt eine eigene Bindungsspezifität für sialylierte Liganden. Humanes und murines Siglec-1 binden beispielsweise spezifisch Neu5Ac (Kelm et al., 1994; Kelm et al., 1998; Brinkman-Van der Linden et al., 2000). Dagegen bindet murines CD22 bevorzugt Neu5Gc (Kelm et al., 1994; Van der Merwe et al., 1996; Kelm et al., 1998), während humanes CD22 beide Formen bindet (Brinkman-Van der Linden et al., 2000; Collins et al., 2002).



**Abbildung 1.7: Die Sialinsäure**

Die N-Acetylneuraminsäure (A) und die N-Glykolylnneuraminsäure (B) sind zwei bedeutende Formen der Sialinsäure. Während die N-Acetylneuraminsäure in allen Säugetierarten exprimiert wird, kommt die N-Glykolylnneuraminsäure aufgrund einer Mutation des Cytosin-Monophosphat-Neu5Ac-Hydroxylase-Gens im Menschen nicht vor, ist aber in allen anderen Säugetieren vorhanden.

Die Sialinsäure kann über eine  $\alpha$ 2-3-, eine  $\alpha$ 2-6- oder eine  $\alpha$ 2-8-glykosidische Bindung mit endständigen Zuckerresten verknüpft sein. Auch in Bezug auf diese glykosidischen Bindungen besitzen Siglecs unterschiedliche Bindungsspezifitäten. Siglec-1 bindet ausschließlich  $\alpha$ 2-3 verbundene Liganden, während CD22 spezifisch  $\alpha$ 2-6 Verbindungen erkennt (Powell et al., 1993; Sgroi et al., 1993). Die Tabellen 1.1 und 1.2 zeigen einen Überblick über die Expression und die Bindungsspezifität humaner und muriner Siglecs.

Das „Consortium for Functional Glycomics“ untersucht eine enorme Anzahl von modifizierten Zuckerstrukturen im Hinblick auf die Interaktion mit Siglecs (<http://www.functionalglycomics.org>). Hierbei wurden unter anderem hoch-affine Siglec-Liganden gefunden, welche Sulfatreste besitzen. Beispielsweise erkennt Siglec-8 spezifisch 6'-Sulfo-Sialyl-Lewis x als Liganden (Blixt et al., 2004). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur der terminale Sialinsäurerest für die Siglec-Bindung von Bedeutung ist, sondern dass auch die subterminalen Zuckerreste an der Bindung beteiligt sind (Blixt et al., 2004).

Tabelle 1.1: Expression und Bindungsspezifitäten humaner Siglecs

Humane Siglecs	Alternativer Name	Expression	Bindungsspezifität für die Sialinsäure-Verknüpfung
Siglec-1	Sialoadhesin, CD169	Makrophagen	2,3>2,6>2,8
Siglec-2	CD22	B-Zellen	2,6
Siglec-4	MAG	Oligodendrozyten, Glia-Zellen	2,3>>2,6
Siglec-15	-	Nicht bekannt	
Siglec-3	CD33	Myeloide Vorläufer, Monozyten	2,6>2,3
Siglec-5	CD170	Neutrophile, Monozyten	2,3=2,6>2,8
Siglec-6	CD327	Trophoblasten	
Siglec-7	CD328	NK-Zellen, Monozyten	2,8>>2,6>2,3
Siglec-8	-	Eosinophile	2,3>2,6
Siglec-9	CD329	Makrophagen, Neutrophile, Dendritische Zellen	2,3=2,6
Siglec-10	-	B-Zellen	2,3=2,6
Siglec-11	-	Makrophagen	2,8
Siglec-14	-	Nicht bekannt	

Tabelle 1.2: Expression und Bindungsspezifitäten muriner Siglecs

Murine Siglecs	Alternativer Name	Expression	Bindungsspezifität für die Sialinsäure-Verknüpfung
Siglec-1	Sialoadhesin, CD169	Makrophagen	2,3>2,6>2,8
Siglec-2	CD22	B-Zellen	2,6
Siglec-4	MAG	Oligodendrozyten, Glia-Zellen	2,3>>2,6
Siglec-15	-	Nicht bekannt	
Siglec-3	CD33	Neutrophile,	2,6>2,3
Siglec-E	-	Neutrophile, Monocyten, Dendritische Zellen	2,3=2,6
Siglec-F	-	Eosinophile	2,3=2,6>2,8
Siglec-G	-	B-Zellen	2,3=2,6
Siglec-H	-	Dendritische Zellen, Makrophagen	

### 1.4.3 Die meisten Siglecs besitzen inhibierende Signalmotive

Mit Ausnahme des humanen Siglec-1 und der murinen Siglecs-3 und -H besitzen alle Siglecs inhibitorische Tyrosin-basierte Signalmotive in ihren cytoplasmatischen Domänen. Bei den meisten Signalmotiven handelt es sich um ein ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) und ein ITIM-ähnliches Motiv. Mehrere Studien belegen, dass diese ITIMs die inhibitorischen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutieren (Falco et al., 1999; Taylor et al., 1999; Ulyanova et al., 1999; Paul et al., 2000; Whitney et al., 2001; Ulyanova et al., 2001; Yu et al., 2001; Yu et al., 2001; Angata et al., 2002; Kitzig et al., 2002; Ikehara et al., 2004) und so Signale hemmen, die über aktivierende Rezeptoren ausgesendet werden. In Übereinstimmung hiermit wurden viele Siglecs als inhibierende Rezeptoren beschrieben (Ravetch und Lanier, 2000).

Die ITIMs haben darüber hinaus das Potential mit der  $\mu$ -Untereinheit des AP2-Komplexes zu interagieren, welcher bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielt (Bonifacino und Traub, 2003). In der Tat konnte eine derartige Interaktion bei CD22 nachgewiesen werden (John et al., 2003). Weiterhin konnte bei mehreren Siglecs, darunter CD22, CD33 und Siglec-5, eine Antikörper-getriggerte Endozytose induziert werden (Zhang und Varki, 2004; Lock et al., 2004). Obwohl bis heute nicht bekannt ist, welche biologische Funktion durch eine Antikörper-getriggerte Endozytose nachgeahmt wird, findet dieses Phänomen in der Medizin bereits praktische Anwendung. So wird beispielsweise ein Toxin-gekoppelter anti-CD33

Antikörper bei der Behandlung von CD33-exprimierenden akuten myeloiden Leukämiezellen eingesetzt (Vitale et al., 2001; Virgo et al., 2003).

#### **1.4.4 Siglecs können angeborene und adaptive Immunantworten modulieren**

Aufgrund der Expression von Siglecs auf Zellen des Immunsystems und der Anwesenheit von inhibierenden Signalmotiven wird angenommen, dass Siglecs eine Funktion bei der Modulation von Leukozyten spielen. Unter Verwendung von Siglec-defizienten Mäusen einerseits und von quervernetzenden anti-Siglec Antikörpern andererseits konnte die Rolle mehrerer Siglecs bei der Modulation von Immunantworten bestätigt werden.

Einen ausgeprägten Phänotyp besitzt beispielsweise die CD22-defiziente Maus, die eine starke Prädisposition für die Produktion von hochaffinen Autoantikörpern hat (O'Keefe et al., 1999). Die CD22-negativen B-Zellen dieser Maus zeigen eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach B-Zell-Rezeptor-Stimulation und weisen einen  $\text{IgM}^{\text{lo}}$   $\text{MHCII}^{\text{hi}}$  Phänotyp auf, der charakteristisch für eine chronische Aktivierung ist (Nitschke et al., 1997). Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse auf eine Rolle von CD22 als negativen Regulator von B-Zellen schließen. Einen weiteren direkten Beweis für die immunmodulierende Funktion von Siglecs lieferte die Siglec-F-defiziente Maus. In einem Mausmodell für allergisches Asthma, konnte bei dieser Maus eine Eosinophilie festgestellt werden, was für eine inhibierende Rolle von Siglec-F bei der Kontrolle der Leukozytenexpansion spricht (Zhang et al., 2007).

Wichtige Informationen über die inhibierende Funktion anderer CD33-verwandter Siglecs wurden über die Verwendung von quervernetzenden anti-Siglec Antikörpern erhalten. Ein anti-CD33-Antikörper übt beispielsweise direkt einen inhibierenden Einfluss auf die Cytokinproduktion von Monozyten aus (Lajaunias et al., 2005). Mit Hilfe eines anti-Siglec-9 Antikörpers konnte darüber hinaus eine Apoptose von Neutrophilen induziert werden (von Gunten et al., 2005), während ein anti-Siglec-8 Antikörper eine Apoptose von Eosinophilen auslöste (Nutku et al., 2003).

### 1.4.5 *Cis*- und *trans*-Interaktionen

Sialinsäuren werden von Immunzellen in hoher Konzentration exprimiert, was dazu führt, dass Siglec-exprimierende Zellen somit ebenfalls Siglec-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen. Als Konsequenz sind Siglecs auf der Zelloberfläche durch *cis*-Interaktionen „maskiert“ (Razi und Varki, 1998; Razi und Varki, 1999). Die einzige Ausnahme bildet Sialoadhesin, welches aufgrund seiner 17 Ig-Domänen weit über die Zelloberfläche hinausragt und nicht maskiert ist (Munday et al., 1999). Interaktionen mit *cis*-Liganden dominieren wahrscheinlich über Interaktionen mit *trans*-Liganden (Crocker, 2005; Varki und Angata, 2006). Am Beispiel von CD22 konnte jedoch gezeigt werden, dass hoch-affine synthetische Sialoside (sialylierte Glykane) *cis*-Liganden aus der Interaktion mit CD22 verdrängen können (Collins et al., 2006). Dieses Ergebnis demonstriert, dass *trans*-Interaktionen trotz *cis*-Bindungen möglich sind, wenn die *trans*-Liganden eine hohe Affinität besitzen.

Bei einigen Pathogenen kommt ein weiterer Mechanismus vor, durch den *cis*-Interaktionen zerstört werden. Diese Pathogene exprimieren Sialidasen, welche die Sialinsäuren von *cis*-Liganden abspalten und somit die *cis*-Interaktionen lösen. Die freien Siglecs können dann mit sialylierten Strukturen auf der Pathogen-Oberfläche interagieren.

### 1.4.6 Liganden auf Pathogenen

Es gibt über 20 pathogene Mikroorganismen, welche die Fähigkeit besitzen, Sialinsäuren zu synthetisieren oder sie von Wirtszellen auf die eigene Oberfläche zu übertragen (Vimr und Lichtensteiger, 2002). Diese Sialinsäuren sind essentiell für das Überleben dieser Pathogene im Wirt (Vimr et al., 2004). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Sialinsäuren antigene Determinanten der Krankheitserreger maskieren und so den Krankheitserreger vor einer Erkennung durch das Wirtsimmunsystem schützen. Neuere Studien beschäftigen sich mit der direkten Interaktion der Sialinsäuren mit Wirtszellrezeptoren, welche sogar eine Infektion fördern können, sei es durch eine verbesserte Zellinvasion oder durch eine Modulation des Immunsystems. Bisher gibt es eine ganze Reihe von Berichten, dass sialylierte Krankheitserreger mit Siglecs interagieren. Ein Beispiel ist die Interaktion von Sialoadhesin auf Makrophagen mit HIV-1, was zu einer erhöhten Infektion von Ziel-Zellen führt (Rempel

et al., 2008). Andere Beispiele sind die Interaktion von Siglec-9 mit Gruppe B Streptokokken (Carlin et al., 2007) oder von Sialoadhesin mit *T. cruzi* (Monteiro et al., 2005).

### **1.4.7 Das murine Molekül Siglec-E wird auf Phagozyten und NK-Zellen exprimiert**

In dieser Arbeit wird die Interaktion von *T. cruzi* mit dem murinen Molekül Siglec-E untersucht. Siglec-E gehört zu den CD33-verwandten Siglecs. Es besteht aus 467 Aminosäuren, die drei extrazelluläre Ig-Domänen, eine Transmembran-Region und eine cytoplasmatische Domäne bilden (Yu et al., 2001). Die extrazelluläre V-artige Ig-Domäne ist für die Bindung von Sialinsäure verantwortlich. Der cytosolische Teil trägt zwei inhibitorische Signalmotive, nämlich ein ITIM und ein ITIM-ähnliches Motiv. Diese Signalmotive können nach Tyrosinphosphorylierung die inhibitorischen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 binden (Yu et al., 2001).

Siglec-E zeigt einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit mit den humanen Siglecs-7 und -9 (53% bzw. 52% Sequenzidentität) (Yu et al., 2001). Auch das Expressionsmuster von Siglec-E ähnelt dem der beiden humanen Siglecs. Siglec-E wird in hohem Maße auf Neutrophilen in Blut und Knochenmark exprimiert, kommt aber auch auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und NK-Zellen vor (Zhang et al., 2004). Darüber hinaus besitzt es eine ähnliche Bindungsspezifität für  $\alpha$ 2-3 verbundene Neu5Ac. Aufgrund dieser Eigenschaften wird angenommen, dass Siglec-E das murine Ortholog zu den humanen Siglecs-7 und -9 ist.

## 1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Während einer *T. cruzi* Infektion kommt es zu einer starken Suppression des Immunsystems, wodurch sich die Parasiten im Wirt verbreiten und Wirtszellen infizieren können. Die *Trans*-Sialidase ist ein entscheidender Virulenzfaktor von *T. cruzi*. Dieses Enzym spaltet Sialinsäuren von Wirtszellen ab und überträgt sie auf Mucin-artige Moleküle auf der Trypanosomen-Oberfläche. Die *Trans*-Sialidase ist der erste beschriebene Virulenzfaktor, der sich zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *T. cruzi* Stämmen unterscheidet. Pathogene *T. cruzi* II Stämme exprimieren höhere Mengen des Enzyms als nicht-pathogene Parasiten der *T. cruzi* I Gruppe. Daher wird angenommen, dass die Oberfläche der pathogenen Parasiten in höherem Maße sialyliert ist. Die Sialinsäuren spielen eine entscheidende Rolle bei der Suppression von Immunantworten in der akuten Phase der Infektion. Bisherige Studien zeigten, dass die Sialinsäuren antigene Determinanten von *T. cruzi* maskieren und so die Parasiten vor Erkennung durch das wirtseigene Immunsystem schützen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Sialinsäuren direkt mit Rezeptoren auf Immunzellen interagieren und so aktiv das Immunsystem modulieren. Der hier untersuchte Rezeptor ist das murine Molekül Siglec-E, welches auf phagozytierenden Zellen und NK-Zellen exprimiert wird. Siglec-E gehört zur Familie der Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins). Diese Moleküle binden spezifisch Sialinsäure und können aufgrund von inhibitorischen Tyrosin-basierten Signalmotiven sowohl angeborene als auch erworbene Immunantworten supprimieren. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass andere Mitglieder dieser Familie mit sialylierten Pathogenen interagieren.

In dieser Arbeit werden zwei *T. cruzi* Stämme verwendet: Der Tulahuen-Stamm ist ein pathogener Stamm der *T. cruzi* II Gruppe, während der nicht-pathogene Stamm Tehuantepec der *T. cruzi* I Gruppe angehört. Es soll hier untersucht werden, ob sich die beiden Stämme aufgrund ihrer unterschiedlichen *Trans*-Sialidase-Aktivität und somit aufgrund ihres unterschiedlichen Sialinsäure-Gehaltes in der Siglec-E-Bindung unterscheiden. Eine stärkere Siglec-E-Bindung durch den pathogenen Stamm könnte eine stärkere Immunsuppression zur Folge haben und somit eine Erklärung für die Korrelation zwischen der *Trans*-Sialidase-Aktivität und der Infektiosität von verschiedenen *T. cruzi* Stämmen liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme wurden im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin oder im Tierhaus des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Für Experimente wurden Mäuse im Alter zwischen sechs und acht Wochen eingesetzt.

BALB/c (H-2 <sup>d</sup> )	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
C57BL/6 (H-2 <sup>b</sup> )	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
OT-I (H-2 <sup>b</sup> )	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
SCID	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA

#### 2.1.2 Parasiten

<i>T. cruzi</i> Tulahuen (WHO Referenz-Stamm M/HOM/CH/00/Tulahuen C2)	MPI für Immunbiologie, Freiburg
<i>T. cruzi</i> Tehuantepec	im BNI vorhanden, zur Verfügung gestellt von PD Dr. Sebastian Gräfe

#### 2.1.3 Zelllinien

L929 (murine Fibroblasten-Zelllinie)	ATCC, Rockville Maryland, USA
CHO (ovariale Zelllinie des chinesischen Hamsters)	BNI, Hamburg
THP-1 (humane Makrophagenzelllinie)	BNI, Hamburg

#### 2.1.4 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm DH5 $\alpha$ F'	New England Biolabs
--------------------------------------	---------------------

### 2.1.5 Antikörper, Lektine, Fusionsproteine

#### FACS:

Ziege anti-Kaninchen-Alexa488	Jackson ImmunoResearch
Huhn anti-Ratte-Alexa594	Molecular Probes
Ratte anti-Maus Siglec-E	Biozol
Ziege anti-Ratte-PE	Jackson ImmunoResearch
Esel anti-Human-PE	Jackson ImmunoResearch
Streptavidin-APC	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-CD45-APC	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-CD11b-PerCP	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-Gr1-PE	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-DX5-PE	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-CD40-Biotin	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-CD86-PE	BD Pharmingen
Ratte anti-Maus-MHCII-PE	BD Pharmingen

#### Western-Blot:

Kaninchen anti-Human-HRP	DAKO
Ziege anti-Kaninchen-HRP	DAKO

#### Lektine:

PNA ( <i>peanut agglutinin</i> )	Vector Laboratories
WGA ( <i>wheat germ agglutinin</i> )	Vector Laboratories
MAL II ( <i>Maackia amurensis</i> Lektin II)	Vector Laboratories
SNA ( <i>Sambucus nigra</i> Lektin)	Vector Laboratories

#### Fusionsproteine:

PD-L1-Fc	BNI, Hamburg, hergestellt von A. von Bonin
----------	--

#### ELISA:

IL-12	BD Pharmingen
IL-2	R&D Systems
IFN- $\gamma$	R&D Systems

### 2.1.6 Primer

Siglec-E- <i>Eco</i> RI-sense	5'-GCTAGCGTTTAGAATTCAGCTTGAC-3'
Siglec-E- <i>Hind</i> III-antisense	5'-CATCAAAGCTTCAGATAAAGTTGCACTGC-3'
Siglec-E- <i>Hind</i> III-sense	5'-CGAGACAGTTTAAGCTTGACATGCTGC-3'
Siglec-E- <i>Bam</i> HI-antisense	5'-CATCGGATCCTCAGATAAAGTTGCAC-3'
Siglec-E- <i>Eco</i> RI-antisense	5'-GAATTCTCCAGCCACGGTCATGG-3'

### 2.1.7 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG
Blot-Kammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
β-Szintillationszähler	EG & G Wallac
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Instruments
Digitalwaage	Kern & Söhne
ELISA-Reader Lambda E	MWG-Biotech
FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson
Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Filmentwickler (Curix 60)	Agfa-Gevaert AG
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus)	Zeiss
Gelkammern (Agarose-Gelelektrophorese)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Gelkammern (Protein-Gelelektrophorese)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf
Magnetrührer	IKA <sup>®</sup> Labortechnik
Mikroskop	Wilore
Mikrowelle	SHARP
Netzteil (Agarose-Gelelektrophorese)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Netzteil (Protein-Gelelektrophorese)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PCR-Thermocycler (Hybaid OmniGene)	Hybaid Ltd.
PCR-Thermocycler (Px2 Thermalcycler)	Thermo Electron GmbH
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec
Photoapparatur für DNA-Gele	Mitsubishi
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen	Hirschmann Laborgeräte
Schüttelinkubator für Bakterien	B. Braun Biotech International
Spektralphotometer	Hitachi
Sterile Arbeitsbank (Lamin Air HB2448)	Heraeus Instruments
UV-Tisch	Internat. Biotechnologies
Vortexer	IKA <sup>®</sup> Labortechnik
Wasserbad	GFL
Wasserdeionisierungsanlage	SG Clear
Zellerntegerät (Micro cell Harvester)	Inotech, Dottikon
Zentrifuge Modell 5415C	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus-Sepatech

### 2.1.8 Glas- und Plastikwaren

Cryoröhrchen (1,8 ml)	Greiner
Chamber-Slides	Nalge Nunc International
CELLine Bioreaktoren	Integra Biosciences
Deckgläschen	Engelbrecht
Elektroporationsküvette	PEQLAB Biotechnologie GmbH
ELISA-Platten	Greiner
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Gewebekulturflaschen (10 ml)	Greiner
Gewebekulturplatten	Greiner
Glaspipetten	Brand

Kanülen	Braun
Objektträger	Nunc
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen (Ø 90 mm, Cellstar)	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
Plastikpipetten (25 ml)	Greiner
Quarzküvetten	Hellma
Spritzen	Braun
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore
Vivaspin	Vivascience AG
Zählkammer nach Neubauer	Brandt
Zentrifugenröhrchen	Greiner

## 2.1.9 Material für molekularbiologisches Arbeiten

### 2.1.9.1 Reagenzien

Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Trypton	Difco
Bromphenolblau	Sigma
Desoxyribonukleosidtriphosphate	MBI Fermentas
Dithiothreitol (DTT)	Gibco
DNA-Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Sigma
Hefeextrakt	Difco
Mineralöl	Sigma
Oligo(dT) <sub>15</sub> -Primer	Roche
Plasmid-Mini-Kit (NucleoSpin Plasmid)	Macherey&Nagel
Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN
Primer	MWG Biotech
QIAEX <sup>®</sup> II-DNA-Gelextraktions-Kit	QIAGEN
QIAGEN-EndotoxFree-Plasmid-Kit	QIAGEN
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN
TRI Reagent <sup>®</sup>	Molecular Research Center
X-Gal	MBI Fermentas

### 2.1.9.2 Kulturmedien, Puffer, verwendete Stammlösungen

#### LB-Medium:

10,0 g	Bacto-Trypton
5,0 g	Hefeextrakt
10,0 g	NaCl
ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O, pH 7.4, anschließend autoklavieren	

#### LB-Agarplatten:

Pro Liter LB-Medium wurden 15,0 g Bacto-Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden dem abgekühlten Medium (55°C) die entsprechenden

Antibiotika zugeben. Jeweils 20 ml wurden in Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur zum Aushärten stehen gelassen.

LB-Ampicillin-Medium:

LB-Medium mit Ampicillin (finale Konzentration 50 µg/ml)

Ampicillin-Stammlösung:

50 mg/ml, anschließend Sterilfiltration

Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTPs):

Je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

6x Ladepuffer für Agarosegele:

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF  
15 % Ficoll

DNA-Molekulargewichtsmarker:

83 µg/ml

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml

5x KCM-Medium:

0,50 M KCl  
0,15 M CaCl<sub>2</sub>  
0,25 M MgCl<sub>2</sub>  
ad 30 ml mit ddH<sub>2</sub>O, anschließend Sterilfiltration

Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer-Lösung:

8 µM

50x TAE-Puffer:

0,6 M Natriumacetat  
2,0 M Tris-Base  
0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA  
pH 8.3

10x TBE-Puffer:

0,89 M Tris-Base  
0,89 M Borsäure  
20 mM Na<sub>2</sub>EDTAx2 H<sub>2</sub>O  
pH 8.0

TSB-Puffer:

41 ml 2x LB-Medium  
10 % PEG (MW 3350)  
5 % DMSO  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
ad 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O, anschließend Sterilfiltration

X-Gal-Stammlösung:

20 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal) in Dimethylformamid

### 2.1.9.3 Plasmide

pDrive Cloning Vektor	QIAGEN
pcDNA3.1	Invitrogen
pCMV-SPORT6	zur Verfügung gestellt von F. Koch-Nolte, UKE, Hamburg

### 2.1.9.4 Enzyme

<i>Bam</i> HI, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
<i>Pvu</i> I, 10 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
Taq-DNA-Polymerase, 1 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
Powerscript™ Reverse Transkriptase	BD Pharmingen
T4-DNA-Ligase, 5 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas

## 2.1.10 Material für biochemische Arbeiten

### 2.1.10.1 Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
BSA	Serva Feinbiochemika
Cellophanfolien für Proteingele	Roth
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia
Film EPH 1600	Kodak
Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia
2-Mercaptoethanol	Sigma
Milchpulver	Nestle
Protein-Marker, 10-200 kD	MBI Fermentas
Protein-Marker, prestained	Invitrogen
Streptavidin-HRP	DAKO
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	BioRAD
Triton-X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell

### 2.1.10.2 Puffer, verwendete Stammlösungen

Ammoniumpersulfat (APS):

10% in H<sub>2</sub>O

Block-Puffer (Western Blot):

4% Milchpulver in PBS

10x CAPS-Puffer:

22,13g CAPS  
ad 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, pH11, anschließend autoklavieren

1x CAPS-Puffer:

100 ml 10x CAPS-Puffer  
100 ml Methanol  
ad 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

Coomassiefärbelösung:

2 g Coomassie (Brilliant Blue R250)  
500 ml Ethanol (95%)  
100 ml Essigsäure  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

10x Lauffuffer für SDS-Gelelektrophorese:

250 mM Tris  
2,5 M Glycin  
1 % SDS

5x Ladepuffer für SDS-Gelelektrophorese:

50 mM Tris  
2 % SDS  
5 % Glycerin  
10 % DTT  
einige Tropfen Bromphenolblau

PBS-Tween:

PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20

5%iges Sammelgel:

1,25 ml 4x Sammelgelpuffer  
0,8 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid  
3,0 ml dH<sub>2</sub>O  
50 µl 10% APS  
5,0 µl TEMED

4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-Base, pH 6.8  
0,4 % SDS

## 10%iges Trenngel:

2,5	ml	4x Trenngelpuffer
3,5	ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid
4,0	ml	dH <sub>2</sub> O
100	µl	10% APS
12,5	µl	TEMED

## 4x Trenngelpuffer:

1,5	M	Tris-Base, pH 8.8
0,4	%	SDS

**2.1.11 Material für zellbiologische Arbeiten****2.1.11.1 Reagenzien**

CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetat)	Molecular Probes
Cohn-II (γ-Globuline)	Sigma
Cytofix, Cytoperm	BD Pharmingen
Cytometric Bead Array	BD Pharmingen
Dapi	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Amersham Pharmica
Dynabeads	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma
FuGene™ 6 Transfection Reagent	Roche
Gentamycin	PAA
Goldpartikel	BioRad
<sup>3</sup> H-Thymidin (5 mCi/ml)	Amersham Pharmica
HiTrap Protein G Säulen	GE Healthcare
IMDM	PAA
L-Glutamin	PAA
LPS	Pharmingen
MACS	Miltenyi Biotec
Neuraminidase	Roche
Peptid OVA <sub>257-264</sub>	MWG-Biotech
Peptid OVA <sub>323-339</sub>	MWG-Biotech
Phalloidion-Alexa488	Molecular Probes
Rattenserum	DAKO
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	PAA
Szintillationsflüssigkeit	Roth
Trypanblau	Sigma

**2.1.11.2 Kulturmedien, Puffer, verwendete Stammlösungen**

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das fötale Kälberserum (FCS) vor Gebrauch 45 Minuten lang auf 56°C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

## CMFDA-Stammlösung:

10 mM in DMSO

## Coating-Puffer (ELISA):

Zu 70 ml Puffer A (10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) wurde Puffer B (20 mM NaHCO<sub>3</sub>) zugegeben, bis ein pH-Wert von 9.6 erreicht war

## Cohn-II-Stammlösung:

10 mg/ml in PBS

## Dapi-Stammlösung:

640 ng/ml in Methanol

## Einfriermedium (RPMI):

50	%	FCS
40	%	RPMI mit 10% FCS
10	%	DMSO

## Erythrozyten-Lyse-Puffer:

10	%	0,1 M Tris-HCl (pH 7.5)
90	%	0,16 M Ammoniumchlorid

## FACS-Puffer:

1	%	FCS
0,1	%	NaN <sub>3</sub> in PBS

## Farbsubstratlösung (ELISA):

200	µl	TMB-Stammlösung
1,2	µl	Wasserstoffperoxid
12	ml	Substratpuffer

## 10x PBS (Phosphate Buffered Saline):

80	g	NaCl
2	g	KCl
14,4	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,4	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1 l dH <sub>2</sub> O		
pH 7.4		

## 8% Paraformaldehyd:

8% in H<sub>2</sub>O, pH 8

## RPMI 10% FCS (Vollmedium):

500	ml	RPMI 1640
50	ml	FCS
5	ml	Glutamin (200 mM)

## Stopp-Puffer (ELISA):

2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## Substratpuffer ELISA:

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.5

TMB-Stammlösung:

30 mg Tetramethylbenzidin  
5 ml Dimethylsulfoxid

Trypanblau-Lösung:

2 mg in 100 ml PBS

Waschpuffer (ELISA):

0,05% Tween 20 in PBS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In vivo*-Infektion

#### 2.2.1.1 Infektion von Mäusen mit *Trypanosoma cruzi*

Der *T. cruzi* Stamm Tulahuen wurde alle 10 bis 14 Tage in männlichen Balb/c Mäusen *in vivo* passagiert. Hierzu wurden infizierte Mäuse mit Isofluran (Baxter) narkotisiert und durch Herzpunktion Blut entnommen. Die Parasiten wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und mit sterilem PBS auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$ /ml eingestellt. 200  $\mu$ l der Trypanosomen-Lösung ( $1 \times 10^5$  *T. cruzi*) wurden in nicht-infizierte Balb/c-Mäuse intraperitoneal (i.p.) inokuliert.

Für die Untersuchung des Parasitämieverlaufs wurden 6 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse mit  $1 \times 10^4$  Parasiten des Tulahuen-Stammes oder des Tehuantepec-Stammes i.p. injiziert.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämien wurden ab dem siebten Tag nach der Infektion alle drei bis vier Tage bestimmt. Hierbei wurde Blut aus der angeschnittenen Schwanzspitze der Maus gewonnen und 1:10 mit Erythrozyten-Lyse-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Parasiten in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung wurde die Absorption bei 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) am Spektralphotometer gemessen. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA oder RNA. Zur Bestimmung der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ) ermittelt. Das Verhältnis  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  liegt für reine DNA-Präparationen bei 1,8 und für reine RNA-Präparationen bei 2,0.

### 2.2.2.2 RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte nach der Acid-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform (AGPC)-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Bei dieser Methode finden Zellyse, Denaturierung und Phenol-Chloroform-Extraktion in einem Schritt statt. Die RNA-Isolation wurde mit der gebrauchsfertigen AGPC-Lösung TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.2.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die reverse Transkription ist eine Methode, mit der aus einer RNA eine komplementäre DNA (copy-DNA, cDNA) hergestellt werden kann. Hierzu wird das Enzym reverse Transkriptase verwendet.

Es wurde 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit 4  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer-Lösung versetzt und mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 11  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 70°C wurde dem Ansatz 4  $\mu\text{l}$  5x Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Gemisch (10 mM), 2  $\mu\text{l}$  DTT-Lösung (100 mM) und 1  $\mu\text{l}$  Powerscript<sup>™</sup> hinzugefügt. Der Ansatz wurde 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine Methode dar, mit der DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert werden können (Saiki et al., 1988). Neben der zu amplifizierenden DNA-Sequenz werden für die PCR geeignete Primer sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Die Primer flankieren dabei die Zielsequenz. Die thermostabile DNA-

Polymerase (Taq-Polymerase) wird aus thermophilen Bakterien der Art *Thermus aquaticus* gewonnen.

Die PCR beginnt mit dem Aufschmelzen des doppelsträngigen DNA-Moleküls bei 95°C. Anschließend wird die Lösung abgekühlt, so dass sich die Primer spezifisch an ihre Zielsequenzen anlagern können („Annealing“). Die Annealing-Temperatur ist von der Länge der Primer sowie von ihrem GC-Gehalt abhängig. Im Normalfall liegt sie zwischen 55 und 65 °C. Ausgehend von den Primern synthetisiert die Taq-Polymerase anschließend komplementäre Stränge an den DNA-Matrizen. Diese Elongation erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese wird viele Male wiederholt, so dass letztendlich der DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt wird. Ein programmierbares Heizsystem, ein so genannter Thermocycler, ermöglicht den automatischen Ablauf der PCR-Zyklen.

Die Reaktionsansätze wurden entsprechend den Herstellerangaben für die Taq-Polymerase angesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden autoklavierte Reaktionsgefäße (Eppendorf, 0,5 ml) sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Reaktionsmischungen folgendermaßen angesetzt:

DNA-Template	50-100 ng
Primer I (10 µM)	2,5 µl
Primer II (10 µM)	2,5 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (µM)	2,5 µl
dNTP-Mischung (2 mM)	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase, 1U/µl	1 µl
autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Das jeweils verwendete PCR-Programm variierte in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sowie der Länge und des GC-Gehaltes der verwendeten Primer.

#### 2.2.2.5 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an definierten Stellen schneiden. Jedes Enzym erkennt dabei eine spezifische, meist palindromische DNA-Sequenz und spaltet an dieser Erkennungsstelle oder in enger Nachbarschaft die DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Restriktionen bei 37°C in den mitgelieferten Puffern für mindestens drei Stunden durchgeführt. Dabei wurde 1 Unit des Enzyms pro 10 µl Endvolumen eingesetzt.

### 2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können in Abhängigkeit von ihrer Größe in einem Agarose-Gel durch ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Kleine Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel als große Fragmente. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente enthalten die Gele zwischen 0,3% Agarose (für DNA-Fragmente bis 30 kb) und 2% Agarose (für DNA-Fragmente bis 100 bp).

Für analytische Zwecke wurden TBE-Gele verwendet, da sie präziser auftrennen und höheren Spannungen standhalten. Für präparative Zwecke wurden TAE-Gele eingesetzt, da aus ihnen DNA leichter isoliert werden konnte. Die DNA-Proben wurden mit 6x-Ladungspuffer versetzt, der das Auftragen erleichterte und die Möglichkeit bot, die Proben während der Elektrophorese zu verfolgen. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker auf das Gel aufgetragen (100 bp plus oder 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen)). Die Anfärbung der DNA im Gel erfolgte durch Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2 µg/ml. Der Farbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA. Hierdurch wird die DNA im UV-Durchlicht mit Rotfilter sichtbar.

### 2.2.2.7 Gelreinigung von DNA-Fragmenten

Zur präparativen Gewinnung von DNA wurde diese mittels eines TAE-Gels aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin-Extrakt-Kits (Macherey&Nagel) nach Herstellerangaben aus der Agarose extrahiert.

### 2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle über eine Phosphodiesterbindung nennt man Ligation. Die Enzyme, die unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung katalysieren, werden Ligasen genannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ligase T4 aus dem gleichnamigen Bakteriophagen verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:7 eingesetzt. Außerdem wurden pro Reaktionsansatz 1 Unit der T4-Ligase, sowie der entsprechende Puffer verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad.

### 2.2.2.9 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien des *E.coli* Stammes DH5αF' wurden in 500 ml LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{550nm} = 0,45$  herangezogen. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert

(15 Minuten, 2500 rpm, 4°C, Biofuge 2.0R). Das Pellet wurde in TSB-Puffer aufgenommen und in 200 µl Aliquots bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

#### **2.2.2.10 Transformation von Bakterien**

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA in Bakterien (Hanahan, 1983). Ein Transformationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

100 µl	kompetente Bakterien
20 µl	5x KCM-Puffer
50-100 ng	DNA
	ad 200 µl mit ddH <sub>2</sub> O

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit den übrigen Komponenten des Transformationsansatzes gemischt. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.2.11 PCR-Screen zur Verifizierung positiver Klone**

Mithilfe eines PCR-Screenings lässt sich eine große Anzahl der bei einer Transformation entstandenen Bakterienklone auf die Anwesenheit des gewünschten Inserts hin untersuchen. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Bakterienkolonien auf eine LB-Platte übertragen, die später zum Animpfen von Flüssigkulturen diente. Der an der Pipettenspitze befindliche Rest wurde in 50 µl Wasser für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Hierbei wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien freigesetzt. Anschließend wurden 2 µl dieser Lösung in einer PCR eingesetzt. Die dabei verwendeten M13-Primer banden in den Vektorsequenzen beiderseits des Inserts. Die Größe der Amplifikate wurde anschließend in einem TBE-Gel kontrolliert.

#### **2.2.2.12 Plasmidpräparation aus Bakterien**

Bei der Plasmidpräparation werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Anschließend werden die genomische DNA, Proteine und Membranreste durch eine neutralisierende Salzlösung ausgefällt. Abhängig von der gewünschten Menge und Reinheit der Plasmid-DNA können unterschiedliche Präparationsarten eingesetzt werden.

Minipräparationen wurden mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit (Macherey&Nagel), Maxipräparationen mit dem EndotoxFree-Plasmid-Kit (QIAGEN) durchgeführt.

### **2.2.2.13 Cryokonservierung von Bakterien**

Bakterien können in Form von Glycerolstocks dauerhaft gelagert werden. Bei Bedarf können aus diesen Stocks direkt neue Flüssigkulturen angeimpft werden.

Für die Anfertigung eines Glycerolstocks wurden 800 µl einer 5 ml Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

### **2.2.2.14 DNA-Fällung**

Bevor die DNA sequenziert werden konnte, musste sie zunächst gefällt werden. Als Präzipitationsmittel wurde Ethanol verwendet. In Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat wurde Ethanol im Verhältnis 2:1 zugesetzt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (30 Minuten, 13000g, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde noch einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen.

### **2.2.2.15 DNA-Sequenzierung**

Um zu untersuchen, ob die klonierten DNA-Fragmente Punktmutationen oder Leserasterverschiebungen aufwiesen, wurden die DNA-Moleküle sequenziert. Die DNA wurde durch Ethanol-Präzipitation isoliert und zur Sequenzierung mit den jeweiligen Primern zu MWG Biotech (Ebersberg) geschickt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass die DNA von beiden Seiten überlappend sequenziert wurde.

## **2.2.3 Biochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mithilfe einer Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine entsprechend ihrer Größe und unabhängig von Struktur und Ladung aufgetrennt werden. Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich im Durchschnitt alle 2,8 Aminosäuren an das Protein an. Hierdurch wird die räumliche Struktur der Proteine aufgehoben. Zusätzlich erhalten die Proteine eine negative Ladung, welche die Eigenladung der Proteine überdeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (Lämmli, 1970). Dabei werden die Proteine erst in einem 5%igen Sammelgel fokussiert und dann in einem 10%igen Trenngel aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit 5x Beladungspuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen.

Für Coomassie-Färbungen wurden je 5 µg Protein und 8 µl des 10-200 kDa-Protein-Markers auf das Gel aufgetragen. Für Western Blots wurde je 0,5 µg Protein und 8 µl des prestained Protein-Markers verwendet. Der Gellauf erfolgte ca. 1 Stunde bei einer Spannung von 125 V.

### **2.2.3.2 Coomassie-Färbung**

Mit der Coomassie-Färbung können Proteine nach der Elektrophorese im Gel sichtbar gemacht werden. Dabei können Proteinmengen von 200-400 ng pro Bande angefärbt werden. Dazu wurde das Gel nach dem Lauf eine Stunde in die Coomassiefärbelösung gelegt und danach so lange in Wasser gelegt, bis der Hintergrund transparent und die blauen Proteinbanden sichtbar waren.

### **2.2.3.3 Trocknung von Polyacrylamidgelen**

Zur Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtete Cellophanfolien gelegt, die dann in einem Rahmen fixiert wurden. Nach 48 Stunden konnte das getrocknete Gel ausgeschnitten und gelagert werden.

### **2.2.3.4 Western Blot**

Bei einem Western Blot werden Proteine eines SDS-Gels auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend können die Proteine mit spezifischen Markern nachgewiesen werden.

Der Blotvorgang wurde in einer Halbtrockenzelle durchgeführt. Auf die Kathodenplatte wurden drei Lagen in CAPS-Puffer getränktes Filterpapier und darauf wiederum die mit CAPS-Puffer befeuchtete Membran gelegt. Auf die Membran wurde luftblasenfrei das Gel gebettet. Auf das Gel wurden daraufhin drei Lagen in CAPS-Puffer getränktes Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte bei 1 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche in einer Stunde bei unbegrenzter Spannung.

Nach dem Proteintransfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in Blockpuffer abgesättigt. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung direkt in den Blockpuffer pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal zehn Minuten mit PBS/Tween gewaschen und anschließend mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper, in Blockpuffer verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut dreimal zehn Minuten mit PBS/Tween gewaschen.

Die Detektion erfolgte mithilfe des ECL-Systems, welches auf Chemilumineszenz basiert. Dabei wurde die Membran für eine Minute in einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Reagenzien geschwenkt und dann in eine Filmkassette gelegt. Im Dunkeln wurde ein ECL-Film aufgelegt. Nach einer Expositionszeit von 2 Minuten wurde der Film automatisch entwickelt.

#### **2.2.3.5 Konzentrieren von Proteinlösungen**

Zum Konzentrieren von Proteinlösungen wurde das Kit Vivaspin 6 ml Concentrator (Vivascience AG) verwendet.

### **2.2.4 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.4.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation**

Eukaryotische Zellen wurden in CO<sub>2</sub>-Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter der Sterilbank ausgeführt. Dabei verwendete Glasgeräte wurden 3 Stunden bei 180°C sterilisiert. Lösungen wurden 20 Minuten bei 135°C und 2,2 bar autoklaviert.

Die Zentrifugation eukaryotischer Zellen erfolgte für 5 Minuten bei 4°C und 1200 rpm in der Megafuge 2.0R.

#### **2.2.4.2 Zellzählung**

Die Anzahl lebender Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:1 mit der Trypanblau-Lösung versetzt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der Farbstoff färbt nur die toten Zellen blau an, so dass zwischen toten und lebenden Zellen eindeutig unterschieden werden konnte.

#### **2.2.4.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Eukaryotische Zellen können unter Zusatz von DMSO, welches die Bildung von Eiskristallen verhindert, lange Zeit in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden.

Zum Einfrieren wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pelletiert, in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Cryoröhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen für 24

Stunden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen der Zellen ist es wichtig, dass das toxische DMSO schnell quantitativ aus der Kultur entfernt wird. Dazu werden die Zellen sofort nach dem Auftauen dreimal mit 10 ml Vollmedium gewaschen, bevor sie in Kultur genommen werden.

#### **2.2.4.4 Kultur von Zelllinien**

Alle verwendeten Zelllinien wurden mit Vollmedium in 6-well-Gewebekulturplatten kultiviert. Sie wurden zwei Mal in der Woche 1:5 verdünnt.

#### **2.2.4.5 *In vitro* Kultur von Trypanosomen**

Für die *in vitro* Kultur von Trypanosomen wurden L929 Zellen, die in 50 ml Gewebekulturflaschen zu einem einschichtigen Zellrasen gewachsen waren, mit Bluttrypanosomen infiziert. Die Parasiten vermehren sich intrazellulär. Nach 5 Tagen platzen die L929-Zellen und setzen trypomastigote Parasiten in den Überstand frei. Diese wurden wiederum auf nicht infizierte L929 Zellen übertragen.

#### **2.2.4.6 Neuraminidase-Behandlung, Laktose-Behandlung und CMFDA-Färbung**

Für die Neuraminidase-Behandlung wurden Trypanosomen oder Erythrozyten zweimal mit RPMI gewaschen, in 200  $\mu\text{l}$  RPMI resuspendiert und mit 2  $\mu\text{l}$  Neuraminidase 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Trypanosomen, bzw. die Erythrozyten dreimal mit RPMI gewaschen und direkt für Experimente verwendet.

Für die Laktose-Behandlung wurden die Trypanosomen dreimal mit 5 ml 10 mmol Laktose in PBS gewaschen. Alle darauf folgenden Experimente wurden in Gegenwart von 10 mmol Laktose durchgeführt.

Bei der CMFDA-Färbung wurden die Trypanosomen mit 20  $\mu\text{mol}$  CMFDA in 1 ml Vollmedium für 10 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden sie zweimal mit 10 ml Vollmedium gewaschen, in Vollmedium resuspendiert und direkt für Experimente verwendet.

#### **2.2.4.7 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen durch Elektroporation**

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Wird dabei die DNA in das Genom integriert und bei Zellteilungen weitergegeben, so spricht man von stabiler Transfektion. Die Elektroporation ist eine Methode der Transfektion, bei der die

Zellmembran durch einen elektrischen Puls hoher Feldstärke durchlässig gemacht wird, so dass die DNA in das Zellinnere gelangt.

Im Rahmen der Arbeit wurden CHO-Zellen durch Elektroporation stabil transfiziert. Der verwendete Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) wurde vor der Transfektion linearisiert. Die Linearisierung verhindert, dass der Vektor in einer Weise in das Genom integriert wird, bei der das Insert oder andere für die Expression wichtige Elemente zerstört werden. Der Vektor wurde mit dem Enzym *PvuI* geschnitten, dessen Schnittstelle innerhalb des Ampicillin-Genes liegt. Das Ampicillin-Gen ist nur für die Vermehrung in Bakterien wichtig und wird für die Expression in eukaryotischen Zellen nicht mehr benötigt.

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350  $\mu$ l PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette überführt. 10  $\mu$ g linearisierte Plasmid-DNA wurden zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Gabe eines elektrischen Pulses von 230 V bei 960  $\mu$ F wurden die Zellen sofort in 450  $\mu$ l Vollmedium verdünnt und nach 10 Minuten Inkubation weitere 40 ml Vollmedium zugesetzt. Die Zellen wurden in 6-well-Gewebekulturplatten verteilt und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde zur Selektion stabil transfizierter Zellen Vollmedium mit 1 mg/ml G418 zu den Zellen gegeben. Die unter diesen Bedingungen herangewachsenen Zellen wurden subkloniert. Dazu wurden die Zellen in 96-well-Gewebekulturplatten überführt, so dass sich im Schnitt in jedem dritten well eine Zelle befindet. Die Subklone wurden mittels FACS auf die Expression des gewünschten Proteins untersucht.

#### **2.2.4.8 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene**

CHO-Zellen wurden in einer 6 well-Gewebekulturplatte kultiviert bis sie ca. 80% konfluent waren. Das Medium wurde durch 2 ml frisches Vollmedium ersetzt. In einem autoklavierten 1,5 ml- Reaktionsgefäß wurden 100  $\mu$ l Medium, 6  $\mu$ l FuGene-Reagenz und 5  $\mu$ g DNA vorsichtig gemischt und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix zu den Zellen zugetropft (100 $\mu$ l/well). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

#### **2.2.4.9 Aufreinigung von Fusionsmolekülen**

CHO-Zellen, welche das gewünschte Fusionsmolekül Siglec-E-Fc sezernierten, wurden in CELLline Bioreaktoren (Integra Biosciences) nach Herstellerangaben kultiviert. Hierzu wurde RPMI-Vollmedium verwendet, welches 10% IgG-depletiertes FCS enthielt. Das in den Überstand sezernierte Fusionsmolekül wurde mit HiTrap Protein G Säulen (*GE Healthcare*)

aufgereinigt. Eine mögliche LPS Kontamination wurde mit dem Limulus Assay untersucht und lag unter 2 EU/ml.

#### **2.2.4.10 Generierung eines Kaninchen anti-Siglec-E Immunerums**

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum hergestellt. Hierzu wurde ein DNA-Konstrukt kloniert, das für die drei extrazellulären Domänen von Siglec-E codiert. Dieses Konstrukt wurde in einen pCMV-SPORT6-Vektor ligiert und mit einem DNA-Fragment fusioniert, welches für einen GPI-Anker codiert. Mit diesem Vektor wurden 1 µm Goldpartikel (BioRad) beschichtet. Die DNA-beschichteten Goldpartikel (1µg DNA/mg Gold) wurden ballistisch mit einer Helios gene gun (BioRad) und einem Druck von 400 psi in die abdominale Haut eines Kaninchens injiziert. Die DNA-Vakzinierung wurde dreimal alle 3-5 Wochen wiederholt. Das Immuneserum wurde durchflusszytometrisch an Siglec-E transfizierten CHO-Zellen getestet. Hierbei ergab sich, dass das Serum in einer Konzentration von 1:2000 im FACS einsetzbar ist. IgG Antikörper wurden aus dem Prä-Immuneserum und dem anti-Siglec-E Immuneserum mit HiTrap Protein G Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt.

#### **2.2.4.11 Generierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen aus dem Knochenmark**

Zur Generierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen aus dem Knochenmark wurden die Ober- und Unterschenkelknochen einer Maus steril entnommen. Sie wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend getrocknet. Die Enden der Knochen wurden mit einer sterilen Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit einer Spritze mit Vollmedium herausgespült. Die Knochenmarkszellen wurden gut resuspendiert und abzentrifugiert. Zur Generierung von Dendritischen Zellen wurden die Knochenmarkszellen in Vollmedium mit 10% GM-CSF aufgenommen ( $2 \times 10^5$ /ml) und jeweils 10 ml in beschichtete Petrischalen überführt. Die Schalen wurden im Brutschrank mit 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Am Tag 3 und 6 wurden die Zellen mit jeweils 10 ml Vollmedium / 10% GM-CSF gefüttert und am Tag 7 für Experimente verwendet. Zur Generierung von Makrophagen wurden die Zellen in IMDM-Medium mit 10% FCS, 30% L929-Überstand und 5% Pferdeserum aufgenommen ( $2 \times 10^5$ /ml) und jeweils 10 ml in unbeschichtete Petrischalen überführt. Die Schalen wurden im Brutschrank mit 7%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert und alle 2 bis 3 Tage mit jeweils 10 ml IMDM-Medium mit 10% FCS, 30% L929-Überstand und 5% Pferdeserum gefüttert. Am Tag 12 wurden die Zellen für Experimente verwendet.

### 2.2.4.12 Durchflusszytometrie

Mithilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS) können Zellen charakterisiert werden. Hierbei fließen die Zellen einzeln an einem Fotodetektor vorbei. Mit ihm werden die Zellgröße, die Granuladichte und die Fluoreszenz von gebundenen fluoreszierenden Antikörpern gemessen.

**2.2.4.12.1 Charakterisierung von Zellen:**  $2 \times 10^5$  Zellen wurden pelletiert und mit 25  $\mu$ l Cohn II und dem Primär-Antikörper (Endkonzentration 5  $\mu$ g/ml) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem Sekundär-Antikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 200  $\mu$ l 2% Paraformaldehyd (PFA) / PBS aufgenommen und analysiert.

**2.2.4.12.2 Intrazelluläre FACS-Färbung:** Die intrazelluläre FACS-Färbung wurde mit Cytotfix und Cytoperm (BD Pharmingen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

**2.2.4.12.3 Färbung von Trypanosomen:**  $2 \times 10^5$  Trypanosomen wurden pelletiert und mit dem Fusionsprotein (2 $\mu$ g / Färbung) oder dem Biotin-markiertem Lektin (2 $\mu$ g / Färbung) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Trypanosomen mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 200  $\mu$ l 2% PFA aufgenommen und analysiert.

**2.2.4.12.4 Bindung von Siglec-E-Fc an Erythrozyten:** Für den Bindungstest mit nicht-vorkomplexiertem Siglec-E-Fc wurden humane Erythrozyten in 100  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 2  $\mu$ g Siglec-E-Fc für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und mit einem PE-konjugierten anti-Human Antikörper für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 200  $\mu$ l 2% PFA aufgenommen und analysiert. Für die Färbung mit vorkomplexiertem Siglec-E-Fc wurde der PE-konjugierte anti-Human Antikörper 1:5 mit FACS-Puffer verdünnt. 5  $\mu$ l dieser Verdünnung wurde mit 2  $\mu$ g Siglec-E-Fc in einem Volumen von 10  $\mu$ l für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Unbehandelte oder Neuraminidase-behandelte Erythrozyten wurden in 90  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ l des vorkomplexierten Siglec-E-Fc / anti-Human Antikörper für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Erythrozyten gewaschen, mit 2% PFA fixiert und analysiert.

**2.2.4.12.5 FACS von Dynabeads:**  $2 \times 10^5$  Dynabeads wurden pelletiert und mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper, bzw. dem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül (2 µg) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mit FACS-Puffer gewaschen. Die mit Siglec-E-Fc gefärbten Dynabeads wurden mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Dynabeads in 200 µl PBS aufgenommen und analysiert.

#### **2.2.4.13 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine Methode, mit der sich Moleküle in Zellen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern mikroskopisch nachweisen lassen. Zusätzlich können Zellkerne mit dem Farbstoff Dapi, der sich spezifisch an DNA bindet, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

**2.2.4.13.1 Bindung von Siglec-E-Fc an extrazelluläre *T. cruzi*:**  $2 \times 10^5$  Trypanosomen wurden pelletiert und mit Siglec-E-Fc (2µg / Färbung) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Trypanosomen mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit 200 µl 2% PFA fixiert. Im Anschluss daran wurden die Trypanosomen mit PBS gewaschen und Cytospins angefertigt. Hierzu wurden die Trypanosomen auf Objektträger zentrifugiert (600 rpm, 8 Minuten). Die Trypanosomen wurden mit einem Tropfen Permafluor-Lösung und einem Deckgläschen bedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

**2.2.4.13.2 Bindung von Siglec-E-Fc an intrazelluläre *T. cruzi*:** Knochenmark-generierte Makrophagen wurden auf Chamber-Slides ( $5 \times 10^4$ /well) über Nacht kultiviert. Anschließend wurden sie mit pathogenen Parasiten des Stammes Tulahuen und mit nicht-pathogenen Parasiten des Stammes Tehuantepec infiziert ( $1 \times 10^5$ /well). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen mit 2% PFA fixiert, mit 0,1% TritonX-100/PBS permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Nach Blockade der Fc-Rezeptoren auf Makrophagen mit Rattenserum, wurden die Zellen mit Siglec-E-Fc (2µg/well) für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper, Dapi und Alexa488-markiertem Phalloidin für 30 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Permafluor-Lösung und einem Deckgläschen bedeckt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### **2.2.4.13.3 Akkumulation von Siglec-E zwischen CHO-Siglec-E-Zellen und *T. cruzi*:**

Unbehandelte und Neuraminidase-behandelte Trypanosomen wurden mit 2% PFA über Nacht fixiert und anschließend dreimal mit PBS / 1% FCS gewaschen. CHO-Siglec-E-Zellen wurden auf Chamber-Slides ( $5 \times 10^4$ /well) für 3 Stunden kultiviert. Die fixierten Trypanosomen wurden zu den CHO-Siglec-E-Zellen hinzugegeben ( $1 \times 10^5$ /well) und 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einem Alexa594-markierten anti-Ratte Antikörper und mit Dapi für 30 Minuten gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Permafluor-Lösung und einem Deckgläschen bedeckt und im Fluoreszenzmikroskop mit dem Volume-Deconvolution Modul der Openlab Software (Improvision, Coventry, UK) analysiert.

#### **2.2.4.14 Hämagglutininintest zur Bestimmung der *Trans*-Sialidase-Aktivität**

$5 \times 10^6$  *T. cruzi* Tulahuen- oder Tehuantepec-Parasiten wurden pelletiert und in 50  $\mu$ l 10 mmol Laktose / PBS resuspendiert. Zu den Trypanosomen wurden 10  $\mu$ l pelletierte humane Erythrozyten zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 500  $\mu$ l 0,9 % NaCl verdünnt. 50  $\mu$ l dieser Verdünnung wurden mit 2  $\mu$ g PNA-Lektin für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle wurden Erythrozyten mit dem Lektin behandelt, die vorher nicht mit *T. cruzi* inkubiert wurden.

#### **2.2.4.15 Erythrozyten-Bindung an CHO-Siglec-E-Zellen**

$1 \times 10^6$  CHO-Mock-Zellen oder CHO-Siglec-E-Zellen wurden mit  $2 \times 10^7$  unbehandelten oder Neuraminidase-behandelten Erythrozyten für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit 2% PFA fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Cytospins angefertigt. Hierzu wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert (600 rpm, 8 Minuten). Die Erythrozyten-Bindung wurde am Mikroskop analysiert. Es wurden jeweils 200 Zellen gezählt und die Anzahl an Zellen bestimmt, die mindestens zwei Erythrozyten gebunden haben.

#### **2.2.4.16 Präparation einer Milz und Isolierung von T-Zellen**

Die Milzen von C57BL/6 oder OT-1 Mäusen wurden unter der Sterilbank entnommen. Anschließend wurden die Milzen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer gespült. Hierdurch wurden die Milzzellen isoliert und gleichzeitig die Erythrozyten durch hypotone Lyse entfernt. Die

isolierten Milzzellen wurden einmal mit 10 ml Vollmedium gewaschen, danach in Vollmedium aufgenommen, gezählt und direkt für weitere Versuche verwendet.

Zur Isolation von T-Zellen aus der Milz wurde das MACS Pan T cell Kit von Miltenyi Biotec entsprechend der Hersteller-Angaben verwendet.

#### **2.2.4.17 Einfluss von *T. cruzi* auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen**

Trypanosomen wurden hitzeinaktiviert indem sie 40 Minuten auf 56°C erhitzt wurden. Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden in 96-well-Gewebekulturplatten kultiviert ( $5 \times 10^4$ /well), mit hitzeinaktivierten Trypanosomen inkubiert ( $2,5 \times 10^5$ /well) und mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert (1ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IL-12p40-Produktion durch ELISA und auf IL-12p70, IL-6, TNF, MCP-1 und IL-10 – Produktion mit dem Cytometric Bead Array (BD Pharmingen) untersucht.

#### **2.2.4.18 Stimulationstest von Dendritischen Zellen mit Dynabeads**

Analyse der Cytokinproduktion: Dynabeads (Invitrogen) wurden mit anti-Siglec-E IgG Antikörpern (aufgereinigt aus dem anti-Siglec-E Immuneserum) und mit Kaninchen IgG Antikörpern (aufgereinigt aus dem Prä-Immuneserum) entsprechend der Herstellerangaben beschichtet. Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden in 96-well-Gewebekulturplatten kultiviert ( $5 \times 10^4$ /well), mit Dynabeads inkubiert ( $2,5 \times 10^5$ /well) und mit LPS stimuliert (1ng/ml). Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IL-12p40-Produktion durch ELISA und auf IL-12p70, IL-6, TNF, MCP-1 und IL-10-Produktion mit dem Cytometric Bead Array (BD Pharmingen) untersucht.

Analyse der T-Zell-Aktivierung: Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden in 96-well-Gewebekulturplatten kultiviert ( $5 \times 10^4$ /well) und mit Dynabeads ( $2,5 \times 10^5$ /well) für 3 Stunden inkubiert. T-Zellen einer OT-1 T-Zell-Rezeptor-transgenen Maus ( $2 \times 10^5$ /well) und das spezifische Peptid SIINFEKL (0,01µg/ml) wurden hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IL-2- und IFN-γ-Produktion durch ELISA untersucht.

#### **2.2.4.19 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test mit der Graph Pad Prism Software (Graph Pad Prism Software, San Diego, CA) verwendet. Signifikanzen wurden ab  $p \leq 0,05$  mit einem \* und ab 0,005 mit \*\* versehen. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in der Legende der jeweiligen Abbildung angegeben.

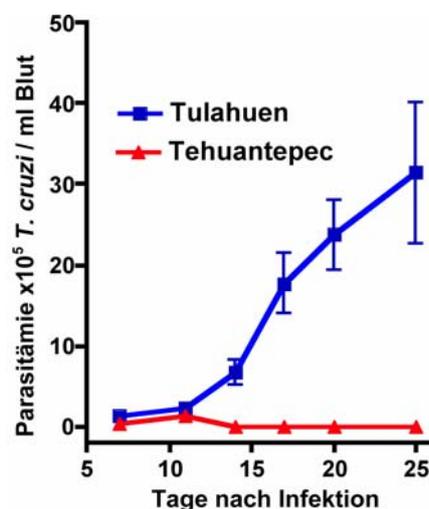
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec

In dieser Arbeit wurden zwei *T. cruzi* Stämme verwendet: Der *T. cruzi* Stamm Tehuantepec gehört zu dem sylvatischen Infektionszyklus (*T. cruzi* I), während der *T. cruzi* Stamm Tulahuen dem domestischen Infektionszyklus angehört (*T. cruzi* II).

Es wurde bereits beschrieben, dass nur *T. cruzi* II Stämme in Säugetieren hoch infektiös sind (Buscaglia und Di Noia, 2003; Manoel-Caetano und Silva, 2007). Diese Stämme erreichen in Säugern hohe Parasitämien, können persistieren und verursachen die schweren Symptome der Chagas-Krankheit. *T. cruzi* I Stämme hingegen verursachen in Säugetier-Wirten keine hohe Parasitämie und können nicht persistieren.

Die beiden hier verwendeten *T. cruzi* Stämme wurden in einem Mausmodell der Chagas-Krankheit auf ihre Infektiosität untersucht (Abbildung 3.1). Männliche C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  Parasiten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Parasitämien bestimmt. Abbildung 3.1 zeigt deutlich, dass *T. cruzi* Tulahuen in Mäusen hoch infektiös ist und hohe Parasitämien erreicht. In *T. cruzi* Tehuantepec-infizierten Mäusen hingegen stieg die Parasitämie nicht bedeutend an.



**Abbildung 3.1: Parasitämieverlauf nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *T. cruzi* Tulahuen und Tehuantepec**

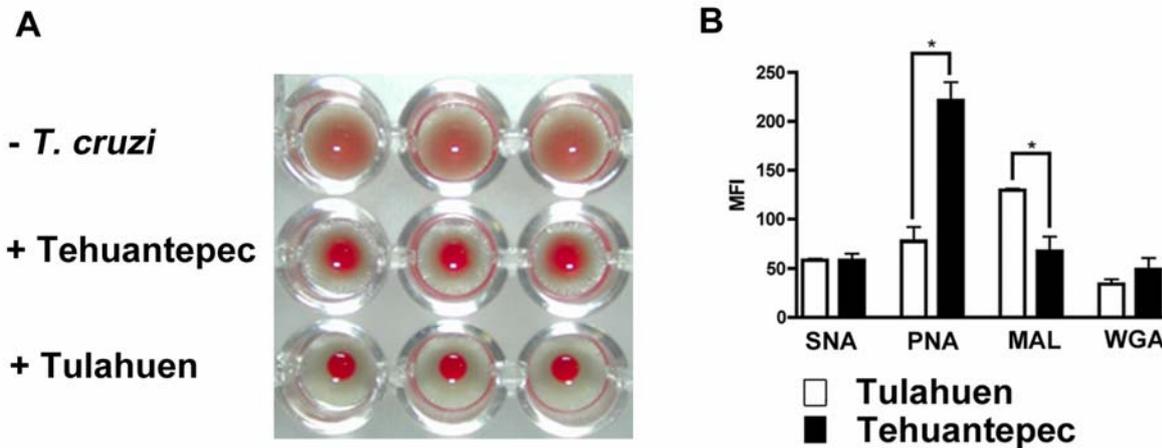
Männliche C57BL/6 Mäuse (5 Tiere pro Gruppe) wurden mit  $1 \times 10^4$  Trypanosomen der Stämme Tulahuen und Tehuantepec intraperitoneal infiziert. Die Parasitämie wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Der Tulahuen-Stamm erreicht sehr hohe Parasitämien in infizierten Mäusen, während der Tehuantepec-Stamm in Mäusen nicht infektiös ist.

Die *Trans*-Sialidase (TS) ist der erste beschriebene Virulenzfaktor, der sich zwischen *T. cruzi* I und *T. cruzi* II Stämmen unterscheidet. *T. cruzi* II Stämme exprimieren höhere Mengen an TS als *T. cruzi* I Stämme. Die TS ist ein einzigartiges Enzym, welches Sialinsäuren von Wirtszellen auf Mucin-artige Moleküle auf der Oberfläche der Parasiten überträgt. Dabei wird spezifisch Sialinsäure in  $\alpha$ 2-3 Verknüpfung übertragen.

Um zu untersuchen, ob sich die beiden *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec in ihrer TS-Aktivität unterscheiden, wurde ein Hämagglutininintest durchgeführt (Abbildung 3.2A). Dabei wurden trypomastigote Formen beider Stämme mit humanen Erythrozyten inkubiert. Durch die TS-Aktivität wird Sialinsäure von den Erythrozyten entfernt. Das Ausmaß an Sialinsäure-Entfernung und damit das Maß an TS-Aktivität kann durch Zusatz des Lektins PNA gemessen werden. Dieses Lektin erkennt freie O-Glykoside und kann somit Erythrozyten, die solche Strukturen aufweisen, agglutinieren. Abbildung 3.2A zeigt, dass Erythrozyten, die mit dem Tulahuen-Stamm inkubiert wurden, eine stärkere Agglutination nach Zusatz von PNA zeigten, als Erythrozyten, die mit dem Tehuantepec-Stamm inkubiert wurden. Somit haben Parasiten des pathogenen Tulahuen-Stammes eine höhere TS-Aktivität als nicht-pathogene Parasiten des Tehuantepec-Stammes.

Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass Parasiten des Tulahuen-Stammes auch höhere Mengen an Sialinsäure auf ihrer Oberfläche tragen als die des Tehuantepec-Stammes. Dies wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse mit Hilfe einer Lektin-Färbung bestätigt (Abbildung 3.2B). Trypomastigote beider Stämme wurden mit folgenden Biotin-markierten Lektinen inkubiert: SNA (*Sambucus nigra* Lektin, erkennt  $\alpha$ 2-6 verbundene Sialinsäure), PNA (Erdnuss-Agglutinin (*peanut agglutinin*) aus *Arachis hypogaea*, erkennt nicht-sialylierte Kohlenhydratstrukturen), MAL II (*Maackia amurensis* Lektin II, erkennt  $\alpha$ 2-3 verbundene Sialinsäure) und WGA (Weizenkeim-Agglutinin (*wheat germ agglutinin*) aus *Triticum vulgare*, erkennt N-Acetylglycosamin). Die Bindung der Lektine an die Trypanosomen wurde mit Hilfe von APC-markiertem Streptavidin analysiert. Abbildung 3.2B zeigt, dass Tulahuen-Parasiten spezifisch durch das Lektin MAL II angefärbt wurden und somit eine höhere Menge an  $\alpha$ 2-3 verknüpften Sialinsäuren auf der Oberfläche tragen. In Übereinstimmung damit wurden Tehuantepec-Parasiten spezifisch von PNA erkannt, was bedeutet, dass sie eine höhere Menge an freien O-Glykosiden auf der Oberfläche aufweisen. Beide Parasiten-Stämme wurden nicht durch WGA erkannt, welches das für epimastigote Formen spezifische N-Acetylglycosamin bindet. Auch SNA wurde von keinem der beiden

Stämme gebunden, was bestätigt, dass Trypanosomen spezifisch  $\alpha$ 2-3 verbundene Sialinsäuren tragen.



**Abbildung 3.2: *T. cruzi* Tulahuen und *T. cruzi* Tehuantepec unterscheiden sich in ihrer *Trans*-Sialidase Aktivität und ihrem Sialinsäuregehalt.**

A: Die *Trans*-Sialidase Aktivität der beiden *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec wurde mit Hilfe eines Hämagglutinationstests bestimmt. Trypomastigote beider Stämme wurden mit humanen Erythrozyten inkubiert. Die *Trans*-Sialidase entfernt Sialinsäuren von der Oberfläche der Erythrozyten, was zu einer Agglutination der Erythrozyten nach Zugabe des Lektins PNA führt. Erythrozyten, die mit den pathogenen Parasiten des Tulahuen-Stammes inkubiert wurden, zeigten eine größere Agglutination als Erythrozyten, die mit dem nicht-pathogenen Parasiten des Tehuantepec-Stammes inkubiert wurden. B: Der Sialinsäuregehalt der *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec wurde durchflusszytometrisch durch Bindung von Lektinen bestimmt. Trypomastigote beider Stämme wurden mit folgenden Biotin-markierten Lektinen gefärbt: SNA (erkennt  $\alpha$ 2-6 verbundene Sialinsäure), PNA (erkennt nicht-sialylierte Kohlenhydratstrukturen), MAL II (erkennt  $\alpha$ 2-3 verbundene Sialinsäure) und WGA (erkennt N-Acetylglucosamin). Die Bindung wurde mit Hilfe von APC-markierten Streptavidin detektiert. Der nicht-pathogene *T. cruzi* Stamm Tehuantepec trägt mehr nicht-sialylierte Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche, wohingegen der *T. cruzi* Stamm Tulahuen mehr  $\alpha$ 2-3 verbundene Sialinsäure auf der Oberfläche aufweist. Die hier gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuche.

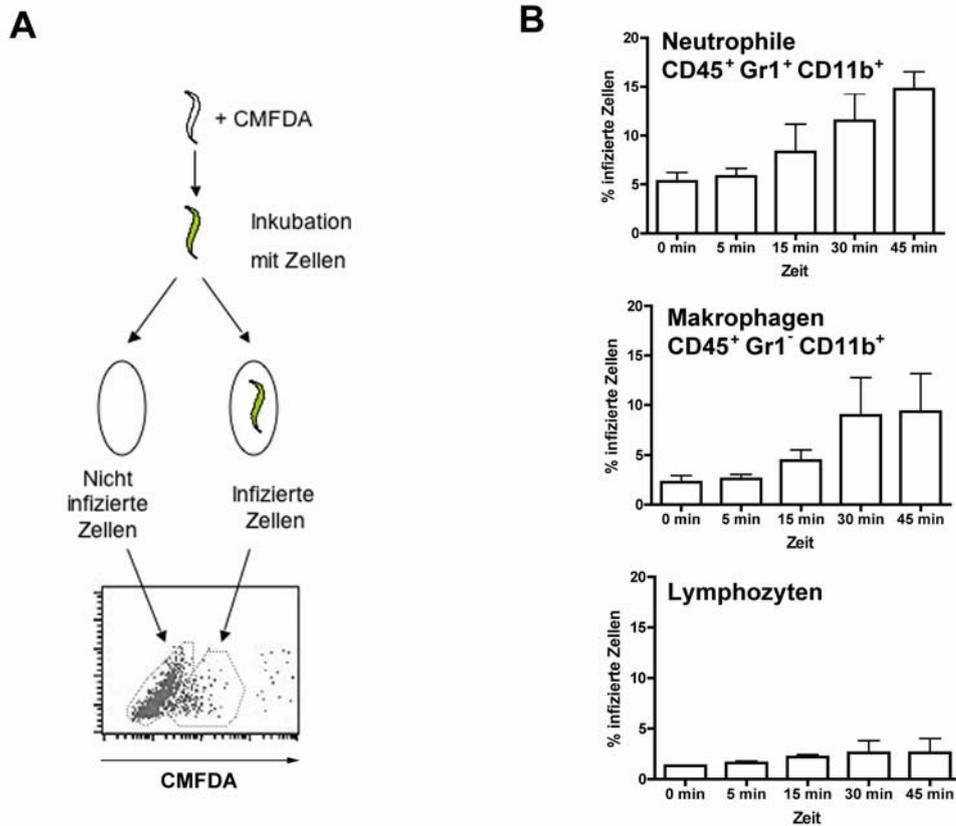
Der *T. cruzi* II Stamm Tulahuen hat eine höhere TS-Aktivität als der *T. cruzi* I Stamm Tehuantepec und trägt höhere Mengen an Sialinsäuren auf der Oberfläche. In Übereinstimmung mit der Literatur korreliert auch bei den beiden verwendeten Stämmen die TS-Aktivität mit ihrer Pathogenität: In einem Maus-Modell der Chagas-Krankheit ist der *T. cruzi* II Stamm Tulahuen hoch infektiös, während der *T. cruzi* I Stamm Tehuantepec keine hohen Parasitämien verursacht.

### **3.2 Im peripheren Blut werden neutrophile Granulozyten und Makrophagen als erste Zellen von *T. cruzi* infiziert**

Zunächst sollte untersucht werden, welches die ersten Zellen im peripheren Blut sind, die mit Trypanosomen infiziert werden. Für diesen Zweck wurde der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen verwendet.

Zur Bestimmung der Infektionsrate wurde ein *in vitro*-Infektionsmodell etabliert (Abbildung 3.3A): Trypomastigote Formen des Tulahuen-Stammes wurden mit CMFDA gefärbt. Dieser Farbstoff dringt durch passive Diffusion in die Parasiten ein und wird im Cytosol durch ubiquitär vorkommende Esterasen gespalten. Dadurch beginnt der Farbstoff zu fluoreszieren. Nun wurden Zellen *in vitro* mit den fluoreszierenden Parasiten infiziert. Da die Parasiten in die Wirtszellen eindringen, fluoreszieren die infizierten Zellen ebenfalls und können durchflusszytometrisch von den nicht infizierten Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Infektionsraten von peripheren Blutleukozyten, wurde Blut aus einer C57BL/6 Maus durch Herzpunktion gewonnen. Nach der Erythrozyten-Lyse wurden die peripheren Blutleukozyten mit CMFDA-markierten Trypanosomen inkubiert. Die Infektion wurde durch Zugabe von PFA gestoppt und die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden die einzelnen Zellpopulationen durch die folgenden Antikörper identifiziert: CD45-APC, CD11b-PerCP und Gr1-PE. Die Lymphozytenpopulation wurde im FSC und SSC charakterisiert. Wie Abbildung 3.3B zeigt, wurden neutrophile Granulozyten und auch Makrophagen mit Trypanosomen infiziert. Dagegen kam es zu keiner Infektion von Lymphozyten. In einem weiteren Versuch wurden B- und T-Lymphozyten durch die Antikörper B220-PE bzw. CD3-PE charakterisiert und die Infektionsrate dieser Zellen gemessen. Sogar bei einer Inkubation der Zellen mit CMFDA-gefärbten Trypanosomen über Nacht konnte keine Infektion der B- und T-Zellen beobachtet werden.



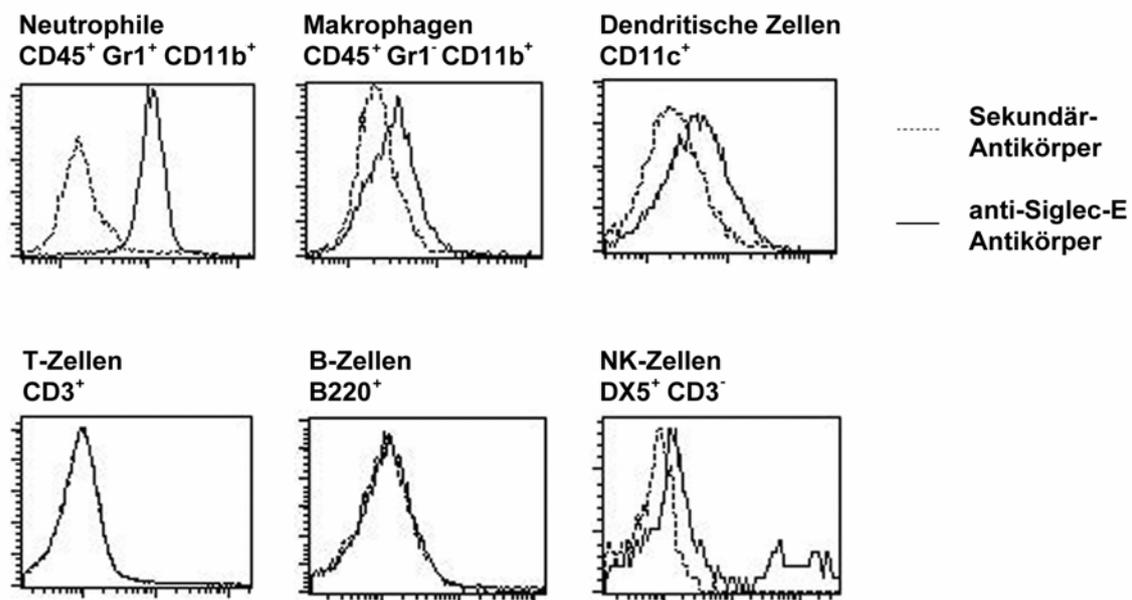
**Abbildung 3.3: Neutrophile und Makrophagen werden als erste Zellen im Blut infiziert**

A: *In vitro*-Infektionsmodell: *T. cruzi* Trypomastigote werden mit dem fluoreszierenden Farbstoff CMFDA gefärbt und mit den Zellen *in vitro* inkubiert. Infizierte Zellen können durchflusszytometrisch gemessen werden. B: Murines Blut wurde nach der Lyse der Erythrozyten mit CMFDA-gefärbten Trypanosomen infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Infektion durch Zusatz von PFA gestoppt und die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellpopulationen wurden durch folgende Antikörper identifiziert: CD45-APC, CD11b-PerCP und Gr1-PE. Neutrophile und Makrophagen werden von Trypanosomen innerhalb der ersten 45 Minuten infiziert, während Lymphozyten nicht infiziert werden. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

### 3.3 Siglec-E wird auf Phagozyten und Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert

In dieser Arbeit soll die Interaktion von Trypanosomen mit Siglecs untersucht werden. Es wurde hier das Molekül Siglec-E gewählt, da dieses auf den Zellen exprimiert wird, die als erste von Trypanosomen infiziert werden (siehe Abschnitt 3.2). Das Expressionsmuster von Siglec-E ist bereits beschrieben worden (Zhang et al., 2004) und wurde hier noch einmal bestätigt. Hierfür wurden periphere Blutleukozyten im FACS analysiert. Das murine Blut wurde nach der Erythrozyten-Lyse mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper und

anschließend mit einem FITC-markierten anti-Ratte Antikörper gefärbt. Die einzelnen Zelltypen wurden mit spezifischen Antikörpern gegengefärbt (Abbildung 3.4). Siglec-E wird stark auf Neutrophilen und in geringeren Mengen auf Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert. Dagegen wird Siglec-E nicht auf T-Zellen oder B-Zellen exprimiert. Interessanterweise gibt es zwei Populationen von NK-Zellen, die Siglec-E in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Eine Population zeigt eine geringe, die zweite Population eine hohe Siglec-E-Expression.



**Abbildung 3.4: Siglec-E wird auf Phagozyten und Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert**

Murines Blut wurde nach der Erythrozyten-Lyse mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper als Primär-Antikörper und mit einem FITC-markierten anti-Ratte Antikörper als Sekundär-Antikörper gefärbt. Zur Bestimmung der Zellpopulationen wurden zusätzlich folgende Antikörper verwendet: CD45-APC, CD11b-PerCP, Gr1-PE, CD3-PE, B220-PE, CD11c-PE und DX5-PE. Die Expression von Siglec-E wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Siglec-E wird stark auf Neutrophilen exprimiert. Auch Makrophagen, Dendritische Zellen und NK-Zellen exprimieren Siglec-E, während Lymphozyten keine Siglec-E-Expression aufweisen.

### **3.4 DNA-Vakzinierung eines Kaninchens zur Herstellung eines anti-Siglec-E Immunerums**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch DNA-Vakzinierung ein Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum generiert. Dies war notwendig, da der kommerziell erhältliche Ratte anti-Siglec-E Antikörper (Biozol) nicht blockierend war, nicht im Western Blot eingesetzt werden konnte und keine fixierten Zellen anfärben konnte. All diese Eigenschaften besaß das Immuneserum und wurde als entscheidendes Werkzeug bei vielen Fragestellungen eingesetzt.

#### **3.4.1 Klonierung und Expressionstest des Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6-Vektors**

Zunächst wurde ein DNA Fragment amplifiziert, welches für die drei extrazellulären Domänen von Siglec-E codiert. Hierfür wurden die Primer Siglec-E-*EcoRI*-sense und Siglec-E-*HindIII*-antisense (Sequenzen siehe Material und Methoden) verwendet. Als Template wurde das Konstrukt Siglec-E-Fc/pcDNA3.1 (siehe Abschnitt 3.5.1) verwendet.

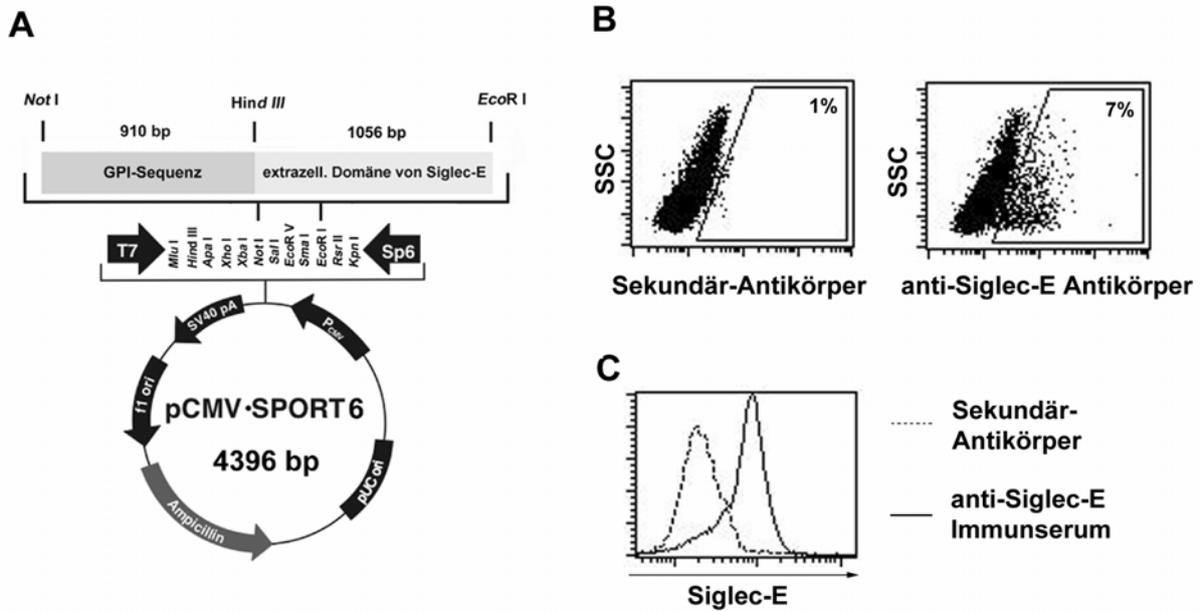
Dieses Amplifikat wurde in den pCMV-SPORT6-Vektor kloniert und an ein DNA-Fragment fusioniert, das für eine GPI-Sequenz codiert, so dass letztendlich das exprimierte Protein als GPI-verankertes Molekül membranständig exprimiert wird. Die Vektorkarte des generierten Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6-Vektors ist in Abbildung 3.5A dargestellt.

Vor der DNA-Vakzinierung sollte überprüft werden, ob der generierte Vektor funktionsfähig ist. Hierzu wurden CHO-Zellen mit dem Vektor transient mittels FuGene transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Oberflächenexpression von Siglec-E im FACS analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Ratte anti-Siglec-E Primärantikörper, gefolgt von einem PE-markierten anti-Ratte Sekundärantikörper gefärbt. Abbildung 3.5B zeigt, dass Siglec-E membranständig auf CHO-Zellen exprimiert und von einem kommerziell erhältlichen anti-Siglec-E Antikörper erkannt wird.

#### **3.4.2 DNA-Vakzinierung eines Kaninchens und Test des Immunerums**

Der Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6-Vektor wurde für die DNA-Vakzinierung eines Kaninchens mittels der Gene-Gun-Technologie verwendet. Vor der Immunisierung wurde dem Kaninchen Prä-Immuneserum entnommen. Nach der Immunisierung wurde das anti-Siglec-E Immuneserum im FACS getestet. Hierbei wurde untersucht, ob das Immuneserum natives Siglec-E auf der Oberfläche von Neutrophilen erkennt. Periphere Blut-Leukozyten wurden mit dem Immuneserum (Verdünnung 1:2000) inkubiert. Die Bindung wurde mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper detektiert. Neutrophile wurden mit einem PE-

gefärbten anti-Gr1 Antikörper gegengefärbt. Wie Abbildung 3.5C zeigt, erkennt das Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum Siglec-E auf murinen neutrophilen Zellen.



**Abbildung 3.5: Herstellung eines Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserums**

A: Vektorkarte des Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6-Vektors: Die extrazelluläre Domäne von Siglec-E wurde kloniert, in den pCMV-SPORT6-Vektor ligiert und an ein DNA-Fragment fusioniert, das für eine GPI-Sequenz codierte, so dass das entstehende Protein membranständig exprimiert wird. B: Test des Siglec-E-GPI/pCMV-SPORT6-Vektors: Der klonierte Vektor wurde mittels FuGene transient in CHO-Zellen transfiziert. Zum Test der Oberflächenexpression von Siglec-E wurden die transfizierten Zellen mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper gefärbt. Die Bindung wurde mit einem PE-konjugierten anti-Ratte Antikörper detektiert. Zur Kontrolle wurde nur mit dem Sekundär-Antikörper gefärbt. C: Test des Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserums: murines Blut wurde nach der Erythrozyten-Lyse mit dem Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum (Verdünnung 1:2000) inkubiert. Die Bindung wurde mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper detektiert. Gezeigt ist hier die Bindung an neutrophile Zellen, detektiert durch einen PE-konjugierten anti-Gr1 Antikörper.

### 3.5 Generierung eines Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls

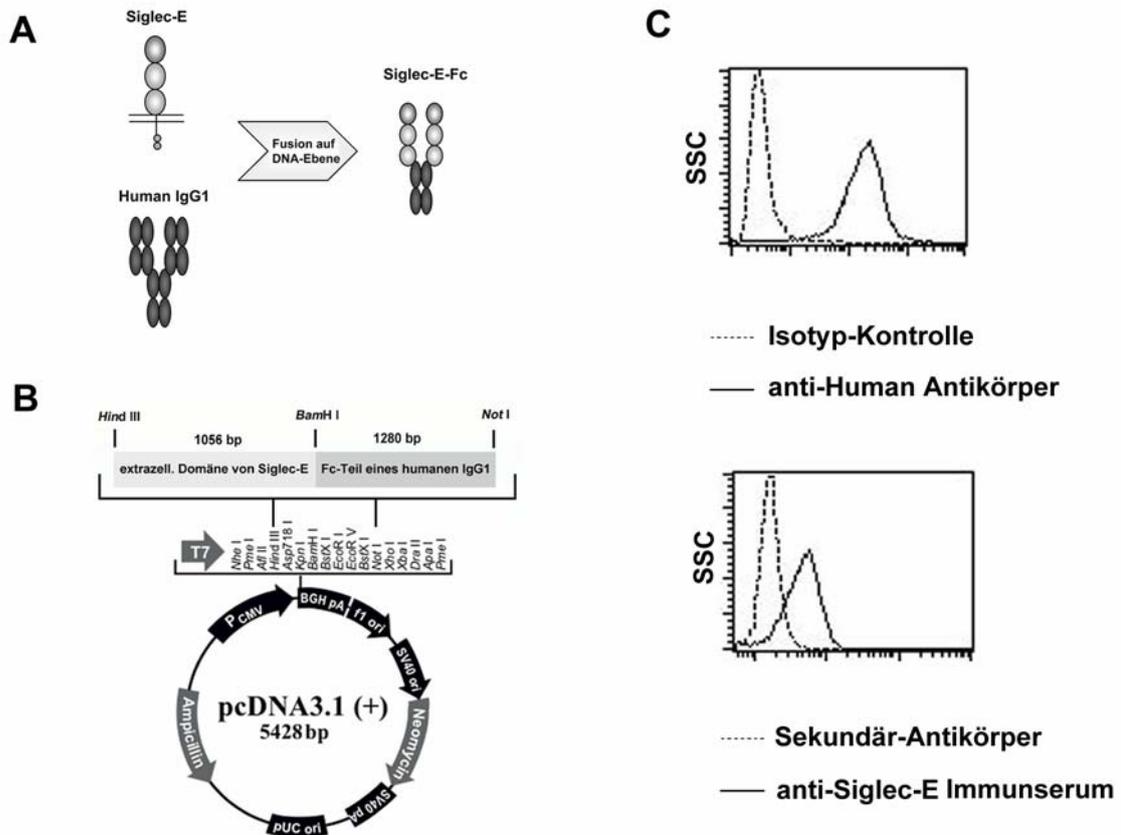
Zur Analyse der Interaktion von Siglec-E mit Trypanosomen wurde ein Siglec-E-Fc Fusionsmolekül generiert. Dieses Fusionsprotein besteht aus den drei extrazellulären Domänen von Siglec-E, die an einen Fc-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers fusioniert sind. Abbildung 3.6A zeigt schematisch den Aufbau des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls.

#### 3.5.1 Klonierung des Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektors

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus der Milz einer Balb/c Maus extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA wurde durch PCR ein DNA-Fragment amplifiziert, welches für die drei extrazellulären Domänen von Siglec-E codiert. Hierfür wurden die Primer Siglec-E-*Hind*III-sense und Siglec-E-*Bam*HI-antisense (Sequenz siehe Material und Methoden) verwendet. Das DNA-Fragment wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und an ein DNA-Fragment fusioniert, welches für einen humanen IgG1 Fc-Teil codiert. In Abbildung 3.6B ist die Vektorkarte des Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektors dargestellt.

#### 3.5.2 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Mit diesem Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Konstrukt wurden CHO-Zellen durch Elektroporation stabil transfiziert und subkloniert. Die Subklone wurden mittels intrazellulärer FACS-Färbung mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper auf die Expression von Siglec-E-Fc untersucht. Abbildung 3.6C zeigt einen Subklon, der Siglec-E-Fc hoch exprimiert. Die Expression wurde durch intrazelluläre FACS-Färbung mit dem Kaninchen anti-Siglec-E Immuns serum (Verdünnung 1:2000), gefolgt von einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:500) bestätigt. Dieser Subklon wurde in CELLine Bioreaktoren kultiviert. Das ins Medium abgegebene Fusionsprotein wurde mittels Protein G Säulen aufgereinigt.



**Abbildung 3.6: Generierung und Funktionstest von Siglec-E-Fc**

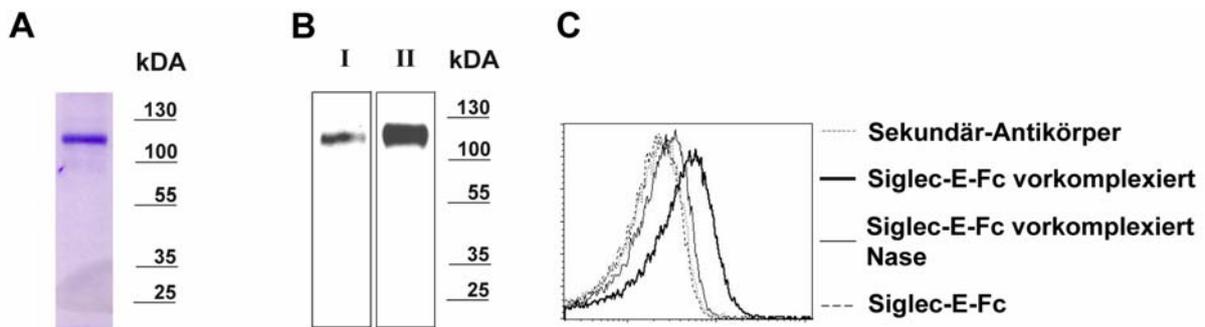
A: Schematische Darstellung des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls. Das Fusionsmolekül Siglec-E-Fc besteht aus den drei extrazellulären Ig-Domänen des Siglec-E-Proteins und dem Fc-Fragment eines humanen IgG1 Antikörpers. B: Vektorkarte des Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektors: Die extrazelluläre Domäne von Siglec-E wurde kloniert, in den pcDNA3.1-Vektor ligiert und mit dem Fc-Teil eines humanen IgG1 Antikörpers fusioniert. C: CHO-Zellen wurden stabil mit dem Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektor transfiziert und subkloniert. Die Expression von Siglec-E-Fc wurde durch intrazelluläre FACS-Färbung mit einem PE-konjugierten anti-Human Antikörper bestätigt. Auch das anti-Siglec-E Immunsereum detektiert das Fusionsmolekül intrazellulär. Die Bindung wurde mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper detektiert.

### 3.5.3 SDS-Page, Western Blot und Funktionstest des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls

Mit Hilfe einer SDS-Page mit anschließender Coomassie-Färbung (Abbildung 3.7A) bzw. mit anschließendem Western Blot (Abbildung 3.7B) wurde Siglec-E-Fc auf Größe und Reinheit untersucht. Entsprechend der Aminosäuresequenz sollte das Siglec-E-Fc Fusionsprotein ein Molekulargewicht von etwa 63 kDa besitzen. Es wurde jedoch bereits beschrieben, dass Siglec-E glykosyliert ist (Yu et al., 2001). Dadurch besitzt das Fusionsprotein ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Im Coomassie Gel erkennt man die hohe Reinheit des Fusionsproteins. Im Western Blot wird das Fusionsprotein sowohl von einem HRP-

konjugierten anti-Human Antikörper erkannt (Verdünnung 1:2000), als auch von dem Kaninchen anti-Siglec-E Immuns Serum (Verdünnung 1:5000). Die Bindung des Immunsersums wurde durch einen HRP-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:2000) detektiert.

Die Funktionalität von Siglec-E-Fc wurde mit einem Erythrozyten-Bindungstest untersucht. Erythrozyten haben einen hohen Gehalt an Sialinsäure auf der Oberfläche. Um zu untersuchen, ob das Fusionsprotein sialylierte Strukturen bindet, wurde die Interaktion von Siglec-E-Fc mit Erythrozyten durchflusszytometrisch untersucht. Erythrozyten wurden mit dem Fusionsprotein inkubiert und die Bindung mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper detektiert (Abbildung 3.7C). Dabei zeigte sich, dass Siglec-E-Fc nur an Erythrozyten bindet, wenn es mit dem anti-Human Antikörper vorkomplexiert ist. Nicht-vorkomplexiertes Siglec-E-Fc bindet dagegen kaum an die Erythrozyten. Nach Neuraminidase-Behandlung der Erythrozyten nahm die Bindung des vorkomplexierten Fusionsproteins an Erythrozyten ab. Dies bestätigt, dass Siglec-E-Fc tatsächlich sialylierte Strukturen erkennt.



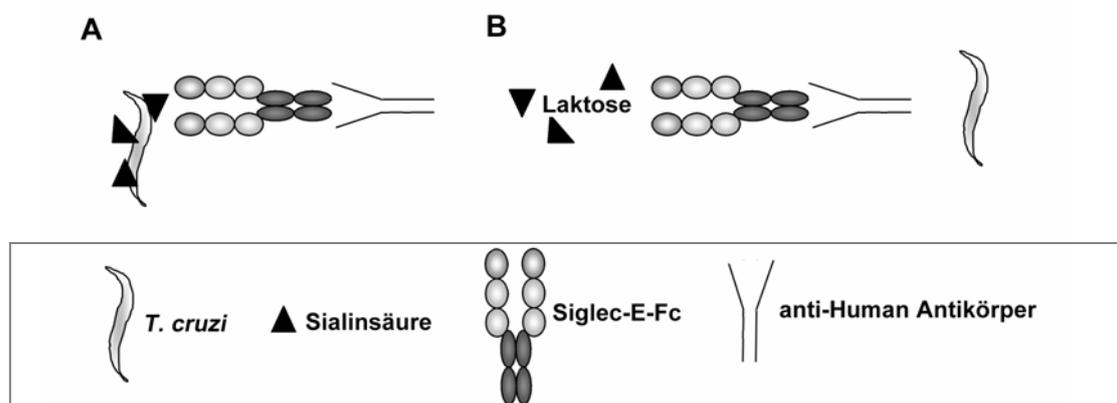
**Abbildung 3.7: Coomassie-Färbung, Western Blot und Funktionstest von Siglec-E-Fc**

A: Größe und Reinheit des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls wurden durch eine SDS-Page mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Das Fusionsmolekül hat eine Masse von ungefähr 110 kDa. B: Western Blot des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls: Siglec-E-Fc wurde mit einem HRP-konjugierten anti-Human Antikörper (I) detektiert. Auch das durch cDNA-Vakzinierung hergestellte Kaninchen anti-Siglec-E Immuns Serum erkennt Siglec-E-Fc im Western Blot (II). Die Bindung wurde mit einem HRP-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper detektiert. C: Funktionstest des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls: Die Bindung von Siglec-E-Fc an Erythrozyten wurde durchflusszytometrisch mit einem PE-konjugierten anti-Human Antikörper analysiert. Siglec-E-Fc bindet an sialylierte Strukturen auf Erythrozyten nur, wenn es mit dem anti-Human Antikörper vorkomplexiert ist. Siglec-E-Fc bindet nicht an Erythrozyten, wenn diese mit Neuraminidase (Nase) vorbehandelt wurden oder wenn Siglec-E-Fc nicht vorkomplexiert ist. Diese Abbildung zeigt repräsentativ ein Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

### 3.6 Das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül bindet an Sialinsäuren auf der Oberfläche von extrazellulären *T. cruzi*

Mit Hilfe des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls sollte untersucht werden, ob Siglec-E mit Trypanosomen interagiert. Dazu wurden Trypanosomen mit Siglec-E-Fc inkubiert und die Interaktion mit einem PE-konjugierten anti-Human Antikörper detektiert.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Interaktion von Siglec-E mit Trypanosomen Sialinsäure-abhängig ist. Hierzu wurden zwei Ansätze verwendet, um die Sialinsäuren von den Trypanosomen zu entfernen: Die Trypanosomen wurden mit Neuraminidase vorbehandelt, einem Enzym, das Sialinsäuren von der *T. cruzi* Oberfläche abspaltet. In einem zweiten Ansatz wurden die Trypanosomen mit Laktose vorbehandelt. Laktose ist ein Akzeptor-Molekül für Sialinsäure. Die TS der Parasiten spaltet die Sialinsäuren von der eigenen Oberfläche ab und überträgt sie auf die Laktose. Wenn Siglec-E-Fc tatsächlich an sialylierte Strukturen auf der Oberfläche von *T. cruzi* bindet, sollte in beiden Fällen die Bindung von Siglec-E-Fc an Trypanosomen abnehmen. Abbildung 3.8 zeigt ein Schema zur Interaktion des Fusionsmoleküls mit *T. cruzi*.

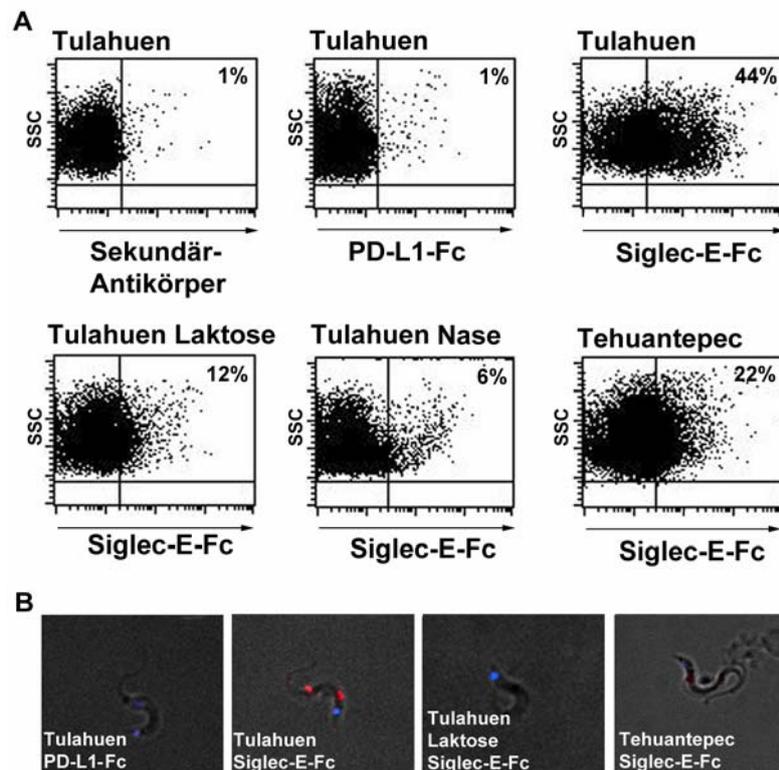


**Abbildung 3.8: Schema zur Bindung von Siglec-E-Fc an *T. cruzi***

A: Das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül bindet an terminale Sialinsäuren von glykosylierten Liganden auf der Oberfläche von *T. cruzi*. Die Bindung kann durch einen PE-konjugierten anti-Human Antikörper detektiert werden. B: In Gegenwart von Laktose überträgt die TS die Sialinsäuren von der *T. cruzi* Oberfläche auf die Laktose. Das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül kann daher nicht mehr an die Trypanosomen binden.

Zunächst wurde die Bindung von Siglec-E-Fc an die Parasiten der beiden *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abbildung 3.9A dargestellt, interagiert das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül mit pathogenen Parasiten des Tulahuen-Stammes. Als Kontrolle wurde nur der Sekundär-Antikörper, bzw. das irrelevante Fusionsmolekül PD-L1-Fc verwendet. Die Interaktion von Siglec-E mit *T. cruzi* ist Sialinsäure-abhängig, da die Bindung nach Vorbehandlung der Trypanosomen mit Neuraminidase und Laktose abnahm. Bemerkenswert ist, dass das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül mit Trypanosomen auch dann interagiert, wenn es nicht vorkomplexiert war. Dies steht im Gegensatz zu dem Bindungstest des Fusionsproteins an Erythrozyten (siehe Abschnitt 3.5.3). Die Trypanosomen scheinen daher entweder eine höhere Ligandendichte oder aber höher affine Liganden zu besitzen. Interessanterweise war auch die Bindung von Siglec-E-Fc an den nicht-pathogenen Tehuantepec-Stamm schwächer. Wie in Abschnitt 3.1 dargestellt, tragen Parasiten des Tehuantepec-Stammes weniger  $\alpha$ 2-3 verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche, so dass dadurch die verminderte Bindung an Siglec-E erklärt werden kann.

Auch in der Immunfluoreszenz sind die Unterschiede der beiden Stämme in der Siglec-E Bindung erkennbar (Abbildung 3.9B). Während der Tulahuen-Stamm stark durch das Fusionsmolekül angefärbt wurde, erkennt man bei dem Tehuantepec-Stamm nur eine schwache Färbung. Auffallend ist, dass die Parasiten nur in bestimmten Bereichen der Membran gefärbt wurden.



**Abbildung 3.9: Siglec-E-Fc bindet an sialylierte Strukturen auf der *T. cruzi* Oberfläche**

A: Unbehandelte, Neuraminidase (Nase)- oder Laktose-behandelte Trypanosomen der Stämme Tulahuen und Tehuantepec wurden mit Siglec-E-Fc gefärbt. Die Bindung wurde mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Zur Kontrolle wurde nur der Sekundär-Antikörper oder das irrelevante Fusionsmolekül PD-L1-Fc verwendet. Pathogene Parasiten des Tulahuen-Stammes zeigen eine starke Bindung von Siglec-E-Fc, während die Bindung des Fusionsmoleküls an nicht-pathogene Parasiten des Tehuantepec-Stammes schwächer ist. Die Interaktion ist Sialinsäure-abhängig, da die Bindung nach Neuraminidase-Behandlung oder Laktose-Behandlung abnimmt. B: Trypanosomen wurden wie unter A beschrieben gefärbt. Cytopins wurden angefertigt und die Bindung von Siglec-E-Fc an Trypanosomen in der Immunfluoreszenz analysiert. Siglec-E-Fc interagiert mit pathogenen Trypanosomen des Tulahuen-Stammes. Interessanterweise werden nur bestimmte Bereiche der Trypanosomen-Membran von Siglec-E-Fc angefärbt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Versuche.

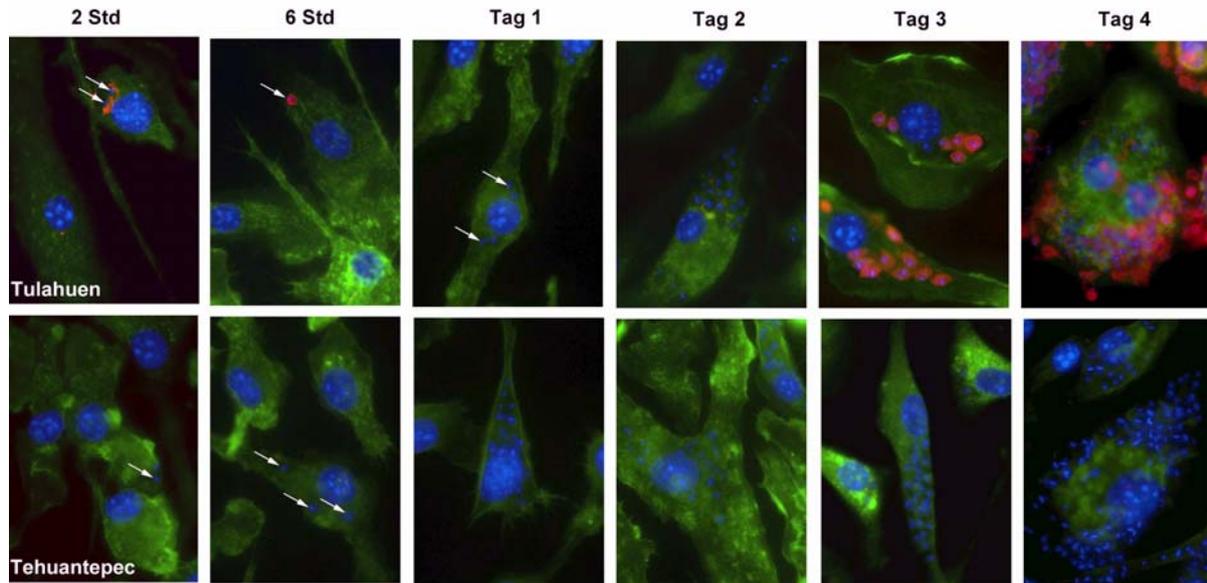
### **3.7 Bindung des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls an intrazelluläre Stadien von *T. cruzi***

Im Abschnitt 3.6 wurde beschrieben, dass Siglec-E an extrazelluläre Trypomastigote des pathogenen Tulahuen-Stammes bindet und dass diese Bindung über Sialinsäuren auf der Oberfläche von *T. cruzi* vermittelt wird. Die Bindung an extrazelluläre Trypomastigote des nicht-pathogenen Tehuantepec-Stammes war hingegen deutlich geringer.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül an intrazelluläre Stadien der beiden Stämme bindet. Hierzu wurden Makrophagen *in vitro* aus murinem Knochenmark generiert und auf Chamber-Slides mit Trypanosomen infiziert. Die Infektion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül gefärbt. Die Interaktion wurde mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper detektiert. Die Parasiten wurden mittels Dapi-Färbung sichtbar gemacht und das Cytoskelett der Makrophagen mit Phalloidin gegengefärbt.

Abbildung 3.10 zeigt, dass Parasiten des Tulahuen-Stammes kurz nach der Zellinvasion Siglec-E-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen. Das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül bindet 2 Stunden und 6 Stunden nach Zellinvasion an intrazelluläre Parasiten. Am Tag 1 und 2 nach der Infektion, wenn sich die Parasiten intrazellulär als Amastigote replizieren, ist keine Interaktion mit dem Fusionsprotein zu erkennen. Erst am Tag 3 nach der Infektion bindet das Fusionsmolekül wieder an Liganden auf intrazellulären Parasiten. Auch am Tag 4 nach der Infektion interagieren die austretenden Trypanosomen mit Siglec-E-Fc.

Bemerkenswerter Weise interagieren intrazelluläre Trypanosomen des nicht-pathogenen Tehuantepec-Stammes in keinem der intrazellulären Stadien mit Siglec-E-Fc.



**Abbildung 3.10: Siglec-E-Bindung an intrazelluläre Stadien**

Knochenmark-generierte Makrophagen wurden mit pathogenen Parasiten des Stammes Tulahuen und mit nicht-pathogenen Parasiten des Stammes Tehuantepec infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Dapi (blau) und Alexa488-markiertem Phalloidin (grün) gefärbt. Zur Analyse der Siglec-E-Bindung an intrazelluläre Stadien wurden die Zellen mit Siglec-E-Fc inkubiert. Die Bindung wurde mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper (rot) detektiert. Parasiten des pathogenen Stammes exprimieren bis zu 6 Stunden nach Invasion Siglec-E-Liganden. Amastigote des pathogenen Stammes zeigen keine Siglec-E-Bindung. Erst während der Entwicklung zu Trypomastigoten, wird Siglec-E-Fc wieder gebunden. Die nicht-pathogenen Parasiten binden zu keinem Zeitpunkt der intrazellulären Stadien Siglec-E-Fc. Die hier gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuche.

### 3.8 Generierung von CHO-Siglec-E Transfektanten

Bisher wurde die Interaktion von Trypanosomen mit Siglec-E anhand eines Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls beschrieben. Im nächsten Schritt sollte die Interaktion auf zellulärer Ebene untersucht werden. Dazu wurden CHO-Zellen mit einem Siglec-E/pcDNA3.1-Konstrukt transfiziert, welches für das gesamte Siglec-E-Protein codiert. Die erhaltenen CHO-Siglec-E-Zellen exprimieren stabil Siglec-E auf ihrer Oberfläche.

#### 3.8.1 Klonierung des Siglec-E/pcDNA3.1-Vektors

Siglec-E wurde in seiner Gesamtlänge kloniert, indem Siglec-E-*HindIII*-sense und Siglec-E-*BamHI*-antisense (Sequenz siehe Material und Methoden) als Primer und die cDNA der Balb/c-Milzzellen (Abschnitt 3.5.1) als Template verwendet wurden. Die amplifizierte DNA

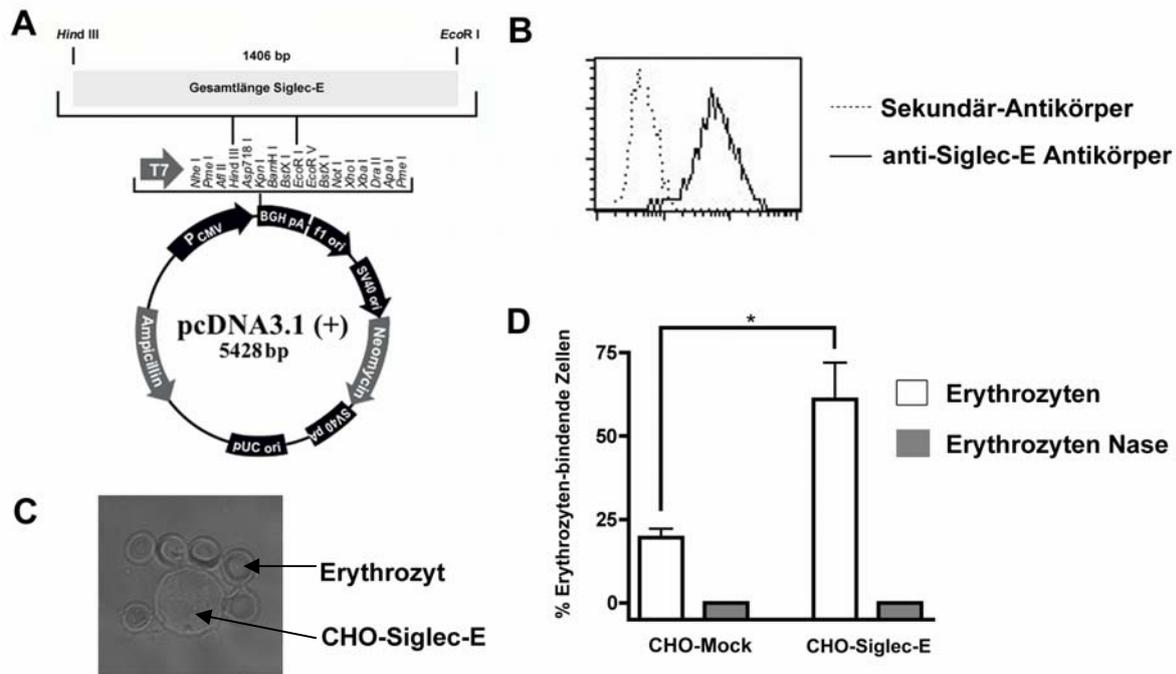
wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Abbildung 3.11A zeigt die Vektorkarte des Siglec-E/pcDNA3.1-Konstrukts.

### **3.8.2 Stabile Transfektion von CHO-Zellen**

Mit dem Siglec-E/pcDNA3.1-Konstrukt wurden CHO-Zellen durch Elektroporation stabil transfiziert und subkloniert. Die Siglec-E-Expression der Subklone wurde nach Färbung mit dem Ratte anti-Siglec-E Antikörper durchflusszytometrisch getestet. Abbildung 3.11B zeigt einen Subklon der Siglec-E hoch exprimiert. Dieser Subklon, nachfolgend CHO-Siglec-E genannt, wurde für weitere Versuche verwendet. Als Kontrolle wurden CHO-Zellen mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert. Nachfolgend werden diese Zellen CHO-Mock-Zellen genannt.

### **3.8.3 Funktionstest der CHO-Siglec-E-Zellen**

Zunächst sollte untersucht werden, ob die generierten CHO-Siglec-E-Zellen sialylierte Strukturen binden. Hierzu wurden die CHO-Siglec-E-Zellen und die CHO-Mock-Zellen mit Erythrozyten inkubiert. Die Bindung der Zellen an Erythrozyten wurde mikroskopisch ausgewertet. Es wurden jeweils 200 Zellen gezählt und der Prozentsatz an Zellen ermittelt, die mindestens zwei Erythrozyten gebunden haben. Als Kontrolle wurden Erythrozyten mit Neuraminidase vorbehandelt. Abbildung 3.11C zeigt beispielhaft eine CHO-Siglec-E-Zelle, die mehrere Erythrozyten gebunden hat. Wie Abbildung 3.11D zeigt, binden signifikant mehr CHO-Siglec-E-Zellen Erythrozyten als CHO-Mock-Zellen. Die Interaktion wird über Sialinsäuren vermittelt, da die Bindung der Zellen an Neuraminidase-behandelte Erythrozyten verloren geht.



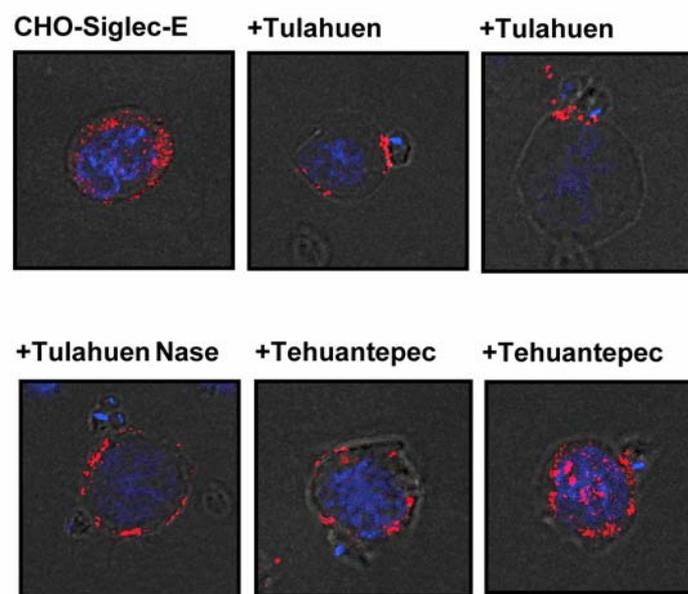
**Abbildung 3.11: Generierung und Funktionstest von CHO-Siglec-E-Zellen**

A: Vektorkarte des Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektors: Siglec-E wurde in seiner Gesamtlänge kloniert und in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. B: CHO-Zellen wurden stabil mit dem Siglec-E-Fc/pcDNA3.1-Vektor transfiziert und subkloniert. Die Oberflächenexpression von Siglec-E wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Der hier gezeigte Subklon wurde mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper gefärbt und die Bindung mit einem PE-konjugierten anti-Ratte Antikörper detektiert. Zur Kontrolle wurde nur der Sekundär-Antikörper eingesetzt. C und D: Um die Sialinsäure-Bindung der CHO-Siglec-E-Zellen zu analysieren, wurden CHO-Siglec-E-Zellen und CHO-Mock-Zellen mit humanen Erythrozyten inkubiert. Die Bindung von Erythrozyten an die Zellen wurde mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt und die Anzahl an Zellen bestimmt, die mindestens zwei Erythrozyten gebunden haben. Zur Kontrolle der Sialinsäure-Abhängigkeit wurden Erythrozyten vorher mit Neuraminidase behandelt. C: CHO-Siglec-E-Zelle, die mehrere Erythrozyten gebunden hat. D: CHO-Siglec-E-Zellen binden mehr Erythrozyten als CHO-Mock-Zellen. Die Bindung geht nach Neuraminidase-Behandlung verloren. Das gezeigte Ergebnis wurde aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

### 3.9 Akkumulation von Siglec-E in der Kontaktzone von CHO-Siglec-E-Zellen und *T. cruzi*

Die generierten CHO-Siglec-E-Zellen wurden verwendet, um die Bindung von Siglec-E an Trypanosomen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Hierzu wurden CHO-Siglec-E-Zellen mit PFA-fixierten Trypanosomen für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die CHO-Siglec-

E-Zellen mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper inkubiert, gewaschen und mit einem Alexa594-markierten anti-Ratte Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Dapi angefärbt. Die Siglec-E-Verteilung wurde am Fluoreszenzmikroskop mit dem Deconvolution-Modul der Openlab Software analysiert. In Abbildung 3.12 wird gezeigt, dass Siglec-E auf CHO-Siglec-E-Zellen exprimiert wird. CHO-Mock-Zellen zeigten keine Siglec-E-Expression (nicht gezeigt). Nach Inkubation der CHO-Siglec-E-Zellen mit Parasiten des Tulahuen-Stammes wird Siglec-E in den Kontakt-Bereich zwischen der Zelle und dem Parasiten rekrutiert. Diese Akkumulation fand nicht statt, wenn die Trypanosomen mit Neuraminidase vorbehandelt wurden. Auch wurde keine Rekrutierung von Siglec-E zu den nicht-pathogenen Parasiten des Tehuantepec-Stammes induziert. Bemerkenswert ist, dass sich die Anzahl der Parasiten, die mit den CHO-Siglec-E-Zellen interagierten, zwischen den beiden Stämmen nicht unterschied. Auch nach Neuraminidase-Behandlung konnten gleich viele Parasiten an CHO-Siglec-E-Zellen binden.



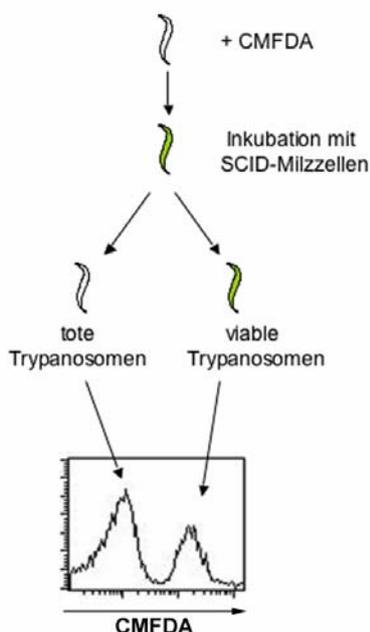
**Abbildung 3.12: Siglec-E wird in die Kontaktzone zwischen CHO-Siglec-E-Zellen und pathogenen Trypanosomen rekrutiert**

CHO-Siglec-E-Zellen wurden mit Trypanosomen der beiden Stämme Tulahuen und Tehuantepec für 1 Stunde inkubiert. Die Zellen wurden mit Dapi (blau), mit einem Ratte anti-Siglec-E Antikörper als Primär-Antikörper und einem Alexa594-markierten anti-Ratte Antikörper als Sekundär-Antikörper (rot) gefärbt. Die Siglec-E Lokalisation wurde im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Siglec-E wird in die Kontaktzone zwischen den CHO-Siglec-E-Zellen und pathogenen Parasiten des Tulahuen-Stammes rekrutiert. Nach Neuraminidase-Behandlung der Trypanosomen kommt es zu keiner Akkumulation von Siglec-E in der Kontaktzone. Auch nicht-pathogene Parasiten des Tehuantepec-Stammes induzieren keine Rekrutierung von Siglec-E. Die hier gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils drei unabhängige Versuche.

In den vorherigen Abschnitten wurde demonstriert, dass Siglec-E Sialinsäure-abhängig an pathogene Trypanosomen bindet. Die Interaktion wurde zum einen mit einem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül untersucht. Des Weiteren konnte auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass Siglec-E in die Kontaktzone zwischen pathogenen Parasiten und Zielzellen rekrutiert wird. In den nächsten Abschnitten wird die Funktion dieser Interaktion untersucht.

### 3.10 Die extrazelluläre Lyse von Trypanosomen durch NK-Zellen

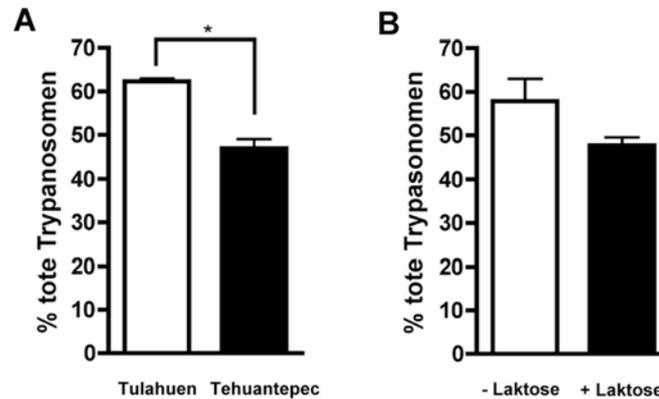
Es wurde bereits beschrieben, dass extrazelluläre Trypanosomen durch NK-Zellen direkt lysiert werden (Lieke et al., 2004). Diese Lyse ist kontaktabhängig und wird durch cytotoxische Granula vermittelt. Außerdem müssen die NK-Zellen durch IL-12 aktiviert worden sein. Abbildung 3.13 stellt den Versuchsaufbau dar, mit dem die Lyse von extrazellulären Trypanosomen untersucht werden kann. Trypanosomen werden mit CMFDA gefärbt. Dieser Farbstoff dringt in das Cytosol der Trypanosomen ein und wird dort von Esterasen gespalten, wodurch er fluoresziert. Die CMFDA-gefärbten Trypanosomen werden mit Milzzellen einer SCID-Maus *in vitro* inkubiert. Diese Maus besitzt keine T-Zellen und B-Zellen, so dass NK-Zellen die einzige Lymphocytenpopulation in der Milz bilden. Durch die NK-Zell-vermittelte Lyse wird die Membran der Trypanosomen zerstört und das cytosolische CMFDA geht verloren. Im Durchflusszytometer kann man viable fluoreszierende von toten nicht-fluoreszierenden Trypanosomen unterscheiden.



**Abbildung 3.13: *In vitro*-Modell zur Lyse von extrazellulären Trypanosomen durch NK-Zellen**

CMFDA-gefärbte Trypanosomen werden mit Milzzellen einer SCID-Maus für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die NK-Zellen lysieren die Trypanosomen, was zu einem Verlust der Membranintegrität der Trypanosomen führt. Die toten Trypanosomen verlieren das cytosolische CMFDA und damit ihre Fluoreszenz. Die Lyse der extrazellulären Trypanosomen kann somit durchflusszytometrisch analysiert werden.

In einem ersten Experiment konnte festgestellt werden, dass der Gehalt an Sialinsäuren auf der Trypanosomen-Oberfläche bei der Lyse durch NK-Zellen eine Rolle zu spielen scheint. Parasiten des Tulahuen-Stammes werden von NK-Zellen in höherem Maße lysiert als Parasiten des Tehuantepec-Stammes (Abbildung 3.14A). Darüber hinaus werden Parasiten des Tulahuen-Stammes weniger stark lysiert, wenn sie mit Laktose vorbehandelt wurden und somit weniger Sialinsäure auf der Oberfläche tragen (Abbildung 3.14B).



### Abbildung 3.14: Lyse von extrazellulären Trypanosomen durch NK-Zellen

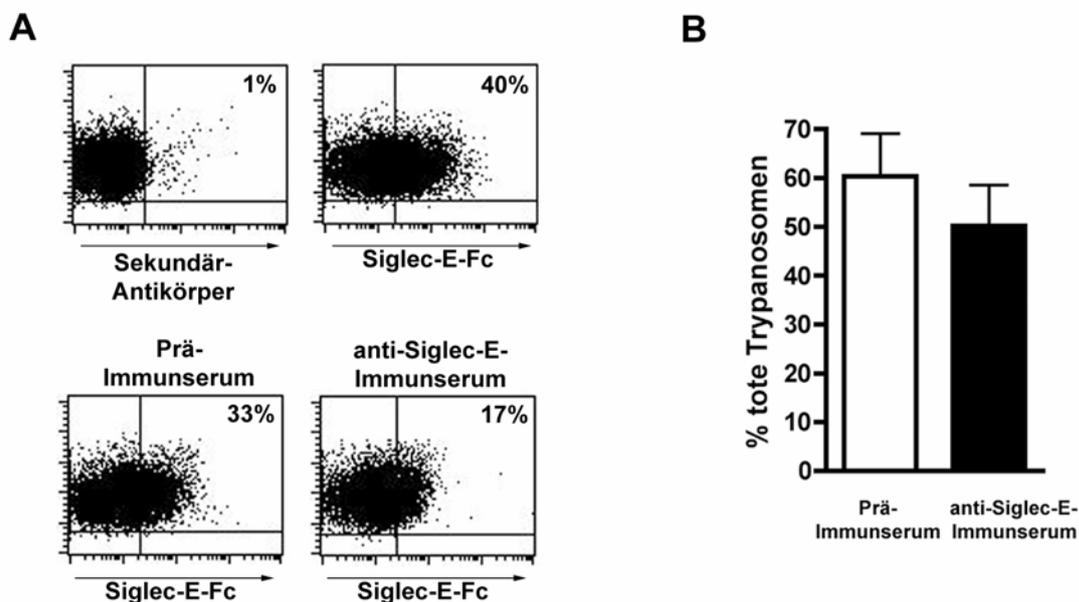
A: CMFDA-gefärbte Trypanosomen der Stämme Tulahuen und Tehuantepec wurden mit Milzzellen einer SCID-Maus für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Trypanosomen wurde durchflusszytometrisch analysiert. NK-Zellen haben eine größere lytische Aktivität gegenüber Tulahuen- als gegenüber Tehuantepec-Parasiten. B: Trypanosomen des Tulahuen-Stammes wurden mit CMFDA gefärbt, mit Laktose behandelt und anschließend mit Milzzellen einer SCID-Maus für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Lyse durch NK-Zellen war nach Laktose-Behandlung geringer. Das gezeigte Ergebnis wurde aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Kontakt zwischen NK-Zellen und Trypanosomen über Siglec-E vermittelt wird. Hierzu sollte Siglec-E auf NK-Zellen durch das Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum blockiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob das Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum die Bindung von Siglec-E-Fc an Trypanosomen blockiert. Dazu wurde das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül mit dem Immuneserum vorinkubiert und anschließend die Interaktion mit den Trypanosomen analysiert. Die Bindung wurde mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper detektiert. Wie aus Abbildung 3.15A zu entnehmen ist, blockiert das Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum die Interaktion zwischen Siglec-E-Fc und *T. cruzi* Tulahuen nur teilweise. Der Prozentsatz an gefärbten Trypanosomen nahm von 40% auf 17% nach Zugabe des

Immunsersums ab. Auch die Inkubation mit dem Prä-Immunsersum als Kontrolle zeigt eine leichte Abnahme der Interaktion auf 33%.

Das Kaninchen anti-Siglec-E Immunsersum wurde mit den NK-Zellen 30 Minuten auf Eis vorinkubiert, bevor diese zu den CMFDA-gefärbten Parasiten des Tulahuen-Stammes gegeben wurden. Als Kontrolle wurde das Prä-Immunsersum verwendet. Anschließend wurde die Lyse der Trypanosomen durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 3.15B zeigt, dass die Blockade der Interaktion von Siglec-E mit Trypanosomen zu einer leichten Abnahme der Lyse führt. Allerdings ist diese Abnahme nicht signifikant. Es sollte aber beachtet werden, dass das Immunsersum die Bindung auch nicht vollständig blockiert.



**Abbildung 3.15: Blockade von Siglec-E während der NK-Zell-vermittelten Lyse von *T. cruzi***

A: Um zu testen, ob das Kaninchen anti-Siglec-E Immunsersum die Interaktion zwischen Siglec-E und Trypanosomen blockiert, wurde das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül mit dem Immunsersum (1:10 verdünnt) 20 Minuten auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde das Prä-Immunsersum verwendet. Anschließend wurde der Tulahuen-Stamm mit dem blockierten Siglec-E-Fc gefärbt. Die Bindung wurde mit einem PE-markierten anti-Human Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Das anti-Siglec-E Immunsersum schwächt die Bindung von Siglec-E-Fc an *T. cruzi* Tulahuen ab, kann sie jedoch nicht vollständig verhindern. B: Milzzellen einer SCID-Maus wurden mit dem Kaninchen anti-Siglec-E Immunsersum (1:10 verdünnt) 20 Minuten auf Eis vorinkubiert. Als Kontrolle wurde das Prä-Immunsersum verwendet. Anschließend wurden sie mit CMFDA-gefärbten Trypanosomen des Tulahuen-Stammes für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die Lyse der Trypanosomen durchflusszytometrisch analysiert. Die Inkubation mit dem anti-Siglec-E Immunsersum schwächt die Lyse der Trypanosomen durch NK-Zellen ab. Das gezeigte Ergebnis wurde aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

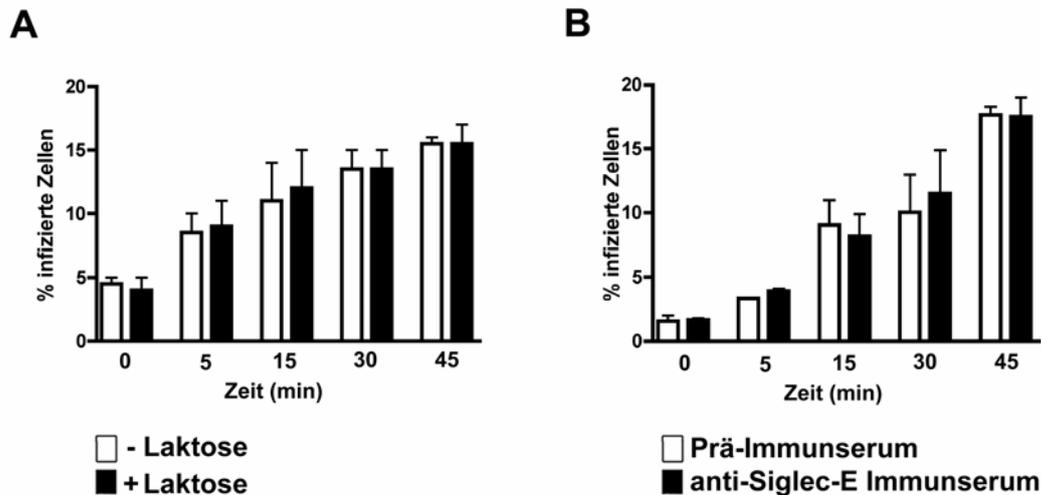
Diese Daten weisen darauf hin, dass Sialinsäuren bei der NK-Zell-vermittelten Lyse von Trypanosomen eine Rolle spielen. Es konnte hier allerdings nicht eindeutig gezeigt werden, dass die NK-Zellen über Siglec-E mit den Trypanosomen interagieren. Zumindest scheint Siglec-E nicht das einzige Molekül zu sein, welches die Interaktion vermittelt.

### **3.11 Siglec-E ist kein primärer Rezeptor für die Zellinvasion**

Es wurde in den Abschnitten 3.6, 3.7 und 3.9 beschrieben, dass Siglec-E mit Trypanosomen interagiert. Dabei bindet Siglec-E stärker an pathogene Parasiten des Tulahuen-Stammes als an nicht-pathogene Parasiten des Tehuantepec-Stammes. Des Weiteren wird Siglec-E in die Kontaktzone zu pathogenen Trypanosomen rekrutiert. Eine mögliche Funktion dieser Interaktion wäre eine erleichterte Zellinvasion. Es ist bekannt, dass einige Siglecs als endocytotische Rezeptoren fungieren. Die cytosolischen ITIMs dieser Siglecs interagieren dabei mit dem AP2-Komplex, der eine schnelle Endozytose auslöst. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob Trypanosomen über die Interaktion mit Siglec-E Zellen infizieren können. Es wäre eine Erklärung für die unterschiedliche Pathogenität der Stämme: Der pathogene Stamm bindet stärker an Siglec-E und kann deshalb besser Zellen infizieren.

Zunächst wurde untersucht, ob Siglec-E eine Rolle bei der Invasion von professionell phagozytierenden Zellen spielt. Hierzu wurde peripheres Blut einer Maus *in vitro* mit CMFDA-markierten Tulahuen-Parasiten infiziert und die Infektionsrate von Neutrophilen bestimmt. Das *in vitro*-Infektionsmodell wurde bereits in Abschnitt 3.2 vorgestellt. Vor der Infektion wurden die Trypanosomen einmal mit Laktose vorbehandelt, um die Sialinsäure-Abhängigkeit der Infektion zu untersuchen. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit dem Kaninchen anti-Siglec-E Immuns serum vorinkubiert, um die Interaktion zwischen Siglec-E und den Trypanosomen zu blockieren.

Abbildung 3.16 zeigt, dass die Infektionsrate von Neutrophilen nicht beeinflusst wird, unabhängig davon, ob die Trypanosomen mit Laktose vorbehandelt werden (Abbildung 3.16A) oder das blockierende Immuns serum verwendet wird (Abbildung 3.16B). Siglec-E scheint also kein Rezeptor für die Zellinvasion zu sein.



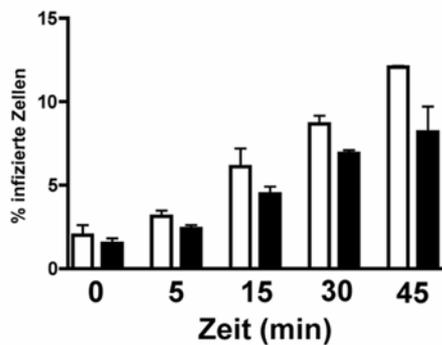
**Abbildung 3.16: Die Infektionsrate von Neutrophilen ist weder von Sialinsäuren noch von Siglec-E abhängig**

A: Murines Blut wurde nach der Erythrozyten-Lyse mit unbehandelten oder Laktose-behandelten CMFDA-gefärbten Trypanosomen des Tulahuen-Stammes inkubiert. Die Infektionsrate von Gr1<sup>+</sup> neutrophilen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt, dass die Infektionsrate nicht von dem Sialinsäure-Gehalt auf der *T. cruzi* Oberfläche beeinflusst wird. B: Murines Blut wurde nach der Erythrozyten-Lyse mit dem Kaninchen anti-Siglec-E Immuneserum (1:10 verdünnt) 20 Minuten auf Eis vorinkubiert. Zur Kontrolle wurden die Blutleukozyten mit dem Prä-Immuneserum vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CMFDA-gefärbten Trypanosomen infiziert und die Infektionsrate bestimmt. Die Abbildung zeigt, dass die Blockade von Siglec-E keinen Einfluss auf die Infektionsrate von Neutrophilen hat. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurden CHO-Mock-Zellen und CHO-Siglec-E-Zellen *in vitro* mit Trypanosomen der beiden Stämme infiziert und die Infektionsraten bestimmt. Abbildung 3.17 zeigt die Infektionsraten von CHO-Mock-Zellen und CHO-Siglec-E-Zellen mit *T. cruzi* Tulahuen-Parasiten (Abbildung 3.17A) und Tehuantepec-Parasiten (Abbildung 3.17B). Man erkennt, dass die Expression von Siglec-E keinen Einfluss auf die Infektionsrate der Zellen hat. Die Infektion von CHO-Siglec-E-Zellen mit Tulahuen-Parasiten ist sogar geringer, wenn auch nicht signifikant geringer, als die der CHO-Mock-Zellen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass beide Parasitenstämme die Zellen mit der gleichen Rate infizieren. Dieses deutete sich schon in vorherigen Versuchen an. In Abschnitt 3.9 zur Untersuchung der Akkumulation von Siglec-E in der Kontaktzone von Zellen und Parasiten wurde bereits beschrieben, dass beide Parasiten gleich häufig an Zellen binden. Hier hatte auch die Neuraminidase-Behandlung keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Interaktion.

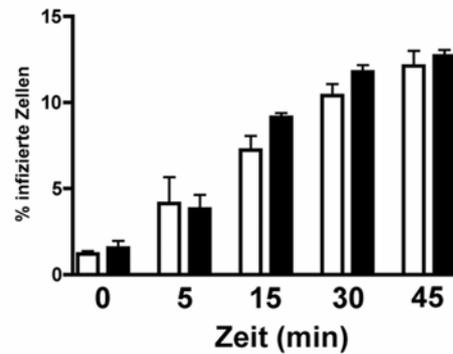
Daher scheint der Unterschied in der Pathogenität der Parasiten nicht auf unterschiedlichen Fähigkeiten zur Zellinvasion zu beruhen. Es wäre möglich, dass die beiden Stämme eine unterschiedliche Fähigkeiten besitzen, das Immunsystem zu modulieren.

### A Tulahuen



□ CHO-Mock  
■ CHO-Siglec-E

### B Tehuantepec



□ CHO-Mock  
■ CHO-Siglec-E

#### Abbildung 3.17: Siglec-E ist kein primärer Rezeptor für die *T. cruzi* Invasion

CHO-Mock-Zellen und CHO-Siglec-E-Zellen wurden mit CMFDA-gefärbten Trypanosomen des Stammes Tulahuen (A) und Tehuantepec (B) infiziert. Die Infektion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt und die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Man erkennt, dass CHO-Mock- und CHO-Siglec-E-Zellen von beiden Stämmen gleich stark infiziert werden. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

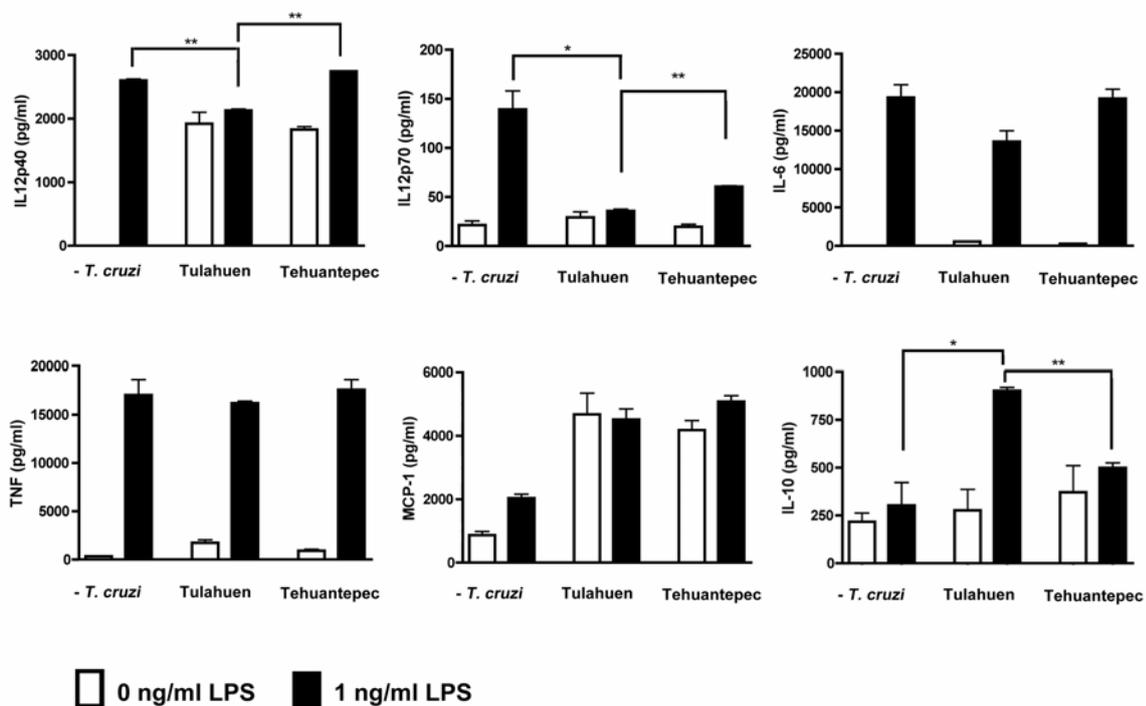
### 3.12 *T. cruzi* moduliert die Funktion von Dendritischen Zellen

Die beiden *T. cruzi* Stämme Tulahuen und Tehuantepec zeigen eine unterschiedliche Infektiosität während einer Infektion von C57BL/6 Mäusen. Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, beruht dieser Unterschied nicht auf der unterschiedlichen Fähigkeit, Wirtszellen zu infizieren. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Stämme unterschiedlich stark das Immunsystem supprimieren.

Aus diesem Grund sollte als nächstes überprüft werden, ob die beiden Stämme einen unterschiedlichen Einfluss auf die Funktion von Dendritischen Zellen haben. Dendritische Zellen besitzen eine entscheidende Funktion bei der protektiven Immunantwort gegen *T.*

*cruzi*, da sie unter anderem pro-inflammatorische Cytokine sezernieren, die das Immunsystem aktivieren.

In diesem Versuch wurden Dendritische Zellen aus dem Knochenmark einer C57BL/6 Maus generiert und mit hitzeinaktivierten Trypanosomen beider Stämme inkubiert. Bei der Hitzeinaktivierung bleibt die Oberflächenstruktur der Trypanosomen intakt, so dass der eintretende Effekt direkt auf Interaktion von Dendritischen Zellen mit der Oberfläche des Parasiten zurückzuführen ist und nicht auf sezernierte Produkte von *T. cruzi*. Die Dendritischen Zellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS), einem TLR-4-Agonisten, stimuliert und die Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen mit ELISA, bzw. mit einem Cytometric Bead Array gemessen.



**Abbildung 3.18: *T. cruzi* Tulahuen hemmt die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine**

Knochenmarks-generierte Dendritische Zellen wurden mit hitzeinaktivierten Trypanosomen der Stämme Tulahuen und Tehuantepec inkubiert und mit LPS (1 ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Cytokinproduktion aus dem Überstand mit ELISA oder mit dem Cytometric Bead Array bestimmt. Der Tulahuen-Stamm inhibiert die Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-12p40, IL-12p70 und IL-6 und stimuliert dagegen die Sekretion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10. Der Einfluss des Tehuantepec-Stammes auf die Cytokinproduktion ist dagegen weniger stark ausgeprägt. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Abbildung 3.18 zeigt, dass die Interaktion von Dendritischen Zellen mit *T. cruzi* die Cytokinproduktion stark beeinflusst. Besonders der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen hemmt die LPS-induzierte Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-12p40, IL-12p70 und IL-6. Der nicht-pathogene Stamm Tehuantepec hemmt dagegen die Produktion dieser pro-inflammatorischen Cytokine weniger stark. Die TNF- $\alpha$ - und die MCP-1-Produktion wurde von beiden Parasiten nicht beeinflusst. Bemerkenswert ist, dass der *T. cruzi* Stamm Tulahuen nicht nur die pro-inflammatorische Cytokinproduktion inhibiert, sondern darüber hinaus die Produktion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 stimuliert.

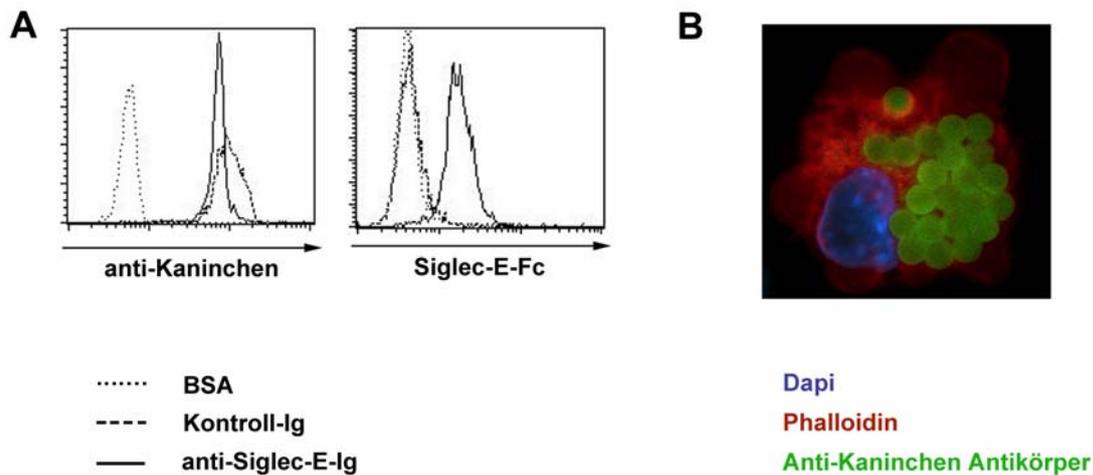
### **3.13 Die Siglec-E Ligation auf Dendritischen Zellen inhibiert die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine**

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass die beiden *T. cruzi* Stämme sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, das Immunsystem zu modulieren. Während der nicht-pathogene Tehuantepec-Stamm kaum Einfluss auf die Cytokinproduktion Dendritischer Zellen hat, hemmt der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine und stimuliert dagegen die Produktion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10. Es wäre möglich, dass diese Immunsuppression auf eine Ligation von Siglec-E durch *T. cruzi* zurückzuführen ist. Dies würde die Korrelation zwischen der unterschiedlichen Virulenz der Stämme und ihrer TS-Aktivität, bzw. ihres Sialinsäure-Gehalts erklären.

In diesem Abschnitt sollte direkt die Auswirkung einer Siglec-E-Ligation auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Dynabeads mit Kaninchen anti-Siglec-E IgG Antikörpern gekoppelt, welche aus dem anti-Siglec-E Immenserum aufgereinigt wurden. Diese anti-Siglec-E IgG beschichteten Dynabeads sollen ein Modell für Trypanosomen mit einer hohen Dichte an Siglec-E-Liganden auf ihrer Oberfläche sein. Sie wurden in den folgenden Versuchen eingesetzt, um Siglec-E auf Dendritischen Zellen zu ligieren. Als Kontrolle wurden Kaninchen IgG Antikörper aus dem Prä-Immenserum aufgereinigt und mit diesen Antikörpern Dynabeads beschichtet (Kontroll-Dynabeads).

Die Beschichtung der Dynabeads wurde im FACS überprüft (Abbildung 3.19A). Man erkennt hier, dass sowohl anti-Siglec-E-beschichtete Dynabeads, als auch Kontroll-Dynabeads von einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper erkannt werden. Dagegen werden nur die

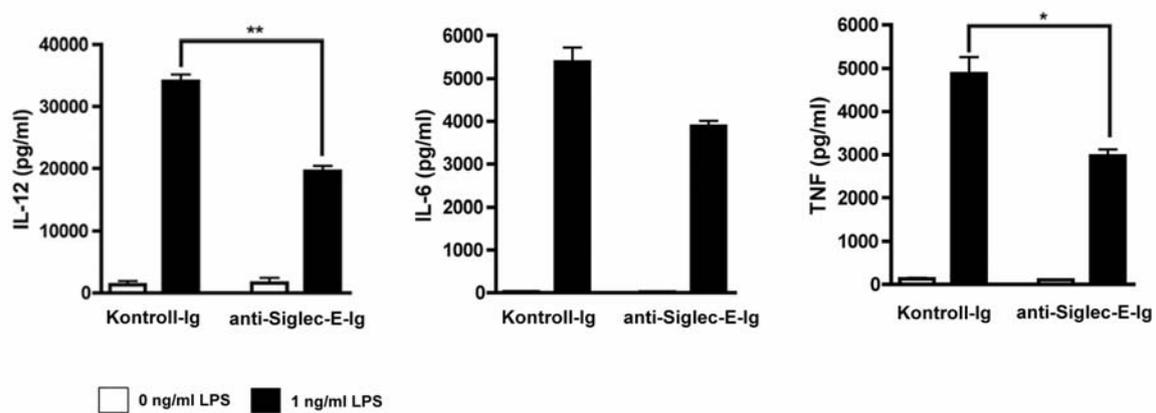
anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads von dem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül gebunden. Abbildung 3.19B zeigt weiterhin, dass die Dynabeads stark an Dendritische Zellen adhäreren und auch von Dendritischen Zellen aufgenommen werden.



**Abbildung 3.19: Beschichtung von Dynabeads mit Kaninchen anti-Siglec-E IgG Antikörpern**

A: Dynabeads wurden mit Kaninchen anti-Siglec-E IgG Antikörpern und mit Kaninchen IgG Antikörpern beschichtet. Als zusätzliche Kontrolle wurden Dynabeads nur mit BSA beschichtet. Die Beschichtung wurde durchflusszytometrisch überprüft. Die anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads (anti-Siglec-E-Ig) und die Kaninchen IgG-beschichteten Dynabeads (Kontroll-Ig) wurden von einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper erkannt. Dagegen konnte das Siglec-E-Fc Fusionsprotein nur die anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads binden. Die Bindung wurde mit einem PE-konjugierten anti-Human Antikörper detektiert. B: Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden mit anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads inkubiert. Nach 24 Stunden wurden Cytospins angefertigt und diese mit Dapi (blau), Phalloidin (rot) und einem FITC-markierten anti-Kaninchen Antikörper (grün) gefärbt. Die Interaktion und die Aufnahme von Dynabeads durch Dendritische Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

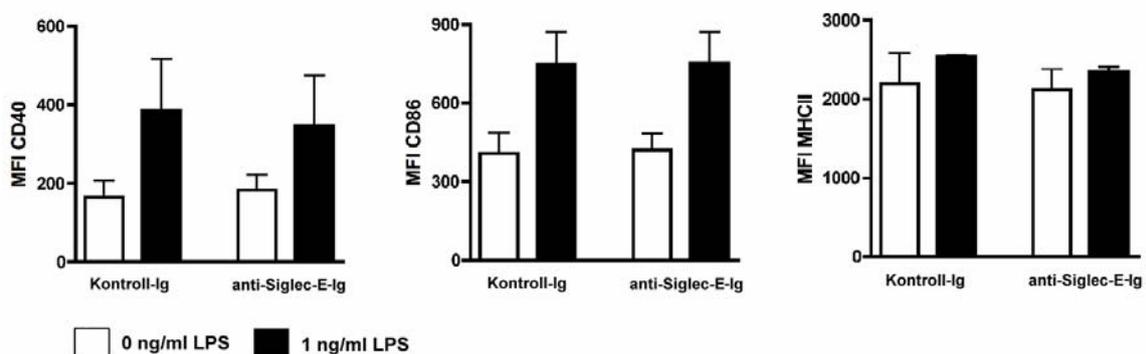
Die anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads wurden eingesetzt, um Siglec-E auf Dendritischen Zellen zu ligieren. Dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark einer C57BL/6 Maus generiert. Diese wurden mit anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads und mit Kontroll-Dynabeads inkubiert und mit LPS stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen mit ELISA, bzw. mit einem Cytometric Bead Array gemessen. Abbildung 3.20 zeigt, dass die Siglec-E-Ligation die LPS-induzierte Produktion der Cytokine IL-12p40, IL-6 und TNF- $\alpha$  inhibiert. IL-10 und IL-12p70 waren in diesen Versuchen nicht detektierbar.



**Abbildung 3.20: Siglec-E moduliert die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen**

Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden mit anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads (anti-Siglec-E-Ig) und mit Kaninchen IgG-beschichteten Dynabeads (Kontroll-Ig) im Verhältnis 1:5 inkubiert und mit LPS (1 ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IL-12p40 Produktion durch indirekten Sandwich-ELISA und auf Produktion von IL-6 und TNF mit dem Cytometric Bead Array untersucht. Die Ligation von Siglec-E führt zu einer Abnahme der IL-12p40-, der IL-6- und der TNF-Produktion nach LPS-Stimulation. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Siglec-E-Ligation auf die Expression von Reifungsmarkern untersucht werden. Hierzu wurden Dendritische Zellen mit den anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads und den Kontroll-Dynabeads inkubiert und mit LPS stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Expression von CD40, CD86 und MHCII durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, hat die Siglec-E Ligation keinen Einfluss auf die Expression von Reifungsmarkern auf Dendritischen Zellen.



**Abbildung 3.21: Siglec-E hat keinen Einfluss auf die Expression von Reifungsmarkern**

A: Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden mit Kontroll-Ig oder anti-Siglec-E Ig gekoppelten Dynabeads im Verhältnis 1:5 inkubiert und mit LPS (1 ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf die Reifungsmarker CD40, CD86 und MHCII durchflusszytometrisch untersucht. Die Ligation von Siglec-E hat keinen Einfluss auf die Expression von Reifungsmarkern nach LPS-Stimulation. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

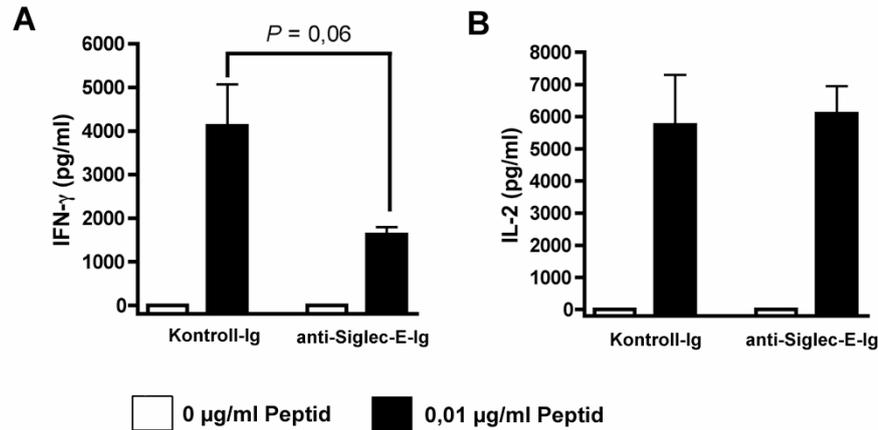
### 3.14 Die Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen beeinflusst die T-Zell-Aktivierung

Dendritische Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei dem Auslösen einer T-Zell-vermittelten Immunantwort. Sie wirken als Antigenpräsentierende Zellen und können so die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen auslösen. Darüber hinaus sezernieren sie bestimmte Cytokine, welche die funktionelle Differenzierung von T-Zellen beeinflussen und die adaptive Immunantwort in eine bestimmte Richtung lenken.

Für die protektive Immunantwort gegen *T. cruzi* ist es notwendig, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und T<sub>H</sub>1-Zellen aktiviert werden. Diese T-Zellen werden durch IL-12 aktiviert und sezernieren daraufhin INF- $\gamma$ , welches wiederum Dendritische Zellen und Makrophagen dazu aktiviert, aufgenommene Parasiten zu töten.

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Ligation von Siglec-E die IL-12-Sekretion von Dendritischen Zellen beeinflusst. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung hat. Hierzu wurden Dendritische Zellen mit den anti-Siglec-E-beschichteten Dynabeads und den Kontroll-Dynabeads inkubiert und anschließend als Antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. Es wurden T-Zell-Rezeptor-transgene T-Zellen aus der Milz einer OT-1 Maus aufgereinigt und zu den Dendritischen Zellen gegeben. Zusätzlich wurde das spezifische Peptid SIINFEKL hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde die T-Zell-Aktivierung anhand der Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  im Überstand bestimmt.

Abbildung 3.22 zeigt, dass die Siglec-E-Ligation auf Dendritischen Zellen die T-Zell-Aktivierung beeinflusst. Es zeigte sich eine starke Abnahme der IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Zellen (Abbildung 3.22A), während die IL-2-Produktion nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3.22B).



### Abbildung 3.22: Die Siglec-E-Ligation auf Dendritischen Zellen beeinflusst die T-Zell-Aktivierung

Knochenmark-generierte Dendritische Zellen wurden mit Dynabeads im Verhältnis 1:5 für 3 Stunden inkubiert. OT-1 T-Zell-Rezeptor-transgene T-Zellen und das spezifische Peptid SIINFEKL wurden zugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf IFN- $\gamma$  (A) und IL-2 (B) Produktion durch indirekten Sandwich-ELISA untersucht. Die Ligation von Siglec-E beeinflusst die T-Zell-Aktivierung und führt zu einer Abnahme der IFN- $\gamma$ -Produktion. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen mit dem murinen Molekül Siglec-E interagiert, während die Interaktion von Siglec-E mit dem nicht-pathogenen *T. cruzi* Stamm Tehuantepec schwächer ist. Diese unterschiedliche Interaktion lässt sich durch die unterschiedliche TS-Aktivität der beiden Stämme erklären: Der Tulahuen Stamm hat eine größere TS-Aktivität als der Tehuantepec-Stamm und trägt daher höhere Mengen an  $\alpha$ 2-3 verknüpfter Sialinsäure auf der Oberfläche, welche von Siglec-E erkannt wird. Die Bindung von *T. cruzi* an Siglec-E auf Zielzellen führt nicht zu einer erleichterten Zellinvasion, moduliert aber die Funktion von Zellen des Immunsystems. Es zeigte sich, dass die Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen inhibiert. Darüber hinaus beeinflusst die Siglec-E-Ligation die T-Zell-Aktivierung und führt zu einer geringeren INF- $\gamma$ -Produktion.

## 4 Diskussion

*T. cruzi* ist der Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit, an der zur Zeit ca. 18 Millionen Menschen leiden. Diese chronische Infektionserkrankung ist durch eine lebenslange Persistenz der Parasiten im Wirt charakterisiert, die zu erheblichen Organschädigungen und letztendlich zum Tode des Patienten führen.

Obwohl die Infektion mit *T. cruzi* anfangs eine starke Aktivierung des Immunsystems hervorruft, reichen die Immunantworten des Wirtes in der Regel nicht aus, um den Körper vollständig von den Parasiten zu befreien. So tritt nach einer anfänglichen polyklonalen Aktivierung von T- und B-Lymphozyten (Minoprio et al., 1989) sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen eine Immunsuppression auf, bei der Immunantworten gegen Mitogene sowie Parasiten-spezifische Antigene unterdrückt werden (Kierszenbaum, 1982; Cetron et al., 1993). Diese Immunsuppression begünstigt die Verbreitung der Parasiten im Wirt und die lebenslange Persistenz der Erreger in Organen. Sowohl die Art der an der Immunsuppression teilnehmenden Zellen, als auch die verantwortlichen Mechanismen sind bislang nicht eindeutig geklärt und Gegenstand vieler Untersuchungen. So wurden  $\alpha\beta$  T-Zellen (Tarleton, 1988; Lopes und DosReis, 1994),  $\gamma\delta$  T-Zellen (Cardillo et al., 1998) und adhärenz Makrophagen-ähnliche Zellen (Kierszenbaum, 1982; Motran et al., 1996) als Suppressor-Zellen diskutiert. Als möglicher Mechanismus wurde eine verminderte IL-2- (Harel-Bellan et al., 1985; Tarleton, 1988) und IL-2-Rezeptor-Expression (Abrahamsohn und Coffman, 1995; Nunes et al., 1998; Martins et al., 1998) postuliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *T. cruzi* die LPS-induzierte Reifung von humanen Dendritischen Zellen inhibieren kann, was sich in einer Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-I und CD40 und auch in der reduzierten Sekretion der Cytokine IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-6 zeigte (Van Overtvelt et al., 1999; Van Overtvelt et al., 2002). Eine derartige Modulation der Funktion von Antigenpräsentierenden Zellen wurde auch bei anderen Pathogenen beschrieben und stellt einen wirksamen Mechanismus dar, mit dem sich Parasiten vor Angriffen des Immunsystems schützen. Beispielsweise zeigen von *Leishmania major* infizierte Makrophagen eine verminderte Kapazität zur Antigenpräsentation (Fruth et al., 1993), wodurch das Einleiten von T-Zell-vermittelten Immunantworten inhibiert wird.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Sialinsäuren auf der Oberfläche der Trypanosomen einen Beitrag zur Immunsuppression leisten. Sialinsäuren werden generell von Deuterostomia (Vertebraten und höhere Invertebraten) exprimiert (Schauer, 2000; Angata und Varki, 2002). Interessanterweise sind die wenigen Nicht-Deuterostomia, die Sialinsäure

tragen, mikrobielle Pathogene, welche Vertebraten infizieren (Vimr et al., 2004). Einige Pathogene, wie *Escherichia coli* K1, können Sialinsäuren *de novo* synthetisieren (Dozois und Curtiss, 1999). Andere Pathogene, darunter *T. cruzi* (Previato et al., 1985) und *Neisseria gonorrhoeae* (Parsons et al., 1988), besitzen die Fähigkeit, Sialinsäuren vom Wirt aufzunehmen. Diese Sialinsäuren scheinen für die Infektiosität der Mikroorganismen verantwortlich zu sein, indem sie die Pathogene durch Maskierung von antigenen Determinanten vor Erkennung durch das Wirtsimmunsystem schützen. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass einige sialylierte Pathogene direkt mit Lektinen des Wirtsimmunsystems interagieren und so das Immunsystem modulieren. Beispielsweise binden sialylierte Strukturen von *N. gonorrhoeae* an das komplementregulatorische Protein Faktor H und können dadurch die alternative Komplementaktivierung inhibieren (Ram et al., 1998).

*T. cruzi* exprimiert ein einzigartiges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS), welches Sialinsäuren von Wirtszellen abspaltet und diese auf Mucin-artige Moleküle auf der Oberfläche von *T. cruzi* überträgt (Colli, 1993; Schenkman et al., 1994; Wilson et al., 2000; Frasch, 2000; Buschiazzo et al., 2002). Die Sialinsäuren scheinen wichtig für das Überleben im Säugetierwirt zu sein und eine entscheidende Rolle bei der Immunmodulation zu spielen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sialylierte Liganden die Bindung von lytischen human anti-Galaktosyl Antikörpern verhindern (Pereira-Chioccola et al., 2000). Interessanterweise korreliert die TS-Aktivität und damit auch der Sialinsäuregehalt auf der Oberfläche der Parasiten mit der Infektiosität verschiedener *T. cruzi*-Isolate (Risso et al., 2004).

*T. cruzi* wird in zwei phylogenetische Hauptgruppen eingeteilt, die mit *T. cruzi* I und *T. cruzi* II bezeichnet werden (Souto et al., 1996; Zingales et al., 1999). *T. cruzi* I Stämme gehören dem sylvatischen Infektionszyklus an und sind eher an Beuteltiere adaptiert. In Menschen verursachen diese Stämme keine Parasitämie. *T. cruzi* II Stämme sind für Menschen und domestizierte Tiere hoch infektiös und kommen somit im domestischen Transmissionszyklus vor. Sie erreichen hohe Parasitämien, können lange persistieren und verursachen die schweren Symptome der Chagas-Krankheit. Die TS ist der erste beschriebene Virulenzfaktor, der sich zwischen *T. cruzi* I und *T. cruzi* II Stämmen unterscheidet (Risso et al., 2004). *T. cruzi* II Stämme exprimieren und sezernieren höhere Mengen an TS als *T. cruzi* I Stämme und haben somit auch einen höheren Sialinsäuregehalt auf ihrer Oberfläche. In dieser Arbeit wurde jeweils ein prototypischer Stamm aus der *T. cruzi* I bzw. der *T. cruzi* II Gruppe verwendet. Der Tulahuen-Stamm (*T. cruzi* II) war in einem Mausmodell *in vivo* hoch infektiös, während der Tehuantepec-Stamm (*T. cruzi* I) in Mäusen keine Parasitämie verursachte. Des Weiteren

konnte hier bestätigt werden, dass der Tulahuen-Stamm eine höhere TS-Aktivität und einen höheren Sialinsäuregehalt aufweist als der Tehuantepec Stamm. Daher konnten die beiden Stämme als Modell für nachfolgende Untersuchungen herangezogen werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *T. cruzi* über eine direkte Sialinsäure-vermittelte Bindung an inhibitorische Rezeptoren auf Immunzellen das Immunsystem modulieren kann. Der hier untersuchte Rezeptor ist das murine Molekül Siglec-E, ein Mitglied der Siglec-Familie. Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) sind Sialinsäure-bindende Lektine, die auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden (Varki und Angata, 2006; Crocker, Paulson und Varki, 2007). Sie wurden aufgrund der Anwesenheit von inhibierenden Signalmotiven in ihren cytoplasmatischen Domänen als inhibitorische Moleküle beschrieben. Auch konnte bei einigen Mitgliedern eine Funktion bei der Endozytose festgestellt werden (Varki und Angata, 2006; Crocker, Paulson und Varki, 2007).

Es gibt mehrere Berichte, in denen beschrieben wird, dass Siglecs mit sialylierten Pathogenen interagieren. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass das humane Siglec-1 mit HIV-1 (Rempel et al., 2008) und das humane Siglec-9 mit Gruppe B Streptokokken (Carlin et al., 2007) interagiert. Des Weiteren wurde eine Interaktion von Sialoadhesin-positiven murinen Makrophagen und *T. cruzi* nachgewiesen (Monteiro et al., 2005). Die genaue Funktion dieser Interaktionen ist bislang unbekannt und es wird diskutiert, ob die Siglec-Pathogen-Interaktion eher dem Wirt oder dem Pathogen nützt. So wäre z.B. vorstellbar, dass Phagozyten das gebundene Pathogen über Siglecs endozytotisch aufnehmen, intrazellulär abbauen und so eliminieren. Auch wäre über diesen Weg eine vermehrte Präsentation pathogener Peptide über MHC möglich, wodurch eine T-Zell-Antwort induziert wird. Somit wäre die Bindung von Siglecs an sialylierte Pathogene vorteilhaft für den Wirt. Auf der anderen Seite könnte eine Siglec-vermittelte Zellinvasion auch dem Pathogen nützen, wenn es sich dabei um einen obligat intrazellulären Krankheitserreger handelt. Neben der erleichterten Zellinvasion ist es auch möglich, dass Pathogene über eine Siglec-Interaktion das Immunsystem modulieren. *In vitro* konnte bisher gezeigt werden, dass das Engagement verschiedener Siglecs über quervernetzende Antikörper einen inhibierenden Effekt auf Immunzellen hat. So konnte z.B. die Proliferation und die Cytokinproduktion von Makrophagen durch anti-CD33 gehemmt werden (Lajaunias et al., 2005). Darüber hinaus konnte durch anti-Siglec-8 und anti-Siglec-9 eine Apoptose von Eosinophilen bzw. Neutrophilen erzielt werden (Nutku et al., 2003; von Gunten et al., 2005). Derartige immunsupprimierende Effekte wären für ein Pathogen von Vorteil.

## 4.1 Die Interaktion von *T. cruzi* mit Siglec-E

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *T. cruzi* direkt mit dem inhibitorischen Rezeptor Siglec-E interagiert und ob sich die Siglec-E-Bindung zwischen dem pathogenen Tulahuen-Stamm und dem nicht-pathogenen Tehuantepec-Stamm unterscheidet.

Trypanosomen gelangen nach dem Biss der Raubwanze über die infektiösen Fäzes direkt in die Blutbahn des Menschen und werden hier und in den regionalen Lymphknoten von professionell phagozytierenden Zellen aufgenommen. In einem *in vitro*-Infektionsmodell konnten wir bestätigen, dass *T. cruzi* im peripheren Blut als erstes mit Neutrophilen und Makrophagen interagiert, jedoch weder B- noch T-Lymphozyten infiziert. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen aus der Familie der Siglecs das murine Molekül Siglec-E gewählt, da es auf den phagozytierenden Zellen exprimiert wird, mit denen *T. cruzi* im Blut interagiert. Diese Zellen sind darüber hinaus primär an der Ausbildung einer protektiven Immunantwort gegen *T. cruzi* beteiligt.

Zur Untersuchung der Interaktion wurde ein Siglec-E-Fc Fusionsmolekül generiert, welches aus dem extrazellulären Teil von Siglec-E und dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers besteht. Mit Hilfe dieses Fusionsmoleküls konnte sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch im Fluoreszenzmikroskop festgestellt werden, dass Siglec-E mit extrazellulären Trypanosomen interagiert. Diese Interaktion war Sialinsäure-abhängig, da die Bindung nach Neuraminidase-Behandlung und nach Laktose-Behandlung der Trypanosomen abnahm. Beide Behandlungen führen zur Desialylierung der Trypanosomen. Die Neuraminidase entfernt enzymatisch die Sialinsäuren. Bei der Laktose-Behandlung wird den Trypanosomen Laktose im Überschuss zugegeben. Die TS der Trypanosomen spaltet Sialinsäuren von der eigenen Oberfläche ab und überträgt diese auf die Laktose.

Interessanterweise konnte hier festgestellt werden, dass sich die Siglec-E Bindung zwischen *T. cruzi* I Parasiten und *T. cruzi* II Parasiten unterschied. Der pathogene *T. cruzi* II Stamm Tulahuen interagiert stark mit dem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül, während die Bindung von Siglec-E-Fc an den nicht-pathogenen *T. cruzi* I Stamm Tehuantepec schwächer war. Dies lässt sich leicht mit der unterschiedlichen TS-Aktivität der Stämme erklären. In einem Hämagglutinintest wurde demonstriert, dass der Tulahuen-Stamm eine höhere TS-Aktivität besitzt als der Tehuantepec-Stamm. Die TS überträgt spezifisch  $\alpha 2-3$  verbundene Sialinsäuren. In Übereinstimmung hiermit zeigte eine Lektin-Färbung, dass Parasiten des Tulahuen-Stammes eine größere Menge an  $\alpha 2-3$  verbundenen Sialinsäuren auf ihrer

Oberfläche tragen. Hingegen wurde ein höherer Gehalt an nicht-sialylierten Kohlenhydraten auf der Oberfläche von Parasiten des Tehuantepec-Stammes gefunden.

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül nur an bestimmte Bereiche auf der Trypanosomen-Membran bindet. Es kann hier vermutet werden, dass besonders der Bereich der Geißeltasche von Siglec-E-Fc angefärbt wird. Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass *T. cruzi* im Bereich der Geißeltasche Vesikel abschnürt, welche zum großen Teil aus dem Enzym TS bestehen (Igor C. Almeida, persönliche Mitteilung). Somit kann angenommen werden, dass diese Vesikel sialyliert sind und mit Siglec-E-Fc interagieren. Diese Vesikel sind bedeutende Virulenzfaktoren und haben unter anderem das Potential, die Zellinvasion von *T. cruzi* zu erhöhen und darüber hinaus Immunantworten zu modulieren. Es wäre zukünftig interessant zu untersuchen, ob isolierte Vesikel ebenfalls mit Siglec-E interagieren. Da hier nicht fixierte Trypanosomen verwendet wurden, könnte aber auch eine Klusterbildung, ein so genanntes „capping“, für die ungleichmäßige Färbung verantwortlich sein.

Eine weitere entscheidende Beobachtung war, dass das Siglec-E-Fc Fusionsmolekül mit Trypanosomen interagiert, ohne vorher vorkomplexiert worden zu sein. Dies stand im Gegensatz zur Färbung von humanen Erythrozyten mit Siglec-E-Fc, die als Kontrolle für die Funktionalität des Fusionsmoleküls durchgeführt wurde. Die Erythrozyten wurden hierbei nur von dem Fusionsmolekül gebunden, wenn dieses mit einem anti-Human Antikörper vorkomplexiert worden war. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsstärke von Siglec-E an physiologische Liganden auf Wirtszellen generell niedrig ist. Trypanosomen dagegen scheinen entweder eine höhere Ligandendichte zu besitzen oder aber höher affine Liganden zu exprimieren. Obwohl Siglecs spezifisch terminale Sialinsäurereste binden, ist bekannt, dass die subterminalen Kohlenhydrate die Bindungsspezifität und -affinität beeinflussen (Blixt et al., 2004). Der Unterschied zwischen den Bindungsstärken des Siglec-E-Fc Fusionsmoleküls zu Erythrozyten und Trypanosomen kann somit mit Unterschieden in den subterminalen Zuckerresten erklärt werden. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass bei Trypanosomen über eine post-translationale Modifikation Sulfat-Reste in Glykoproteine eingebaut werden (Acosta et al., 2008). Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass manche Siglecs sulfatierte Kohlenhydratstrukturen mit hoher Affinität binden (Blixt et al., 2004). Es ist also möglich, dass Siglec-E sulfatierte Liganden auf der Trypanosomen-Oberfläche mit hoher Affinität erkennt.

Das Fusionsmolekül wurde weiterhin benutzt, um die Interaktion von Siglec-E mit intrazellulären Stadien von *T. cruzi* zu analysieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass Siglec-E-Fc kurz nach der Zellinvasion mit pathogenen Trypanosomen des Tulahuen-Stammes interagiert. Die Bindung ging aber vollständig verloren, als sich die Trypanosomen in das amastigote Stadium umwandeln und intrazellulär replizieren. So war am Tag 1 und 2 nach der Zellinvasion keine Siglec-E-Bindung zu erkennen. Erst am Tag 3 und 4 nach der Infektion interagiert das Fusionsmolekül wieder mit intrazellulären Trypanosomen des Tulahuen-Stammes. Die Siglec-E-Bindung korrelierte hierbei offensichtlich mit der TS-Aktivität von intrazellulären Stadien. Es wurde bereits beschrieben, dass das Enzym TS von intrazellulären amastigoten Stadien nicht exprimiert wird (Frevert et al., 1992; Abuin et al., 1999), so dass es auch wahrscheinlich ist, dass intrazelluläre amastigote Stadien nicht sialyliert sind und nicht mit Siglec-E-Fc interagieren. Eine TS Expression konnte jedoch sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene kurz nach der Zellinvasion beobachtet werden (Frevert et al., 1992; Abuin et al., 1999), wodurch die Siglec-E-Bindung in der frühen Phase der Infektion zu erklären ist. Es wurde weiterhin beschrieben, dass während der Transformation von Amastigoten zu Trypomastigoten in späten intrazellulären Stadien die TS wieder exprimiert wird (Frevert et al., 1992; Abuin et al., 1999). Die Induktion der TS Aktivität zu diesem Zeitpunkt soll wahrscheinlich sicherstellen, dass die Trypanosomen beim Verlassen der Zellen bereits vollständig sialyliert sind. Interessanterweise konnte bei dem nicht-pathogenen *T. cruzi* Stamm Tehuantepec bei keinem der intrazellulären Stadien eine Bindung von Siglec-E-Fc festgestellt werden, was ebenfalls für die geringere TS-Aktivität dieses Stammes spricht.

Auch bei diesem Versuch ist auffällig, dass nur die intrazellulären Trypanosomen und nicht die infizierten Zellen selbst von dem Siglec-E-Fc Fusionsmolekül angefärbt wurden, da die hier verwendeten Makrophagen ebenfalls Sialinsäure auf der Oberfläche tragen. Jedoch wurde hier wiederum das Fusionsmolekül nicht vorkomplexiert, so dass es wahrscheinlich auch hier nur mit dem höher affinen Liganden auf der Trypanosomen-Oberfläche interagiert und nicht mit den physiologischen Liganden auf den Wirtszellen.

Um die Interaktion zwischen Siglec-E und Trypanosomen auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Siglec-E exprimierende CHO-Zellen generiert. Mit Hilfe dieser Zellen konnte festgestellt werden, dass Siglec-E schnell in die Kontaktzone zwischen den pathogenen Trypanosomen und den Zellen rekrutiert wurde. Eine vergleichbare Rekrutierung wurde kürzlich bei Siglec-9 und Gruppe B Streptokokken beschrieben (Carlin et al., 2007).

Diese Rekrutierung war Sialinsäure-abhängig, da nach Neuraminidase-Behandlung der Trypanosomen keine Akkumulation von Siglec-E festgestellt werden konnte. Der nicht-pathogene Tehuantepec-Stamm konnte im Gegensatz dazu keine Rekrutierung von Siglec-E induzieren.

## 4.2 Untersuchungen zur Funktion der Siglec-E - *T. cruzi* - Interaktion

### 4.2.1 Siglec-E als Rezeptor für die *T. cruzi* Zellinvasion

*T. cruzi* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, da seine Vermehrung im Säugetierwirt ausschließlich intrazellulär stattfindet. Daher ist die Zellinvasion ein entscheidender Prozess im Lebenszyklus von *T. cruzi*.

Kurz nach der Inokulation der Parasiten ins Blut interagiert *T. cruzi* mit phagozytierenden Zellen, die den Parasiten aufnehmen. Später jedoch infiziert *T. cruzi* vor allem nicht-phagozytierende Zellen, wie Muskel- oder Nervenzellen. Hierzu benutzt er den Lysosomen-vermittelten Wundheilungsmechanismus der Wirtszellen, um in die Zellen einzudringen (Rodriguez et al., 1997; Rodriguez et al., 1999; Reddy et al., 2001). Es wurde eine Vielzahl an Oberflächen-Glykoproteinen, sezernierten Proteasen und signalgebenden Molekülen beschrieben, die am Prozess der Zellinvasion teilnehmen (siehe Einleitung). Unter anderem scheint die *Trans*-Sialidase ein entscheidender Faktor für die Zellinvasion und den Übertritt der Parasiten aus der parasitophoren Vakuole in das Cytoplasma zu sein. Die TS-vermittelte Abspaltung der Sialinsäure von Glykokonjugaten der parasitophoren Vakuolen scheint die Zerstörung der Vakuolenmembran durch das Molekül TcTox zu fördern und damit den Eintritt der Parasiten in das Cytoplasma zu erleichtern (Hall et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Siglec-E als phagozytischer Rezeptor die Zellinvasion von *T. cruzi* fördert. Dabei wurde zunächst die Infektion von Neutrophilen untersucht, welche Siglec-E exprimieren. Neutrophile wurden *in vitro* mit CMFDA-gefärbten Parasiten des Tulahuen-Stammes infiziert und die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt, da die infizierten Zellen nun eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. In einem Versuchsansatz wurden die neutrophilen Zellen mit einem blockierenden anti-Siglec-E Immuns Serum vorbehandelt, welches an Siglec-E auf den Neutrophilen bindet und so die Bindung zu den Trypanosomen blockiert. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Trypanosomen mit Laktose

vorinkubiert, was zu einer Desialylierung von Trypanosomen führte, so dass die Funktion der Sialinsäuren auf der Parasitenoberfläche untersucht werden konnte. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Blockade von Siglec-E als auch die Entfernung der Sialinsäuren von *T. cruzi* keinen Einfluss auf die Zellinvasion hatte. Somit scheint Siglec-E nicht an der Zellinvasion der Trypanosomen beteiligt zu sein.

In einem weiteren Versuch wurde die Zellinvasion von CHO-Mock-Zellen und CHO-Siglec-E-Zellen miteinander verglichen. Die CHO-Mock-Zellen und die CHO-Siglec-E-Zellen wurden *in vitro* mit CMFDA-gefärbten Parasiten sowohl des Tulahuen-Stammes als auch des Tehuantepec-Stammes infiziert und die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass die Zellinvasion von Trypanosomen nicht durch die Expression von Siglec-E beeinflusst wurde. Die Infektion von CHO-Siglec-E-Zellen durch den pathogenen Tulahuen-Stamm war sogar geringer als die der CHO-Mock-Zellen. Wie vorher bereits beschrieben, war bei den CHO-Siglec-E-Zellen eine starke Akkumulation von Siglec-E in der Kontaktzone zwischen den Tulahuen-Parasiten und den Zellen zu beobachten. Die sehr hohe Expression von Siglec-E auf diesen Zellen und die starke Akkumulation von Siglec-E interferierten hier wahrscheinlich mit dem normalen Mechanismus der Zellinvasion.

Obwohl also einige Siglecs als endozytotische Rezeptoren fungieren und bei der Phagozytose von Pathogenen eine Rolle spielen, konnte hier demonstriert werden, dass Siglec-E kein primärer Rezeptor für die Zellinvasion von Trypanosomen ist. *T. cruzi* infiziert im Wirt eine Vielzahl von Zellarten, die nicht hämatopoetischen Ursprungs sind und somit auch keine Siglecs exprimieren. Somit ist es ohnehin unwahrscheinlich, dass Siglec-E eine dominante Rolle in dem Prozess der Zellinvasion spielt.

Sehr bedeutend war hingegen der Befund, dass Parasiten des nicht-pathogenen Tehuantepec-Stammes die CHO-Zellen mit der gleichen Infektionsrate infizierten wie die pathogenen Tulahuen-Parasiten. Dies bestätigt einerseits, dass die Siglec-E-Bindung nicht primär für die Zellinvasion verantwortlich ist. Wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass die unterschiedliche Pathogenität der Parasiten nicht auf eine unterschiedliche Fähigkeit zur Zellinvasion beruht. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass die beiden Stämme auf unterschiedliche Weise das Immunsystem modulieren und dadurch unterschiedlich infektiös sind.

#### 4.2.2 Immunmodulation durch Siglec-E

Die in der Literatur beschriebene unterschiedliche Pathogenität von *T. cruzi* I und *T. cruzi* II Stämmen konnte im Labor durch ein Mausmodell der Chagas-Krankheit bestätigt werden: Während der Tulahuen-Stamm hoch infektiös war, verursachte der Tehuantepec-Stamm keine Parasitämie in C57BL/6 Mäusen. *In vitro* konnte allerdings gezeigt werden, dass dieser Unterschied in der Infektiosität nicht auf eine unterschiedliche Fähigkeit zur Zellinvasion beruhte. Aus diesem Grund wurde als nächstes untersucht, ob die beiden *T. cruzi* Stämme unterschiedlich stark das Immunsystem modulieren können.

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion protektiver Immunantworten gegen *T. cruzi*. Kurz nach der *T. cruzi* Invasion werden Dendritische Zellen über TLR-2 aktiviert und sezernieren pro-inflammatorische Cytokine (Campos et al., 2001). Das Cytokin IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen, die daraufhin zur IFN- $\gamma$ -Synthese angeregt werden (Frosch et al., 1996; Aliberti et al., 1996; Meyer zum Büschenfelde, 1997). IFN- $\gamma$  aktiviert wiederum Dendritische Zellen und Makrophagen dazu, aufgenommene Trypanosomen zu töten (Torrìco et al., 1991; Golden und Tarleton, 1991; Silva et al., 1992; Hölscher et al., 1998; Säftel et al., 2001; Lieke et al., 2004). Da Dendritische Zellen kritisch für die Induktion von Immunantworten sind, haben viele Pathogene wie Mykobakterien (Saha et al., 1994), Listerien oder Leishmanien (Kaye et al., 1994; Saha et al., 1995) verschiedenste Strategien entwickelt, um die Funktion von Dendritischen Zellen zu modulieren. Daher wäre es naheliegend anzunehmen, dass auch *T. cruzi* Mechanismen entwickelt hat, welche die Funktion von Dendritischen Zellen modulieren.

Es sollte hier der Einfluss einer direkten Wechselwirkung zwischen Kohlenhydratstrukturen auf der Trypanosomen-Oberfläche und Dendritischen Zellen untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Trypanosomen hitzeinaktiviert, wodurch die Kohlenhydratstruktur intakt blieb, die Proteine jedoch denaturiert wurden. Die Dendritischen Zellen wurden mit Trypanosomen inkubiert und mit LPS stimuliert. Dabei konnte in der Tat ein unterschiedlicher Einfluss der beiden Stämme auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen festgestellt werden. Der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen hatte einen supprimierenden Effekt auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen. Besonders die Produktion des Cytokins IL-12 wurde durch den Tulahuen-Stamm supprimiert, was sich sowohl bei der Sekretion der Untereinheit IL-12p40, als auch bei der Produktion der

biologisch aktiven Form IL-12p70 zeigte. Der Einfluss des Tehuantepec-Stammes auf die Cytokinproduktion war hingegen weniger stark ausgeprägt.

Zum Einfluss von *T. cruzi* auf Antigenpräsentierende Zellen gibt es in der Literatur zahlreiche, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Die Ergebnisse scheinen dabei grundsätzlich vom eingesetzten *T. cruzi* Stamm als auch von den betrachteten Zellen abzuhängen. Van Overtvelt et al. haben in diesem Zusammenhang veröffentlicht, dass die LPS-induzierte Reifung von humanen Dendritischen Zellen durch eine Infektion mit dem *T. cruzi* Stamm Tehuantepec stark beeinträchtigt wird (Van Overtvelt et al., 2002). Der Tehuantepec-Stamm inhibierte dabei die LPS-induzierte Sekretion der Cytokine IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie die Expression der Moleküle MHC-I und CD40. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen, scheint hier jedoch ein anderer Mechanismus der Immunsuppression vorzuliegen, da die Inhibition durch lösliche Faktoren vermittelt wurde.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit humanen Zellen konnte bei murinen Makrophagen kein Einfluss von *T. cruzi* auf die MHC-I-Expression beobachtet werden (Buckner et al., 1997). Andere Veröffentlichungen zeigen sogar, dass Antigenpräsentierende Zellen durch Infektionen mit *T. cruzi* aktiviert werden und costimulierende Moleküle verstärkt exprimieren (Frosch et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass der Tulahuen-Stamm die Produktion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 induzieren kann. Anti-inflammatorische Cytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  können generell T-Zell-Antworten unterdrücken (Akdis und Blaser, 2001; Moustakas et al., 2002). Auch in einigen Mausmodellen der *T. cruzi*-Infektion wurde IL-10 mit einer verstärkten Suszeptibilität assoziiert. Darüber hinaus erhöht die Gabe von anti-IL-10 Antikörpern die Resistenz von suszeptiblen Mäusen (Silva et al., 1992; Reed et al., 1994). Daher könnte die Induktion von IL-10 durch den *T. cruzi* Stamm Tulahuen ein weiterer Mechanismus sein, wie der Parasit das Immunsystem moduliert.

Da sich die Stämme in ihrer TS-Aktivität und in ihrem Sialinsäuregehalt unterscheiden ist es möglich, dass sialylierte Strukturen auf der Oberfläche für die unterschiedliche Immunsuppression verantwortlich sind. Da diese sialylierten Strukturen an Siglec-E binden, sollte als nächstes direkt der Effekt einer Siglec-E-Ligation auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen analysiert werden.

Hierzu wurden quervernetzende anti-Siglec-E Antikörper verwendet, welche auf Dynabeads immobilisiert wurden. Diese Dynabeads wurden hier als ein Modell für Trypanosomen mit

einer hohen Dichte an Siglec-E-Liganden auf der Oberfläche verwendet. Im Gegensatz zu löslichen Antikörpern bewirken die auf den Dynabeads immobilisierten Antikörper eine starke Quervernetzung von Siglec-E auf Dendritischen Zellen. Sie wurden eingesetzt, um direkt die Auswirkung der Siglec-E-Ligation auf die Cytokinproduktion von Dendritischen Zellen nach LPS-Stimulation zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Siglec-E-Bindung durch Dynabeads einen ähnlichen supprimierenden Effekt auf die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine hat, wie der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen. Nach Siglec-E-Ligation wurde die LPS-induzierte Sekretion der Cytokine IL-12p40, IL-6 und TNF- $\alpha$  inhibiert. Somit wäre die Siglec-E-Ligation auf Dendritischen Zellen ein möglicher Mechanismus dafür, wie der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine hemmt, während der nicht-pathogene *T. cruzi* Stamm Tehuantepec aufgrund einer schwächeren Siglec-E-Bindung keinen supprimierenden Effekt auf Immunzellen hat.

Dendritische Zellen spielen eine essentielle Rolle bei der Induktion von T-Zell-Antworten, indem sie über Antigen-präsentierende und costimulierende Moleküle naive T-Zellen aktivieren. Darüber hinaus beeinflussen die von Dendritischen Zellen sezernierten Cytokine die funktionelle Differenzierung von T-Zellen. IL-12 stimuliert u.a. die Entwicklung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu cytotoxischen T-Zellen (Chouaib et al., 1994) sowie die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Effektorzellen (Trinchieri, 1994; Windhagen et al., 1996; Mehrotra et al., 1998). In einer *T. cruzi* Infektion ist die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen essentiell, da die Parasiten intrazellulär im Cytoplasma vorliegen und die infizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen eliminiert werden müssen. Gerade in der akuten Phase der Infektion ist jedoch auch eine Induktion von T<sub>H</sub>1-Zellen entscheidend, da diese Zellen über IFN- $\gamma$  Makrophagen dazu aktivieren können, aufgenommene Parasiten zu töten. Die Bedeutung von T-Zellen während einer *T. cruzi* Infektion konnte unter Verwendung von infizierten MHC-I- und MHC-II-defizienten Mäusen gezeigt werden, welche keine CD8<sup>+</sup>-, bzw. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen besitzen und suszeptibel für eine *T. cruzi* Infektion sind (Rottenberg et al., 1993; Tarleton et al., 1996). Daher könnte die Aktivierung von T-Zellen durch Dendritische Zellen ein weiterer Mechanismus sein, in den *T. cruzi* modulierend eingreifen könnte.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Siglec-E-Ligation auf Dendritischen Zellen einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung hat. Hierzu wurden Dendritische Zellen mit Dynabeads

inkubiert und anschließend als Antigenpräsentierende Zellen eingesetzt, um T-Zellen zu aktivieren. Es wurden hier CD8<sup>+</sup>-T-Zellen einer T-Zell-Rezeptor-transgenen OT-1 Maus verwendet, welche spezifisch das Peptidfragment SIINFEKL aus dem Ova-Protein erkennen. Die Dendritischen Zellen wurden mit den isolierten T-Zellen inkubiert und das SIINFEKL-Peptid zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Konzentration der Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ , welche von aktivierten T-Zellen sezerniert werden, im Überstand gemessen. Es zeigte sich, dass die Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung hat, die sich in einer verminderten IFN- $\gamma$ -Produktion widerspiegelte. Die IL-2 Produktion wurde hingegen nicht beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der pathogene *T. cruzi* Tulahuen Stamm aufgrund seines hohen Sialinsäuregehaltes mit dem murinen Molekül Siglec-E interagiert, während die Bindung von Siglec-E an den nicht-pathogenen *T. cruzi* Stamm Tehuantepec schwächer war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Ligation von Siglec-E auf Dendritischen Zellen die Cytokinproduktion inhibiert.

Damit ist *T. cruzi* einer von mehreren Krankheitserregern, der sialylierte Strukturen für seine Infektion benötigt. Das Vorkommen von sialylierten Krankheitserregern hat weit reichende Folgen und scheint eine treibende Kraft für die schnelle Evolution der CD33-verwandten Siglecs zu sein. CD33-verwandte Siglecs stehen unter evolutionärem Druck und müssen sich schnell entwickeln, um der Interaktion mit sialylierten Pathogenen und der damit einhergehenden Immunmodulation zu entgehen. Auf der anderen Seite gibt es sehr viele Pathogene, die selbst nicht sialyliert sind, jedoch mit Sialinsäuren auf den Wirtszellen interagieren. Beispielsweise bindet das humane Influenzavirus A über das Lektin Hämagglutinin spezifisch an Neu5Ac auf Wirtszellen und kann so die Wirtszelle infizieren (Suzuki, 2005). Die Sialinsäuren des Wirtes müssten sich schnell entwickeln, um nicht von pathogenen Krankheitserregern als Rezeptor für die Zellinvasion benutzt zu werden. Da Siglecs prinzipiell endogene Liganden binden, müssten sich die CD33-verwandten Siglecs auch deshalb weiterentwickeln, um mit der schnellen Evolution der Sialinsäuren mitzuhalten.

## 5 Zusammenfassung

Der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi* ist der Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit, an der zur Zeit ca. 18 Millionen Menschen leiden. Diese chronische Infektionserkrankung ist durch eine lebenslange Persistenz der Parasiten im Wirt charakterisiert, die zu erheblichen Organschädigungen und letztendlich zum Tode des Patienten führen.

In der akuten Phase der Infektion induziert *T. cruzi* eine starke Suppression des Immunsystems, wodurch sich die Parasiten im Wirt verbreiten und die Wirtszellen infizieren können. Bei dieser Immunsuppression spielen Sialinsäuren auf der Parasitenoberfläche eine entscheidende Rolle, wobei der genaue Mechanismus der Immunsuppression bislang ungeklärt ist. Die Sialinsäuren können von *T. cruzi* nicht *de novo* synthetisiert werden, sondern werden von einem einzigartigen Enzym, der *Trans*-Sialidase (TS), von Wirtszellen auf die Parasitenoberfläche übertragen. Die Bedeutung dieser Sialylierung wird durch die enorme Anzahl der Gene deutlich, die für die TS codieren. So machen die 1430 TS-codierenden Gene ca. 1% des gesamten *T. cruzi* Genoms aus. Darüber hinaus scheint die TS-Aktivität verschiedener *T. cruzi* Isolate mit der Pathogenität dieser Parasiten zu korrelieren.

In dieser Arbeit wurden zwei *T. cruzi* Stämme verwendet, bei denen die Korrelation zwischen TS-Aktivität und Infektiosität bestätigt werden konnte. Der *T. cruzi* Stamm Tulahuen ist aufgrund einer hohen TS-Aktivität stark sialyliert und in Mäusen hoch infektiös. Der *T. cruzi* Stamm Tehuantepec hingegen, der aufgrund einer geringen TS-Aktivität nur geringe Mengen an Sialinsäure auf der Oberfläche trägt, kann in Mäusen keine Infektion etablieren. Die unterschiedliche Pathogenität dieser Stämme konnte *in vitro* eingehender untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Stämme das gleiche Potential zur Zellinvasion haben, jedoch unterschiedlich stark die Funktion Dendritischer Zellen modulieren können. Der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen konnte dabei die Produktion proinflammatorischer Cytokine supprimieren, wozu der nicht-pathogene *T. cruzi* Stamm Tehuantepec nicht in der Lage war.

Da die TS-Aktivität also mit der Fähigkeit zur Immunsuppression korrelierte, sollte in dieser Arbeit die Bedeutung der Sialinsäuren bei der Modulation von Immunfunktionen eingehender untersucht werden. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sialylierte Strukturen auf der *T. cruzi* Oberfläche mit dem inhibitorischen murinen Molekül Siglec-E interagieren, welches unter anderem auf Dendritischen Zellen exprimiert wird. Der pathogene *T. cruzi*

Stamm Tulahuen interagiert dabei stark mit Siglec-E, während die Bindung von Siglec-E an den nicht-pathogenen *T. cruzi* Stamm Tehuantepec schwächer war.

Siglec-E gehört zur Familie der Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins). Diese Sialinsäure-bindenden Proteine werden von Zellen des Immunsystems exprimiert und können über intrazelluläre Signalmotive angeborene und erworbene Immunantworten supprimieren. Anhand quervernetzender anti-Siglec-E Antikörper wurde hier demonstriert, dass eine Siglec-E-Ligation auf Dendritischen Zellen die Cytokinproduktion und die Aktivierung von T-Zellen inhibiert. Besonders die Produktion der Cytokine IL-12 und IFN- $\gamma$ , welche für eine protektive Immunantwort gegen *T. cruzi* essentiell sind, wurde gehemmt. Eine Siglec-E-Ligation durch den pathogenen *T. cruzi* Stamm Tulahuen wäre somit ein möglicher Mechanismus für die Immunsuppression und liefert gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die Korrelation zwischen TS-Aktivität und Infektiosität.

## 6 Literatur

- Abrahamsohn, I.A., Coffman, R.L. (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **155**:3955-63
- Abuin, G., Freitas-Junior, L.H.G., Colli, W., Alves, M.J.M., Schenkman, S. (1999) Expression of *trans*-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J Biol Chem* **274**:13041-7
- Acosta, D.M., Arnaiz, M.R., Esteva, M.I., Barboza, M., Stivale, D., Orlando, U.D., Torres, S., Laucella, S.A., Couto, A.S., Duschak, V.G. (2008) Sulfates are main targets of immune responses to cruzipain and are involved in heart damage in BALB/c immunized mice. *Int Immunol* **20**:461-70
- Akdis, C.A., Blaser, K. (2001) Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* **103**:131-6
- Aliberti, J.C., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Gazzinelli, R.T., Vieira, L.Q., Silva, J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* **64**:1961-7
- Andrews, N.W., Whitlow, M.B. (1989) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol* **33**:249-56
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., Griffiths, G. (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**:1277-87
- Angata, T., Kerr, S.C., Greaves, D.R., Varki, N.M., Crocker, P.R., Varki, A. (2002) Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J Biol Chem* **277**:24466-74

- Angata, T., Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and the related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**:439-70
- Angata, T., Margulies, E.H., Green, E.D., Varki, A. (2004) Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:13251-6
- Blixt, O., Collins, B.E., Van Den Nieuwenhof, I.M., Crocker, P.R., Paulson, J.C. (2003) Sialoside specificity of the Siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **278**:31007-19
- Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M.E., Alvarez, R., Bryan, M.C., Fazio, F., Calarese, D., Stevens, J., et al. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:17033-8
- Bonifacino, J.S., Traub, M.L. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**:395-447
- Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Sjöberg, E.R., Juneja, L.R., Crocker, P.R., Varki, N., Varki, A. (2000) Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution – implications for sialic acid recognition by siglecs. *J Biol Chem* **275**:8633-40
- Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Varki, A. (2000) New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. *J Biol Chem* **275**:8625-32
- Buckner, F.S., Wipke, B.T., Van Voorhis, W.C. (1997) *Trypanosoma cruzi* infection does not impair major histocompatibility complex class I presentation of antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* **27**:2541-8
- Burleigh, B.A., Andrews, N.W. (1995) A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* **270**:5172-80

- Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P., Andrews, N.W. (1997) A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. *J Cell Biol* **136**:609-20
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M. (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* **5**:419-27
- Buschiazzo, A., Amaya, M.F., Cremona, M.L., Frasch, A.C., Alzari, P.M. (2002) The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. *Mol Cell* **10**:757-68
- Caler, E.V., Vaena, S., Haynes, P.A., Andrews N.W. (1998) Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* **17**:4975-86
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O. et al. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**:416-23
- Cardillo, F., Voltarelli, J.C., Reed, S.G., Silva, J.S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. *Inf Immun* **64**:128-34
- Cardillo, F., Nomizo, A., Mengel, J. (1998) The role of the thymus in modulating gamma delta T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol* **10**:107-16
- Cardillo, F., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C., Russo, M., Garcia, S.B., Mengel J. (2002) NK1.1<sup>+</sup> cells and T cell activation in euthymic and thymectomized C57BL/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* **55**:96-104
- Carlin, A.F., Lewis, A.L., Varki, A., Nizet, V. (2007) Group B streptococcal capsular sialic acids interact with Siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol* **189**:1231-7

- Cetron, M.S., Basilio, F.P., Moraes A.P., Sousa A.Q., Paes J.N., Kahn, S.J., Wener M.H., Van Voorhis W.C. (1993) Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg* **49**:370-82
- Chagas, C. (1909) Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**:159-218.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-9
- Chou, H.H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K.L., Muchmore, E.A., Nelson, D.L., Warren, S.T., Varki, A. (1998) A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad USA* **95**:11751-6
- Chou, H.H., Hayakawa, T., Diaz, S., Krings, M., Indriati, E., Leakey, M., Paabo, S., Satta, Y., Takahata, N., Varki, A. (2002) Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**:11736-41
- Chouaib, S., Chehimi, J., Bani, L., Genetet, N., Turst, T., Trinchieri, G., Mami-Chouaib, F. (1994) Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:12659-63
- Chuencova, M., Pereira, M.E.A. (1995) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, enhancement of virulence of a murine model of Chagas' disease. *J Exp Med* **181**:1693-703
- Colli, W. (1993) Trans-sialidase: A unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* **7**:1257-64

- Collins, B.E., Blixt, O., Bovin, N.V., Dancer, C.P., Chui, D., Marth, J.D., Nitschke, L., Paulson, J.C. (2002) Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knockout mice: novel sialoside probe for murine CD22. *Glycobiology* **12**:563-71
- Collins, B.E., Blixt, O., Han, S., Duong, B., Li, H., Nathan, J.K., Bovin, N., Paulson, J.C. (2006) High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells. *J Immunol* **177**:2994-3003
- Crocker, P.R. (2002) Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Biol* **12**:609-15
- Crocker, P.R. (2005) Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol* **5**:431-7
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., Varki, A. (2007) Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**:255-66
- Cunha-Neto, E., Kalil, J. (1995) Autoimmunity in Chagas' heart disease. *Rev Paul Med* **113**:757-66
- de Titto, E., Araujo, F.G. (1988) Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol* **46**:157-61
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C. (2002) A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* **195**:401-13
- Dozois, C., Curtiss, R. (1999) Pathogenic diversity of *Escherichia coli* K1. *J Ind Microbiol* **2**:271-7
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**:409-15

- Falco, M., Biassoni, R., Bottino, C., Vitale, M., Sivori, S., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1999) Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells. *J Exp Med* **190**:793-801
- Frasch, A.C. (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **16**:282-6
- Frevort, U., Schenkman, S., Nussenzweig, V. (1992) Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **60**:2349-60
- Frosch, S., Kraus, S., Fleischer, B. (1996) *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. *Med Microbiol Immunol* **185**:189-93
- Frosch, S., Kuntzlin, D., Fleischer, B. (1997) Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. *Infect Immun* **65**:971-7
- Fruth, U., Solioz, N., Louis, J.A. (1993) *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* **150**:1857-64
- Girones, N., Rodriguez, C.I., Carrasco-Marin, E., Flores Hernaez, R., Lopez de Rego, J., Fresno, M (2001) Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest* **107**:985-93
- Golden, M.J., Tarleton, R.L. (1991) *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol* **72**:391-402
- Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A., Andrews, N.W. (1992) Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med* **176**: 313-25

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80
- Harel-Bellan, A., Joskowicz, M., Fradelizi, D., Eisen, H. (1985) T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. *Eur J Immunol* **15**:438-42
- Higuchi, M.L. (1997) Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **39**:53-60
- Hölscher, C., Kohler, G., Müller, U., Mossmann, H., Schaub G.A., Brombacher F. (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* **66**:1208-15
- Ikehara, Y., Ikehara, S.K., Paulson, J.C. (2004) Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9. *J Biol Chem* **279**:43117-25
- John, B., Herrin, B.R., Raman, C., Wang, Y.N., Bobbitt, K.R., Brody, B.A., Justement, L.B. (2003) The B cell coreceptor CD22 associates with AP50, a clathrin-coated pit adapter protein, via tyrosine-dependent interaction. *J Immunol* **170**:3534-43
- Kaye, P.M., Rogers, N.J., Curry, A.J., Scott, J.C. (1994) Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *Eur J Immunol* **24**:2850-4
- Kelm, S., Schauer, R., Manuguerra, J.C., Gross, H.J., Crocker, P.R. (1994) Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. *Glycoconj J* **11**:576-85
- Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H.J., Strenge, K., Schauer, R. (1998) Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur J Biochem* **255**:663-72

- Kierszenbaum, F. (1982) Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, non-specific esterase-positive splenic cells. *J Immunol* **129**:2202-5
- Kierszenbaum, F. (1999) Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* **12**:210-23
- Kitzig, F., Martinez-Barriocanal, A., López-Botet, M., Sayós, J. (2002) Cloning of two new splice variants of Siglec-10 and mapping of the interaction between Siglec-10 and SHP-1. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:355-62
- Kumar, S., Tarleton, R.L. (2001) Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **166**:4596-603
- Lajaunias, F., Dayer, J.M., Chizzolini, C. (2005) Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol* **35**:243-52
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5
- Lemischka, I.R., Raulet, D.H., Mulligan, R.C. (1986) Development potential and dynamic behaviour of haematopoietic stem cells. *Cell* **45**:917-27
- Leon, J.S., Engman, D.M. (2001) Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol* **31**:555-61
- Lieke, T., Gräfe, S.E., Klauenberg, U., Fleischer, B., Jacobs, T. (2004) NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun* **72**:6817-25
- Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S.H., Crocker, P.R. (2004) Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocytes-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* **209**:199-207

- Lopes, M.F., DosReis, G.A. (1994) *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: blockade of costimulatory T-cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor-CD3 functioning. *Infect Immun* **62**:1484-8
- Manoel-Caetano, F.S., Silva, A.E. (2007) Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saúde Pública* **23**:2263-74
- Martins, G.A., Cardoso, M.A., Aliberti, J.C., Silva, J.S. (1998) Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett* **63**:113-20
- McCormick, T.S., Rowland, E.C. (1989) *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp Parasitol* **69**:393-401
- Mehrotra, H., Donnelly, R.P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H.S., Furuke, K., Siegel, J.P., Bloom, E.T. (1998) Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* **160**:2637-44
- Mehlhorn, H., Piekarski, G. (2002) *Grundriß der Parasitenkunde*, 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Meyer zum Büschenfelde, C., Cramer, S., Trumpheller, C., Fleischer, B., Frosch, S. (1997) *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin Exp Immunol* **110**:378-85
- Michailowsky, V., Silva N.M., Rocha, C.D., Vieira, L.Q., Lannes-Vieira, J., Gazzinelli, R.T. (2001) Pivotal role of interleukin-12 and interferences gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **159**:1723-33
- Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S., Coutinho, A. (1989) Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* **112**:183-207

- Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Silva, A.R., Medina, D.V., de Oliveira, M.A., Seabra, S.H., de Souza, W., DaMatta, R.A. (2005) Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res* **97**:380-5
- Motran, C., Gruppi, A., Vullo, C.M., Pistoressi-Palencia, M.C., Serra H.M. (1996) Involvement of accessory cells in the *Trypanosoma cruzi*-induced inhibition of the polyclonal response of T lymphocytes. *Parasite Immunol* **18**:43-8
- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal A., Heldin, C.H. (2002) Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* **82**:85-91
- Mucci, J., Hidalgo, A., Mocetti, E., Argiby, P.F., Leguizamón, M.S., Campetella, O. (2002) Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by *trans*-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:3896-901
- Muchmore, E.A., Diaz, S., Varki, A. (1998) A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *Am J Phys Anthropol* **107**:187-98
- Munday, J., Floyd, H., Crocker, P.R. (1999) Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* **66**:705-11
- Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Köhler, G., Lamers, M.C. (1997) CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* **7**:133-143
- Nitschke, L. (2005) The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* **17**:290-7
- Nutku, E., Alzawa, H., Hudson, S.A., Bochner, B.S. (2003) Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood* **101**:5014-20
- Nunes, M.P., Andrade, R.M., Lopes, M.F., DosReis, G.A. (1998) Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol* **160**:1313-9

- O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., Neuberger, M.S. (1999) Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* **189**:1307-13
- Parsons, N.J., Patel, P.V., Tan, E.L., Andrade, J.R., Nairn, C.A., Goldner M., Cole, J.A., Smith, H. (1988) Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid and a low molecular weight factor from human blood cells induce lipopolysaccharide alteration in gonococci when conferring resistance to killing by human serum. *Microb Pathog* **5**:303-9
- Paul, S.P., Taylor, L.S., Stansbury, E.K., McVicar, D.W. (2000) Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* **96**:483-90
- Pereira-Chioccola, V.L., Acosta-Serrano, A., Correia de Almeida, I., Ferguson, M.A., Souto-Padron, T., Rodrigues, M.M. et al. (2000) Mucin-like molecules from a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies. *J Cell Sci* **113**:1299-307
- Previato, J.O., Andrade, A.F., Pessolani, M.C., Mendonca-Previato, L. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol* **16**:85-96
- Prioli, R.P., Mejia, J.S., Aji, T., Aikawa, M., Pereira, M.E.A. (1991) *Trypanosoma cruzi*: localization of neuraminidase on the surface of trypomastigotes. *Trop Med Parasitol* **42**:146-50
- Powell, L.D., Sgroi, D., Sjoberg, E.R., Stamenkovic, I., Varki, A. (1993) Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem* **268**:7019-27

- Ram, S., Sharma A.K., Simpson, S.D., Gulati, S., McQuillen, D.P., Pangburn, M.K., Rice, P.A. (1998) A novel sialic acid binding site on Factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **187**:743-52
- Ravetch, J.V., Lanier, L.L. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* **290**:84-9
- Razi, N., Varki, A. (1998) Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* **95**:7469-74
- Razi, N., Varki, A. (1999) Cryptic sialic acid-binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. *Glycobiology* **9**:1225-34
- Reddy, A., Caler, E.V., Andrews, N.W. (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**:157-69
- Reed, S.G., Brownell, C.E., Russo, D.M., Silva, J.S., Grabstein, K.H., Morrissey, P.J. (1994) IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **153**:3135-40
- Rempel, H., Calosing, C., Sun, B., Pulliam, L. (2008) Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS ONE* **3**:e1967
- Risso, M.G., Garbarino, G.B., Mocetti, E., Campetella, O., González Cappa, S.M., Buscaglia, C.A., Leguizamón, M.S. (2004) Differential expression of a virulence factor, the *trans*-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis* **189**:2250-9
- Rizzo, L.V., Cunha-Neto, E., Teixeira, A.R. (1989) Autoimmunity in Chagas` disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **57**:2640-4
- Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A., Andrews, N.W. (1996) Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* **134**:349-62
- Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J., Andrews, N.W. (1997) Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* **137**:93-104

- Rodriguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C.H., Andrews, N.W. (1999) cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem* **274**:16754-9
- Rottenberg, M., Bakhiet, M., Olsson, T., Kristensson, K., Mak, T., Wigzell, H., Orn, A. (1993) Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun* **61**:5129-33
- Rubin-de-Celis, S.S., Uemura, H., Yoshida, N., Schenkman, S. (2006) Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* **8**:1888-98
- Säftel, M., Fleischer, B., Hoerauf, A. (2001) Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* **69**:2252-9
- Saha, B., Das, G., Vohra, H., Ganguly, N.K., Mishra, G.C. (1994) Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on Mycobacterium-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur J Immunol* **24**:2618-24
- Saha, B., Das, G., Vohra, H., Ganguly, N.K., Mishra, G.C. (1995) Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* **25**:2492-8
- Saiki R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., et al. (2000) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B<sub>2</sub> receptors. *J Exp Med* **192**:1289-1300

- Schauer, R., Reuter, G., Muhlfordt, H., Andrade, A.F., Pereira, M.E. (1983) The occurrence of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**:1053-7
- Schauer, R. (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate J* **17**:485-99
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E., Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol* **48**:299-323
- Sgroi, D., Varki, A., Braesch-Andersen, S., Stamenkovic, I. (1993) CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* **268**:7011-8
- Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mohler, K.M., Anderson, D., Reed, S.G. (1992) Interleukin 10 and IFN- $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* **175**:169-74
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **83**:141-52
- Suzuki, Y. (2005) Sialobiology of influenza: molecular mechanisms of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* **28**:399-408
- Tardieux, I., Webster, P., Ravestrot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Henster, J.E., Andrews N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* **71**:1117-30
- Tarleton, R.L. (1988) *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol* **140**:2769-73
- Tarleton, R.L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas' disease. *Int J Parasitol* **21**:550-4

- Tarleton, R.L. (2003) Chagas' disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol* **19**:447-51
- Tarleton, R.L., Zhang, L. (1999) Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* **15**:94-99
- Tarleton, R.L., Koller, B.H., Latour, A., Postan, M. (1992) Susceptibility of  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* **356**:338-40
- Tarleton, R.L., Grusby, M.J., Postan, M., Glimsher, L.H. (1996) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* **8**:13-22
- Taylor, V.C., Buckley, C.D., Douglas, M., Cody, A.J., Simmons, D.L., Freeman, S.D. (1999) The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem* **274**:11505-12
- Todeschini, A.R., Girard, M.F., Wieruszkeski, J.M., Nunes, M.P., DosReis, G.A., Mendonca-Previato, L., Previato, J.O. (2002) *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. *J Biol Chem* **277**:45962-8
- Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., Nussenzweig, V. (1995) The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology* **110**:547-54
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**:575-81
- Torrico, F., Hereman, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billiau, A., Carlier, Y. (1991) Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **146**:3626-32
- Trinchieri G. (1994) Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* **84**:4008-27
- Ulyanova, T., Blasioli, J., Woodford-Thomas, T.A., Thomas, M.L. (1999) The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* **29**:3440-9

- Ulyanova, T., Shah, D.D., Thomas, M.L. (2001) Molecular cloning of MIS, a myeloid inhibitory siglec, that binds protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem* **276**:14451-8
- Vandekerckhove, F., Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., Tomlinson, S., Kiso, M., Yoshida, M., Hasegawa, A., Nussenzweig, V. (1992) Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology* **2**:541-8
- Van der Merwe, P.A., Crocker, P.R., Vinson, M., Barclay, A.N., Schauer, R., Kelm, S. (1996) Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. *J Biol Chem* **271**:9273-80
- Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., Willems, F., Vrey B. (1999) *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* **67**:4033-40
- Van Overtvelt, L., Andrieu, M., Verhasselt, V., Connan, F., Choppin, J., Vercruyse, V., Goldman, M., Hosmalin, A., Vray, B. (2002) *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* **14**:1135-44
- Varki, A. (2002) Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: mechanisms, consequences and implications for hominid evolution. *Yearbook Phys Anthropol* **44**:54-69
- Varki, A., Angata, T. (2006) Siglecs - the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**:1R-27R
- Vimr, E.R., Lichtensteiger, C. (2002) To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol* **10**:254-7
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M. (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:132-53

- Virgo, P., Denning-Kendall, P.A., Erickson-Miller, C.L., Singha, S., Evely, R., Hows, J.M., Freeman, S.D. (2003) Identification of the CD33-related Siglec receptor, Siglec-5 (CDI170), as a useful marker in both normal myelopoiesis and acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* **123**:420-30
- Vitale, C., Romagnani, C., Puccetti, A., Olive, D., Costello, R., Chiossone, L., Pitto, A., Bacigalupo, A., Moretta, L., Mingari, M.C. (2001) Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:5764-9
- von Gunten, S., Youshefi, S., Seitz, M., Jakob, S.M., Schaffner, T., Seger, R., Takala, J., Villiger, P.M., Simon, H. (2005) Siglec-9 transduces apoptotic and non-apoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood* **106**:1423-31
- Whitney, G., Wang, S.L., Chang, H., Cheng, K.Y., Lu, P., Zhou, X.D., Yang, W.P., McKinnon, M., Longphre, M. (2001) A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signaling properties similar to CD33. *Eur J Biochem* **268**:6083-96
- Wilson, J.C., Kiefel, M.J., Albouz-Abo, S., von Itzstein, M. (2000) Preliminary <sup>1</sup>H NMR investigation of sialic acid transfer by the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* **10**:2791-4
- Windhagen, A., Anderson, D.E., Carrizosa, A., Williams, R.E., Hafler, D.A. (1996) IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. *J Immunol* **157**:1127-31
- WHO (World Health Organisation), Technical Report Series, Control of Chagas' disease, ed. WHO. Publications, Geneva, 2004
- Yoshida, N. (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* **78**:87-111

- Yu, Z., Lai, C.M., Maoui, M., Banville, D., Shen, S.H. (2001) Identification and characterization of S2V, a novel putative siglec that contains two V set Ig-like domains and recruits protein-tyrosine phosphatases SHPs. *J Biol Chem* **276**:23816-24
- Yu, Z., Maoui, M., Wu, L., Banville, D., Shen, S. (2001) mSiglec-E, a novel mouse CD33-related siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) that recruits Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem J* **353**:483-92
- Zhang, J.Q., Biedermann, B., Nitschke, L., Crocker, P.R. (2004) The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *Eur J Immunol* **34**:1175-84
- Zhang, M., Varki, A. (2004) Cell surface sialic acids do not affect primary CD22 interactions with CD45 and sIgM, nor the rate of constitutive CD22 endocytosis. *Glycobiology* **14**:939-49
- Zhang, M., Angata, T., Cho, J.Y., Miller, M., Broide, D.H., Varki, A. (2007) Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood* **109**:4280-7
- Zingales, B., Stolf, B., Souto, R., Fernandes, O., Briones, M. (1999) Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**:159-64