Beteiligung von murinen Natürlichen Killer (NK)-Zellen an der Immunantwort gegen intrazelluläre und extrazelluläre *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von **Thorsten Lieke** Hamburg 2005

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 05. November 2004

Hamburg, den 23. Oktober 2004



Professor Dr. Arno Frühwald Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Trypanosoma cruzi	1
1.2 Das Immunsystem	4
1.3 Natürliche Killer (NK)-Zellen	7
1.4 Die Immunantwort gegen Trypanosoma cruzi	9
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Mausstämme	13
2.1.2 Parasiten	13
2.1.3 Zelllinien	13
2.1.4 Antikörper	13
2.1.5 Primer	14
2.1.6 Geräte	14
2.1.7 Plastik- und Glaswaren	16
2.1.8 Material für molekularbiologische Arbeiten	17
2.1.8.1 Reagenzien	17
2.1.8.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen	17
2.1.9 Material für biochemische Arbeiten	19
2.1.9.1 Reagenzien	19
2.1.9.2 Puffer und verwendete Stammlösungen	20
2.1.10 Material für zellbiologische Arbeiten	22
2.1.10.1 Reagenzien	22
2.1.10.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen	23
2.2 Methoden	27

2.2.1 In vivo-Infektion	27
2.2.1.1 Infektion der Mäuse mit Trypanosoma cruzi	27
2.2.1.2 Bestimmung der Parasitämien	27

2.2.2 Zellbiologische Methoden	28
2.2.2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	28
2.2.2.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen	28
2.2.2.3 Zellzählung	28
2.2.2.4 In vitro Trypanosomen Kulturen	29
2.2.2.4.1 Zellkultur von trypomastigoten Parasiten	29
2.2.2.4.2 Zellkultur von epimastigoten Parasiten	29
2.2.2.5 Gewinnung einer Milzzell-Suspension	29
2.2.2.6 Vorbehandlung der Milzzellen	30
2.2.2.7 Analyse der Aktivierung von NK-Zellen im Chrom-	30
Freisetzungs-Test	
2.2.2.8 Durchfluss-Zytometrie (FACS)	31
2.2.2.8.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für durchfluss-	31
zytometrische Messungen (FACS)	
2.2.2.8.2 Sortieren von fluoreszenz-markierten Zellen	32
2.2.2.9 Messung von CMFDA-markierten Zellen im FACS	32
2.2.2.10 Bestimmung der Parasitenlast einer in vitro-Fibroblasten-Kultu	r 33
2.2.2.11 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	34
2.2.2.12 Quantitativer NO-Nachweis (Griess-Test)	35
2.2.2.13 ELISpot (Enzyme-linked ImmunoSpot)	35
2.2.2.14 Aufreinigung/Depletion von Lymphozyten mit MACS-Beads	36
2.2.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
(SDS-PAGE)	
2.2.2.16 Westernblot	37
2.2.2.17 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	38
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.3.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	4(
2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	4]
2.2.3.4 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	4
2.2.3.5 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription	42
2.2.3.6 Quantitative PCR (TacMan)	42
2.2.4 Statistische Auswertung	44

3. Ergebnisse	45
3.1 Depletion von NK-Zellen <i>in vivo</i>	45
3.1.1 Parasitämieverlauf und Überlebensrate	45
3.1.2 Persistenz in unterschiedlichen Geweben	48
3.2 Die Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre <i>T. cruzi in vitro</i>	10
3.2 Die Aktiviarung von NK Zellen durch eine T. cruzi Infaktion	رب 10
3.2.1 1 Zytotovische Aktivität	رب ۸۵
3.2.1.1 Zytotoxisene Aktivitat	
Includation mit T_{cruzi}	51
3.2.2 Reduktion der intrazellulären Parasitenlast in Fibroblasten durch	53
Milzzellen	55
323 Kontaktunabhängige Aktivität der Milzzellen gegen infizierte	55
Fibroblasten	55
3.2.4 Blockade von IFN-v und Stickstoffmonoxid in der Fibroblasten-Kultur	56
3.2.5 Nachweis der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) in L929	57
Fibroblasten	
3.2.6 Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre <i>T. cruzi</i>	58
3.2.7 Neutralisation von IL-12	60
3.2.8 Induktion von Typ-I-Interferonen	62
3 3 Die Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre <i>T_cruzi</i>	63
3.3.1 Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre Trypanosomen	64
3.3.2 Direkter Kontakte zwischen NK-Zellen und extrazelluläre <i>T. cruzi</i>	66
3.3.3 Etablierung eines Test-Systems zur Untersuchung der	67
Wirkungsmechanismen von NK-Zellen gegen extrazelluläre <i>T. cruzi</i>	
3.3.4 NK-Zellen lysieren extrazelluläre <i>T. cruzi</i>	69
3.3.5 Zeitabhängigkeit der Aktivität	70
3.3.6 Detektierung der NK-Zell – Trypanosomen-Kontakte in der Durchfluss-	71
Zytometrie	
3.3.7 Sind nur die NK-Zellen gegen extrazelluläre <i>T. cruzi</i> aktiv?	73
3.3.8 Die Aktivität gegen extrazelluläre T. cruzi ist kontaktabhängig	75
3.3.9 Analyse der möglichen Effektormechanismen	76
3.3.10 Aktivierung von NK-Zellen gegen extrazelluläre T. cruzi	77
3.3.10.1 Der NKG2D-Rezeptor	77
3.3.10.2 Einfluss von Zytokinen bei der Aktivierung von NK-Zellen	78

4.2 Effektormechanismen in Fibroblasten	82
4.3 Auswirkungen der NK-Zell-Depletion auf Parasitämie, Mortalität und	87
Persistenz	
4.4 Lyse extrazellulärer <i>T. cruzi</i>	89
4.4.1 Die Erkennung von Trypomastigoten durch NK-Zellen	89
4.4.2 Aktivierung von NK-Zellen	90
4.4.3 Die Perforin-unabhängige zytotoxische Aktivität	91

6.	Literatur

V

95

Abkürzungen

APS - Amoniumpersulfat APZ – antigenpräsentierende Zelle Aqua dest - destiliertes Wasser BSA - Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin) B-Zelle – Lymphzyten-Zelle benannt nach der Bursa Fabricii der Vögel CD3, CD4, CD8 – "cluster of differentiation" (Oberflächenproteine, die zur Charakterisierung der jeweiligen Zellen herangezogen werden können) cDNA - copy DNA CMFDA - 5-Chloromethylfluoreszin-diacetat CPRG – Chlorophenol rot-β-D-galaktopyranosid CO₂ - Kohlendioxid DC – Dendritische Zelle (dendritic cell) DMSO - Dimethylsulfoxid DNA – Desoxyribonukleinsäure (-acid) dpi – Tage nach Infektion (days post infection) DTT – Dithiothreitol EDTA – Ethylendiamintetraacetat ELISA - "Enzyme linked immunosororbent assay" ELISPOT - "Enzyme linked ImmunoSPOT" FACS - "Fluorescence Activated Cell Sorting" F_c – "fragment crystallizable" (konstanter Abschnitt eines Anitkörpers) FCS – Feutales Kälber Serum FITC - reaktive Isothiocyanat-Form des Fluoreszins HRP – Meerrettichperoxidase (horse -addish peroxidase) IFN- α , β , γ - Interferon alpha, beta, gamma IL - Interleukin iNOS - induzierbare NO-Synthase i.p. - intraperitoneal kb - Kilobasen LIT – liver-infusion tryptose mA/cm² – Milliampere pro Quadratzentimeter mg - Milligramm MgCl₂ - Magnesiumchlorid MHC – Haupthistokompatibilitäts-Komplex min - Minute ml – Milliliter mM – Millimolar mRNA - messenger RNA ng - Nanogramm

NK-Zelle – Natürliche Killer-Zelle

nm - Nanometer

NO - Stickstoffmonoxid (nitric oxide)

PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung

PE-R-Phycoerythrin

PFA – Paraformaldehyd

RNA - Ribonukleinsäure (-acid)

poly I:C - Polyinosinic-Polycytidylic Säure

rpm – Umdrehungszahl pro Minute (rounds per minute)

RT - Raumtemperatur

TBE-Puffer - Tris/Borat/EDTA-Puffer

TEMED - N,N,N`,N`-Tetramethylethylenediamine

TNF- α - Tumornekrosefaktor- α

Tris-2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

TW – Zellkultur-Einsatz (Transwell)

T-Zelle - im Thymus generierte Lymphozyten-Zelle

µl - Mikroliter

 $\mu g-Mikrogramm$

°C – Grad Celsius

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer danke ich für die Vergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Bretting danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu lesen und zu bewerten.

Meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Thomas Jacobs danke ich für die hingebungsvolle Betreuung, die ihm zeitweise als schwere Bürde vorgekommen sein mag. Dies hat ihn aber nicht davon abgehalten, mich mit Geduld und Spucke durch die Unwegbarkeiten einer Promotion zu leiten.

Frau Iris Gaworski danke ich für eine immerwehrende Hilfsbereitschaft und eine tolle Zeit im Labor. Solche TA gibt es nicht wie Sand am Meer.

Frau Christiane Steeg danke ich für die Quelle neuer Ratschläge.

Frau Ulricke Klauenberg und Herrn Dr. Sebastian Gräfe danke ich für die Durchführung und Auswertung der TaqMan-PCR.

Frau Claudia Sander-Jülch danke ich für die Sortierung der Milzzellen.

Frau Christel Schmetz danke ich für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die schöne Zeit.

Herrn Matthias Wolenski danke ich für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit, die nützlichen Anregungen und für die tolle Nachbarschaft in Hamburg.

Meinen Eltern Heidi und Werner gilt mein ganz besonderer Dank. Sie haben mich in unvergleichlicher Weise unterstützt.

Heike gab mir die Motivation und die Freude.

1. Einleitung

1.1 Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi, Überträger der Chagas-Krankheit, ist ein einzelliger Parasit, der sich durch einen Wirtswechsel zwischen Säugetier und Insekt vermehrt und verbreitet. Als Insektenwirte werden obligat blutsaugende Raubwanzen der Ordnung der Reduviiden genutzt, deren Endemiegebiet ausschließlich auf den mittel- und südamerikanischen Kontinent begrenzt ist. Die Wanzen sind nachtaktiv und stechen mit Vorliebe ins Gesicht, besonders in Augennähe, weshalb sie von den Einheimischen auch als Barbeiros, Friseure, bezeichnet werden. Betroffen sind vor allem Menschen der ländlichen ärmeren Bevölkerungsschicht in den bewaldeten Gegenden Süd – und Mittelamerikas. Die hausen vorwiegend in Hütten aus Lehm und Stroh, in denen die Wanzen optimale Unterschlupfmöglichkeiten und wo ausreichend Wirte finden. In ihrem ursprünglichen Habitat, dem Wald, müssen sie mit einer Blutmahlzeit länger auskommen, da Wirte Mangelware sind. Aufgrund dessen sind die Wanzen in der Lage bis zum Zehnfachen ihres Körpergewichtes an Blut aufzunehmen (Lehane, 1991), was zur Folge hat, dass sie mit ihren Beinen kaum noch auf den Boden gelangen. Sie entledigen sich deshalb mit Hilfe des effektivsten Exkretionssystems des Tierreiches in rasanter Geschwindigkeit der wässrigen Bestandteile des Blutes und setzen noch während der Blutaufnahme die ersten Kot- und Urintropfen ab (Maddrell, 1964). In den Fäzes befinden sich die infektiösen Stadien von T. cruzi, die bei einer Invasion die oft tödlich verlaufende Chagas-Krankheit auslösen.

Im lateinamerikanischen Raum sind laut der Weltgesundheits-Organisation (WHO) rund 100 Millionen Menschen dem Risiko einer Infektion mit T. cruzi ausgesetzt und 16 bis 18 Millionen sind infiziert (WHO, 2004). An der Chagas-Krankheit sterben jährlich mehrere Zehntausend Menschen, von denen vor allem Kinder und geschwächte Personen schon das Anfangsstadium, die akute Phase, nicht überleben (Tanowitz, 1992). Die akute Phase zeichnet sich durch eine sehr diffuse



Symptomatik aus. Am Infektionsort ist bei rund der Hälfte aller Infektionen eine Schwellung zu erkennen, die als Chagom bezeichnet (von WHO-Homepage, 2004). wird; schwillt das Auge an, spricht man auch von einem Romana-Zeichen.

In den ersten drei Monaten können Übelkeit, Erbrechen, leichtes Fieber und allgemeines Unwohlsein auftreten. Oft verläuft die akute Phase jedoch vollkommen symptomfrei, was eine rechtzeitige Diagnose der Krankheit erschwert.

Aus diesem Grund konnten die Wanzen bis zum Anfang der 20. Jahrhunderts auch nicht als Überträger von Trypanosoma cruzi erkannt werden. Dies gelang als erstem dem brasilianischen Arzt Carlos Chagas, nach dem die Krankheit benannt worden ist. In umfassenden Studien konnte er den Lebenszyklus von T. cruzi und den Verlauf der Krankheit aufklären (Chagas, 1909).

Abb. 1.1: Romana-Zeichen

Nach der akuten Phase, die rund drei Monate anhält und in der die Parasiten auch lichtmikroskopisch in Blutausstrichen erkennbar sind, folgt die latente Phase, ein Übergangsstadium mit sehr wenigen Trypanosomen im Blut, das in das letzte Stadium, die chronische Phase, übergeht. T. cruzi vermehrt sich im Säugetierwirt intrazellulär, was zu einer Inflammation durch eine zellvermittelte Immunantwort in den infizierten Geweben führt (siehe unten). Grundsätzlich können alle Gewebe von den Parasiten befallen werden, mit deutlicher Präferenz werden jedoch die Muskulatur des Herzens, des Darmes und des Oesophagus infiziert, was im Verlauf der Krankheit binnen 10 bis 20 Jahren zu erheblichen Dilatationen der betroffenen Organe und letztlich zum Tod führt. Die Ursache für die Dilatationen wurde aber lange Zeit kontrovers diskutiert und eine endgültige Klärung ist bis heute noch nicht erfolgt. Im Gegensatz zu den Anhängern der "Inflammations-Theorie", machen andere Wissenschaftler Autoimmunreaktionen für die Auflösung der Gewebestrukturen verantwortlich. In einer T. cruzi-Infektion wird nicht nur eine zellvermittelte Immunantwort aktiviert, sondern auch die humorale Antwort. Die gegen T. cruzi gebildeten Antikörper besitzen anscheinend eine Kreuzreaktivität gegenüber körpereigenen Zellen, die für eine Denervierung der infizierten Organe verantwortlich gemacht wird (Kierszenbaum, 1999). Experimente in Mäusen sprechen allerdings gegen diese Hypothese, da im Falle einer Kreuzreaktion durch den Transfer von Anti-Serum auch in gesunden Mäusen die für die chronische Phase der Chagas-Krankheit typischen Dilatationen ausgelöst werden müßten, was jedoch nicht der Fall ist (Kierszenbaum, 1999).

Die Bekämpfung der Chagas-Krankheit war bis in die späten Achtziger Jahre ein sehr schwieriges Unterfangen. Bis zu dieser Zeit breitete sich die Krankheit stark aus, vor allem durch kontaminierte Blutkonserven, die nicht auf *T. cruzi* getestet wurden, aber auch durch den halbherzigen Einsatz von Insektiziden, gegen die die Wanzen schnell Resistenzen

ausbildeten. Eine wirksame Chemotherapie oder sogar Impfung sind bis heute nicht vorhanden und so konzentriert sich die Bekämpfung der Parasiten auf eine Abwehr der Wanzen. In der sog. "Southern Cone"-Initiative haben sich die Länder Süd- und Mittelamerikas zusammen-geschlossen mit dem Ziel eines organisierten, permanenten Einsatzes verschiedener Insektizide, die flächendeckend eingesetzt wurden und immer noch werden. So



Abb. 1.2: Triatoma infestans

konnte die Neuinfektionsrate bei den unter 18 jährigen in allen Ländern um 85% gesenkt werden, in Uruguay sogar um 99% (WHO, 2004).

Dabei ging man aber davon aus, dass die Wanzenarten, allen voran *Triatoma infestans* und *Rhodnius prolixus*, die für die Übertragung der Krankheit überwiegend verantwortlich sind, domestiziert sind und ein Austausch mit "wild-lebenden" Waldarten kaum von Bedeutung war. In Venezuela kam eine Studie vor kurzem aber zu einem anderen Ergebnis. Dort wurde festgestellt, dass Wanzen oft zur Nahrungsaufnahme in die kleinen Siedlungen wandern und sich danach wieder zurückziehen und somit kaum bekämpft werden können (Feliciangeli et al., 2003). Ein weiteres Problem entsteht aus der sehr großen Anzahl an Reservoir-Wirten, die

T. cruzi befallen kann. Dadurch kommt es immer wieder zu Neuinfektionen der Wanzen, die dadurch als Überträger für den Menschen zur Gefahr werden. Auch über die gesundheitliche Verträglichkeit des dauerhaften Einsatzes der Insektizide für den Menschen existieren bislang keine Untersuchungen, wobei aber von Beeinträchtigungen ausgegangen werden kann. Die Entwicklung einer Therapie oder wirksamer Vakzine ist deshalb von großer Wichtigkeit. Dafür ist aber ein grundlegendes Verständnis der Immunantwort gegen den Parasiten erforderlich.

Systematisch wird *T. cruzi* wie folgt eingeordnet: System Protozoa Stamm Sarcomastigophora Unterstamm Mastigophora (Flagellata) Klasse Zoomastigophora Ordnung Kinetoplastida Familie Trypanosomatidae

Namensgebend für die Ordnung ist der Kinetoplast, ein besonders DNA-haltiger Abschnitt des Mitochondriums. Mit Hilfe der Lage des Kinetoplasten innerhalb des Zellkörpers lassen sich unterschiedliche Stadien der Trypanosomen identifizieren. Die Lage des Kinetoplasten ist immer mit dem Ursprung des Flagellums assoziiert, das in der sog. Flagellartasche seinen Anfang nimmt. Carlos Chagas konnte bei der Charakterisierung von *T. cruzi* eine Vielzahl von Entwicklungsstadien beobachten, von denen sich allerdings drei für die Entwicklung besonders hervortaten.

Die trypomastigote Form stellt das infektiöse, nicht teilungsfähige Stadium von T. cruzi



dar. Der Zellkörper ist schlanker als bei den Epimastigoten, Kinetoplast (\mathbf{K}) und Flagellum (\mathbf{F}) wandern apikalwärts und es bildet sich ein "surface coat" aus, der die Parasiten resistent gegenüber dem Komplementsystem im Blut des Säugetierwirtes macht. Die Trypomastigoten entstehen durch die sog. Metazyklogenese aus den Epimastigoten. Dieser Prozess findet im Rektum der Wanzen statt und wird durch die einsetzende Diurese bei der Blutverdauung

induziert (Schaub & Lösch, 1988).

Bei der <u>epimastigoten Form</u> befinden sich Kinetoplast und Flagellartasche zentral im Zellkörper in direkter Umgebung des Nukleus. Insgesamt hat der Korpus eine leicht gedrungene Erscheinung. Die Epimastigoten sind ausschließlich im Insektenwirt zu finden und zur Zellteilung befähigt.





Die <u>amastigote Form</u> ist spezifisch für den Säugetierwirt und das zur Replikation befähigte Stadium. Die Vermehrung im Säuger ist ausschließlich intrazellulär. Bei den Amastigoten rundet sich der Zellkörper stark ab, das bei allen anderen Formen voll ausgebildete Flagellum, wächst kaum über den Rand der Flagellartasche und des Basalapparats (**T** und **B**) hinaus und der Kinetoplast erscheint wieder zentral im Korpus.

Der Entwicklungszyklus von *Trypanosoma cruzi* ist durch den Wirtswechsel Insekt-Säuger gekennzeichnet. In beiden Wirten findet eine massive Vermehrung statt, die durch Zweiteilung erfolgt. Sexuelle Vermehrung konnte bei *T. cruzi* noch nicht zweifelsfrei beschrieben werden. Wanzen infizieren sich entweder bei der Blutaufnahme oder durch den

Kot anderer Wanzen, da die Reduviiden Koprophagie betreiben, um für ihre Entwicklung benötigte symbiontische Bakterien aufzunehmen. In der Regel reicht ein aufgenommener Parasit aus, um eine stabile Population zu bilden. Die Trypanosomen durchwandern den Dünndarm und vermehren sich hauptsächlich im Rektum der Insekten, da dessen Epithel mit einer Kutikula ausgekleidet ist und T. cruzi sich über hydrophobe Bereiche seines Flagellums dort anheften kann (Kleffmann et al., 1998). Eine Evasion aus dem Darm kommt in den Insekten nicht vor. Durch die Diurese werden die Trypanosomen aus dem Rektum gespült und gelangen so direkt auf die Haut der Säugetierwirte, welche die Trypomastigoten durch Mikroverletzungen der Haut, z.B. dem Stichkanal (Schuster & Schaub, 2000) oder Invasion durch die Schleimhäute durchdringen.



Fig 1.3: Entwicklungszyklus von *T. cruzi* (aus Melhorn & Pikarski, 1995)

Innerhalb der Zelle kommt es zur Umwandlung in das amastigote Stadium und es beginnt eine massive Vermehrung. Dabei entstehen neben vielen

Amastigoten auch einige Trypomastigote, die sich, nachdem die Wirtszelle durch die Parasiten zerstört wurde, via Blutstrom im gesamten Körper distributieren oder von einer Reduviide erneut aufgenommen werden.

1.2 Das Immunsystem

Die Erhaltung der Vitalität höherer Organismen erfordert neben Stoffwechsel und Fortpflanzung Mechanismen, die der Beseitigung von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Parasiten dienen, da deren ungehindertes Wachstum zum Exitus des Lebewesens führen würde. Erste Barrieren stellen die Epithelien dar, die an empfindlichen Stellen wie Schleimhäuten durch die antimikrobiellen Substanzen Lysozyme, Pepsine, Defensine und Cytidine zusätzliche Schlagkraft erhalten (Ouellette, 1999; Podolsky, 1999). Gelingt Pathogenen durch Verletzungen der Epithelien oder durch übertragende Insekten eine Invasion in den Organismus, kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems.

In Säugetieren gliedert sich die Immunantwort in die angeborene Immunität und die erworbene, adaptive Immunität. Die angeborene Immunität zeichnet sich durch ein festgelegtes Wirkungsspektrum aus, das unabhängig von der Art des jeweiligen Pathogens reagiert. In den Bindegeweben unterhalb der Epithelien ist eine erhöhte Anzahl an Zellen der angeborenen Immunität vorhanden. Dazu gehören vor allem Makrophagen und dendritische Zellen, die u.a. die professionellen Antigenpräsentierenden-Zellen (APZ) repräsentieren. Sie nehmen durch Pinozytose (Inaba et al., 1990), Makropinozytose (Sallusto et al., 1995), Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993) oder Endozytose über F_c-Rezeptoren (Radoux et al., 1985) Pathogene oder Bruchstücke der Pathogenen auf und prozessieren sie (Tanaka & Ichihara, 1988; Tanaka et al., 1988; Brown et al., 1991). Die Proteine werden in kleinste Peptide fragmentiert und durch Moleküle des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (HLA im Menschen oder MHC in der Maus) auf der Zelloberfläche der APZ präsentiert (Falk et al., 1990; Rötzschke et al., 1990a; Rötzschke et al., 1990b). Dabei werden Peptide von extrazellulären Pathogenen, die sich im Phagolysosom befinden auf MHC-II Molekülen präsentiert, während Peptide von intrazellulären Pathogenen, die sich direkt im Zytosol befinden und zu denen Viren, aber auch *Trypanosoma cruzi* zählen, durch MHC-I Moleküle auf die Zelloberfläche transportiert werden (Zinkernagel, 1979).

Bei diesem Prozess reifen die Makrophagen und dendritischen Zellen aus und wandern in die drainierenden Lymphknoten oder andere sekundäre bzw. periphere lymphatische Organe, zu denen neben den verschiedenen Lymphknoten auch die Milz gehört. Auch die darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT, Meuwissen et al., 1969), denen z.B. die Peyerschen Plaques angehören, die bronchien-assoziierten (BALT, Racz et al., 1977; Myrvik et al., 1979) sowie die Rachen- und Gaumenmandeln als mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT, Pierce, 1980; Pierce and Koster, 1980) zählen dazu.

In den lymphatischen Organen treffen die APZ auf zirkulierende naive Lymphozyten, die hauptsächlich aus den B- und T-Zellen bestehen. Sie stellen die adaptive Immunität dar und entwickeln sich wie alle Zellen des Blutes und Immunsystems aus pluripotenten myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Sie sind durch eine sehr ausgeprägte Spezifität ihrer Rezeptoren charakterisiert, wobei jede Zelle einen Rezeptor mit eigener Spezifität ausbildet, die sich von jeder anderen Zelle und ihrem Rezeptor unterscheidet. Die Entwicklung der T-Zellen findet im Thymus statt. Dabei durchlaufen die Zellen eine Selektionierung, bei der in allen Zellen mit einem Rezeptor, der körpereigene Peptide erkennen könnte der programmierte Zelltod induziert wird. Die B-Zellen entwickeln sich unabhängig von den T-Zellen im Knochenmark. Alle Lymphozyten mit Rezeptor-Spezifitäten gegen körperfremde Peptide zirkulieren in Blut und Lymphe oder sind in den verschiedenen lymphoiden Organen zu finden (Gowans, 1966). Solange ein Lymphozyt nicht in Kontakt mit dem für den Rezeptor spezifischen Peptid getreten ist, wird er als naiv bezeichnet. Kommt es aber zu einer Erkennung des Peptides, das durch die MHC-Moleküle auf der Oberfläche von APZ präsentiert wird und erfolgt eine Aktivierung der T-Zellen, handelt es sich um eine MHC-Restriktion (Zinkernagel & Doherty, 1979). Dabei werden Peptide von Pathogenen aus dem Zytosol, die auf MHC-I Molekülen präsentiert werden, von CD8⁺-T-Zellen und Peptide, die dem Phagolysosomen entstammen und durch MHC-II Moleküle gebunden sind, von CD4⁺-T-Zellen erkannt.

Die Aktivierung der Lymphozyten ist durch eine massive klonale Expansion gekennzeichnet (Quintans & Lefkovits, 1974; Kamat & Henney, 1975). Die Zellen werden zu Lymphoblasten, die sich sieben bis zehn Tage lang alle 24 Stunden zwei- bis viermal teilen, wodurch mehrere tausend Tochterzellen mit identischer Rezeptorspezifität entstehen. Von diesen aktivierten Zellen wandelt sich ein bestimmter Anteil in sog. Gedächtnis-Zellen um, die bei einer eventuellen Neuinfektion mit dem gleichen Pathogen wesentlich schneller expandieren und damit reagieren können als in der Erstinfektion (Babich et al., 1965; Nossal et al., 1965; Schmitt, 1965). Aus oben genannten Gründen spricht man von der erworbenen Immunität.

Zunächst migrieren die aktivierten T-Zellen durch Chemokine und Signalmoleküle an den Gefäßepithelien zum Infektionsort oder es kommt im Fall von aktivierten B-Zellen, die sich zu sog. Plasmazellen differenzieren, zu einer massiven Freisetzung von Antikörpern, die die gleichen Strukturen auf den Pathogenen erkennen wie der Rezeptor der entsprechenden B-Zelle. Dadurch kommt es zu einer Opsonisierung der Pathogene mit Antikörpern, die von Zellen der angeborenen Immunität wie z.B. Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile oder NK-Zellen erkannt und phagozytiert bzw. lysiert werden. Außerdem erfolgt eine Aktivierung des Komplementsystems, einer weiteren Komponente der angeborenen Immunität (Gerlings-Petersen & Pondman, 1965).

Die T-Zellen am Infektionsort entwickeln entweder lytische Aktivität durch zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen oder sezernieren Zytokine, die vor allem durch $CD4^+$ -T-Zellen freigesetzt werden. Welche Zytokine sezerniert werden, ist in der gesamten Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Es ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Botenmolekülen bekannt, die oft duale Wirkungen zeigen können, abhängig von ihrer Kombination oder dem Zeitpunkt der Sekretion. Vor allem die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-4 (IL-4) gelten als richtungsweisend für die gesamte Immunantwort. Während IFN- γ zu einer massiven Aktivierung von antimikrobiellen Prozessen in Makrophagen führt und somit der Beseitigung intrazellulärer Pathogene dienlich ist (T_H1-Antwort), werden durch IL-4 vor allem B-Zellen in ihrer Aktivierung unterstützt, wodurch es zu einer verstärkten Antwort gegen extrazelluläre Pathogene kommt (T_H2-Antwort; ausführliche Darstellung des Immunsystems in Janeway et al., 2002).

NK-Zellen konnten als eine Zellpopulation beschrieben werden, die sehr schnell, lange vor einer T-Zell-induzierten Immunantwort mit einer Sekretion von Zytokinen auf eine Infektion reagieren können, wodurch sie eine Schlüsselposition in der Direktion der Immunantwort einnehmen und ein Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität darstellen (Geldhof et al., 2002).

1.3 Natürliche Killer (NK)-Zellen

NK-Zellen entwickeln sich aus CD34⁺-Vorläuferzellen, die sich unter Einwirken von Flt-3 und IL-15 zu CD3⁻/CD56⁺ - NK-Zellen ausdifferenzieren (Lotzova et al., 1993; Mrozek et al.,

1996). Die Anzahl von NK-Zellen im gesamten Organismus läßt sich durch den Flt-3-Liganden stark erhöhen (Shaw et al., 1998).

Im Menschen können zwei Haupt-Populationen von NK-Zellen unterschieden werden (Cooper et al., 2001):

- die zytotoxischen NK-Zellen. Sie exprimieren hohe Mengen an CD16 und wenig 1. CD56 und stellen den weitaus größten Anteil in der NK-Population (rund 90%) dar. Bei diesen NK-Zellen kann auch nach Aktivierung kaum eine Proliferation gemessen werden. CD16 ist ein Rezeptor, der den konstanten Abschnitt von gebundenen Antikörpern bindet und bei NK-Zellen eine zytotoxische Aktivität auslöst. Er ist einer von mehreren aktivatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche NK-Zellen **CD56** von (siehe unten): ist ein NK-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül unbekannter Funktion, das zur Charakterisierung von Lymphozyten herangezogen wird.
- <u>die zytokin-sezernierenden NK-Zellen</u>. Sie zeichnen sich durch eine sehr starke Expression von CD56 aus, besitzen aber wenig CD16. Diese NK-Zellen können vielseitig mit Zytokinen auf Stimuli reagieren. So lösen IL-12, IL-15 und IL-18 in verschiedener Kombination unterschiedliche Zytokin-Antworten aus:

IL-12 und IL-18 \Rightarrow IFN- γ ,

- IL-15 und IL-18 \Rightarrow GM-CSF und
- IL-12 und IL-15 \Rightarrow IL-10.

Die Sekretion von IFN- γ , das eine T_H1-Antwort auslöst und IL-10, das eine gegenteilige Wirkung besitzt, läßt erkennen, dass NK-Zellen regulativ auf das komplexe Immunsystem einwirken können.

NK-Zellen wurden Mitte der Siebziger Jahre als eigenständige Lymphozytenpopulation entdeckt und beschrieben (Kiessling et al., 1975). In Experimenten zur Untersuchung der Zytotoxizität von lymphoiden Zellen konnte sowohl mit Mauszellen als auch mit Humanzellen eine unerklärliche Aktivität beobachtet werden, die ohne vorherige Immunisierung auftrat, also nicht auf aktivierte T-Zellen oder antikörpervermittelte Aktivität zurückgeführt werden konnte (Herberman et al., 1973; Petranyi et al., 1974). In umfangreichen Versuchsreihen konnten innerhalb der Lymphozytenpopulation Zellen charakterisiert werden, die besonders Yac-Zellen lysierten (Kiessling et al., 1975; Herberman et al., 1975). Bei Yac-Zellen handelt es sich um Tumorzellen, die ursprünglich von einem Moloney-Virus induziert wurden. Viren haben oft die Eigenschaft, die Expression der MHC-I-Moleküle zu inhibieren. So auch bei den Yac-Zellen, die sehr wenig MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufzeigen. Allerdings konnte erst Mitte der Achtziger Jahre durch die Klonierung einer Tumor-Zelllinie, die gar kein MHC-I auf ihrer Oberfläche exprimieren konnte, ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität von Zellen für eine NK-Zell-vermittelte Lyse und dem Grad ihrer Expression von MHC-I gefunden werden (Kärre et al., 1986; Ljunggren & Kärre, 1985). Interessanterweise werden auch körpereigene Nervenzellen von NK-Zellen erkannt und lysiert (Backström et al., 2000 und 2003). Nervenzellen sind die einzigen somatischen Zellen, die kein MHC-I besitzen (Singer & Maguire, 1990); nur sind sie

normalerweise durch eine Ummantelung von Gliazellen (mit MHC-I) umgeben, welche die Neuronen vor einem direkten Kontakt mit Lymphozyten schützen.

Mittlerweile ist der Mechanismus relativ gut aufgeklärt. NK-Zellen besitzen ein vielseitiges Repertoir an Rezeptoren, deren Expression in ihrer Mehrheit nicht induziert werden muss, sondern die konstitutiv auf der Oberfläche vorhanden sind (Cerwenka & Lewis, 2001; Tabelle 1.1). Vereinfacht lassen sie sich in aktivatorische und inhibitorische Rezeptoren einteilen. Die Expression von MHC-I ist deshalb von entscheidender Bedeutung für eine NK-Aktivität, weil alle inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen mit hoher Affinität MHC-I – Moleküle binden und die NK-Zellen auch dann noch blockieren können, wenn es zu einem zusätzlichen Engagement eines aktivatorischen Rezeptors kommt, weshalb eine Aktivität immer durch das "missing-self" verursacht wird (Kärre, 2002).

Diese Theorie wird kontrovers diskutiert. Die oben genannten Aussagen besitzen zwar Gültigkeit, aber keine unumschränkte. So wird die MHC-I-Expression von Zellen bei einer Infektion mit Adenoviren sogar erhöht und dennoch werden die infizierten Zellen von NK-Zellen erkannt und lysiert (Routes et al., 2001). Zudem binden einige aktivatorische Rezeptoren ebenfalls an MHC-I, allerdings mit einer stark herabgesetzten Affinität (Cerwenka & Lewis, 2001).

Letztlich rufen die NK-Zellen großes medizinisches Interesse hervor, weil sie in der Lage sind, körpereigene Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Die Gründe sind werden einer wahrscheinlich vielfältig, aber vorwiegend in sehr heterogenen Zusammensetzung der NK-Zell-Population gesehen, die sich stark in der Expression der einzelnen Rezeptoren unterscheiden (Routes et al., 2001). In Tumorzellen kommt es darüberhinaus zu einer verstärkten Präsentation von Stress-Molekülen, wie z.B. im Menschen der MIC-A und B-Moleküle, die als Liganden für den aktivatorischen NKG-2D-Rezeptor identifiziert werden konnten (Bauer et al., 1999). Eine allgemein gültige Aussage kann aufgrund dieser ungeklärten Befunde schwerlich getroffen werden, zumal noch längst nicht alle Funktionen der einzelnen Rezeptoren bzw. alle Rezeptoren von NK-Zellen bekannt sind.

	Rezeptor	Ligand
inhibierend	Ly49 (murin)/ KIR (human)	erkennt MHC-I

	CD94/NKG-2A	ebenfalls Bindung an MHC-I
aktivierend	Ly49 (D und H)	binden an nicht körpereigenes MHC-I, sollte doch eine
		Erkennung von eigenem MHC-I erfolgen ist die Affinität
		stark herabgesetzt im Vergleich zu den inhib. Ly49; sind
		mit DAP-12 assoziiert
	CD94/NKG-2C	wie bei Ly49 geringere Affinität zu MHC-I, die wird
		aber von den Peptiden, mit denen die MHC-Moleküle
		beladen sind, beeinflußt
	2B4	bindet an CD48, ein GPI-verankertes Molekül der Ig-
		Superfamilie und wird auf NK-, T- und einigen
		myeloiden Zellen exprimiert. Engagement führt zu
		Zytokin-Ausschüttung und Zytotoxizität
	NKG-2D	erkennt H60 in Mäusen und MIC-A und B im
		Menschen. Ist mit DAP-10 assoziiert. Bindung führt zu
		zytotoxischer Aktivität. Wird auf NK-, γδ- und CD8 ⁺ -
		Zellen exprimiert
unbekannte	Nkp 46	ist auf allen NK-Zellen exprimiert. Spezifische
Funktion		Antikörper lösen eine Lyse aller F _c -Rezeptoren tragender
		Zellen aus
	Nkp 44	wird nur auf IL-2 aktivierten NK-Zellen exprimiert und
		ist mit DAP-12 assoziiert
	Nkp 30	wichtige Funktion bei Interaktionen mit dendritischen
		Zellen, die abhängig von den lokalen
		Zahlenverhältnissen NK-Zellen:DC NK-Zellen aktivie-
		ren oder inhibieren können (Piccioli et al., 2001;
		Ferlazzo et al., 2001; Gerosa et al., 2001)

Tab. 1.1: Wichtige Rezeptoren von NK-Zellen

1.4 Die Immunantwort gegen Trypanosoma cruzi

Viele Pathogene haben sich evolutiv an ihren Wirt angepaßt, indem sie eine starke Immunantwort verhindern, sei es durch gezielte Inhibierung oder durch Persistenz in Geweben in denen eine Inflammation möglichst unterdrückt wird, wie z.B. der Leber oder das Gehirn (zusammengefaßt in Mehlhorn & Pikarski, 1995). In einer *T. cruzi*-Infektion kommt es kurz nach der Invasion zu einer starken Aktivierung des Immunsystems. Dazu trägt vor allem bei, dass *T. cruzi* sowohl intrazellulär als auch extrazellulär im Säugerwirt auftritt und dadurch neben Mechanismen zur Beseitigung von den intrazellulären Parasiten durch z.B. erhöhte Zytotoxizität auch die humorale T_H 2-Immunantwort aktiviert wird.

Gelingt *T. cruzi* das Eindringen in einen Säugetierwirt, werden sofort Zellen im Unterhautgewebe wie unreife dendritische Zellen, Makrophagen und Fibroblasten infiziert. Dabei bindet wahrscheinlich ein bestimmtes Protein auf der Oberfläche der infektiösen

Trypomastigoten, das Tc85, ein zur Transsialidase-Supergen-Familie gehörendes Glykoprotein, an die Zellmembranen der Wirtszellen und löst dadurch die Aufnahme in die Zellen aus (Magdesian et al., 2001). Durch die Bindung an die Zelle induziert T. cruzi in der Zelle eine Attraktion von Lysosomen entlang der Mikrotubuli zum Ort der Anheftung von T. cruzi an die Zellmembran (Tardieux et al., 1992; Rodriguez et al., 1996). Der saure pH-Wert der Lysosomen, in die T. cruzi invadiert, führt nicht zur Lyse der Parasiten, sondern aktiviert porenbildende Proteine. Diese sind nur unter sauren Bedingungen aktiv und besitzen Homologien zu den porenformenden Proteinen des Komplementsystems (Ley at al., 1990; Andrews et al., 1990; Andrews & Webster, 1991). Dadurch können die Trypanosomen direkt ins Zytosol entweichen. Außerdem induziert der saure pH-Wert die Umwandlung der Trypomastigoten ins amastigote Stadium, ein Prozess, der bereits in der Vakuole beginnt und im Zytosol weitergeführt wird (Tomlinson et al., 1995).

Das Entweichen in das Zytosol verhindert keine Signalgebung der infizierten Zellen an das Immunsystem, dass sie von *T. cruzi* befallen sind. Es kommt zu einer Fragmentierung von *T. cruzi*-Proteinen, die in MHC-I Molekülen auf der Oberfläche der Wirtszellen präsentiert werden. Zudem kommt es sowohl in infizierten Mäusen als auch in Menschen zu einer erhöhten MHC-I Expression in den infizierten Geweben (Stryker & Nickell, 1995; Reis et al., 1993).

Durch Experimente in Mäusen, die sich als Modellorganismus zur Untersuchung einer *T. cruzi*-Infektion und ihrer Folgen eignen, konnten wichtige Bestandteile der Immunantwort gegen die Parasiten aufgeklärt werden.

Vor allem CD8⁺-T-Zellen, welche zytotoxische Aktivität ausüben, werden durch die Antigenpräsentation durch MHC-I-Molekülen aktiviert. In der akuten Phase der Infektion nimmt ihre Anzahl im Blut stark zu, während die Zahl der CD4⁺-T-Zellen abnimmt (Sato et al., 1992). In der chronischen Phase sind in den infizierten Geweben fast ausschließlich CD8⁺-T-Zellen aktiv (dos Santos et al., 2001). Eine Depletion der CD8⁺-T-Zellen verursacht eine erheblich gesteigerte Suszeptibitlität in Mäusen (Tarleton, 1990). Trotzdem sind nicht nur CD8⁺-T-Zellen bei der Bekämpfung von *T. cruzi* von Bedeutung. In der akuten Phase der Infektion kann ebenso eine starke Expansion von B-Zellen beobachtet werden (Minoprio et al., 1986). Die daraus folgende humorale Antwort mit Antikörpern trägt stark zu einer Resistenz gegen die Parasiten bei. So können Mäuse durch Injektion von Antisera die Parasitämie sehr viel schneller unterdrücken als unbehandelte Mäuse (Scott & Moyes, 1982). Außerdem führt die Opsonierung der extrazellulären T. cruzi mit Antikörpern zu einer verstärkten Aufnahme durch Makrophagen (Lages-Silva et al., 1986; Lima-Martins et al., 1985). Auch in diesem Fall führt eine Depletion von B-Zell-aktivierenden T-Zellen zu einer stark erhöhten Parasitämie und Sterblichkeit in den infizierten Mäusen (Rottenberg et al., 1988).

Im Gegensatz zu der B-Zell-Expansion wird die Proliferation der T-Zellen sehr schnell durch *T. cruzi* unterdrückt. T-Zellen benötigen zur fortdauernden Teilung Interleukin-2 (IL-2). Der Nachweis dieses Zytokins kann als Zeichen von T-Zell-Aktivierung gewertet werden, da nur T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen erkannt haben, IL-2 ausschütten. In einer *T. cruzi*-

Infektion kann bereits vier Tage nach der Infektion der anfänglich hohe Titer an IL-2 nicht mehr detektiert werden (Nabors & Tarleton, 1991). Außerdem können in Mäusen suppressorische T-Zellen nachgewiesen werden, die nach adoptiven Transfer die T-Zell-Antwort in nicht-infizierten Mäusen inhibieren können (Ramos et al.,1979) und die nicht den normalen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor tragen, sondern einen $\gamma\delta$ -Rezeptor besitzen (Cardillo et al., 1993).

Trotz der inhibierten T-Zell-Antwort können sowohl in der akuten Phase als auch in der chronischen Phase inflammatorische Zytokine nachgewiesen werden. Vor allem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IFN- γ werden permanent in den parasitierten Geweben freigesetzt (Grisotto et al., 2001; Ramos et al., 1979). Die Produzenten sind in den unterschiedlichen Phasen der Infektion jeweils unterschiedliche Zellpopulationen. Während in der chronischen Phase vor allem CD8⁺-T-Zellen die Inflammation in den Geweben verursachen, sind in der akuten Phase CD4⁺-T-Zellen und als allererstes NK-Zellen von Bedeutung. Für eine erfolgreiche Immunantwort gegen Trypanosoma cruzi ist es entscheidend, dass sich der T_H1-Typ ausbildet. Unterstützt wird dies durch die Sekretion von Interleukin-12 (IL-12), das insbesondere von infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert wird. Dieses Zytokin bewirkt in T- und NK-Zellen die Sekretion von IFN-y. das wiederum in infizierten Zellen Prozesse zur effektiveren Bekämpfung der intrazellulären Parasiten induziert, mit dem Hauptmediator Stickstoffmonoxid (NO; Däubener et al., 1999). In suzeptiblen Maus-Stämmen wie Balb/c-Mäusen wird die T_H1-Antwort durch die Zytokine IL-4 und IL-13 unterdrückt, wodurch die Induktion von NO in den infizierten Zellen inhibiert ist und die Parasiten nicht wirkungsvoll beseitigt werden können (Antúnez & Cardoni, 2001; Kumar & Tarleton, 2001). In Mäusen, die in der Lage sind die Parasitämie nach einiger Zeit zu kontrollieren (z.B. C57BL/6-Mäuse), kann IL-12 schon wenige Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden (Aliberti et al., 1996; Frosch et al., 1996; Une et al., 2000), woraufhin auch die Konzentration an IFN-y stark ansteigt (Meyer zum Büschenfelde et al., 1997, Müller et al., 2001). Werden die Gene für IL-12 oder IFN-y ausgeschaltet, kann eine wesentlich höhere Sterblichkeit der Mäuse beobachtet werden an (Une et al., 2003, Michailowsky et al., 2001). Grund dafür ist die fehlende Induktion von NO. Wird NO in vivo inhibiert oder das Gen des NO-generierenden Enzyms, der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), ausgeschaltet, versterben die Mäuse ähnlich schnell wie in den IL-12 oder IFN-y-defizienten Mäusen (Säftel et al., 2001; Hölscher et al., 1998). Allerdings können diese Auswirkungen nur dann beobachtet werden, wenn die Inhibierung mit der Infektion erfolgt: Schon eine Inhibierung der iNOS 20 Tage nach der Infektion hat keinen Einfluß auf die Parasitenlast im Blut oder den infizierten Geweben (Säftel et al., 2001). Eine frühzeitige Sekretion von IFN- γ ist für eine erfolgreiche Bekämpfung der Parasiten notwendig, um die Zahl der Pathogene von Anfang an möglichst gering zu halten. NK-Zellen sezernieren schon wenige Stunden nach der Infektion IFN-γ (Cardillo et al., 1996) und sind deshalb von besonderer Bedeutung. Eine Depletion der NK-Zellen in vivo zum Zeitpunkt der Infektion, führt zu einem drastischen Absinken der IFNy-Konzentration und damit zu einer erheblich gesteigerten Suszeptibilität (Cardillo et al., 1996; Cardillo et al., 2002).

Neben der schnellen IFN-γ-Produktion durch NK-Zellen konnte eine zweite mögliche Beteiligung von NK-Zellen bei der Immunabwehr gegen die Trypanosomen beobachtet werden. Dabei gehen die Lymphozyten direkte Interaktionen mit extrazellulären *T. cruzi* ein, die zu einer Immobilität der Parasiten führen (Hatcher & Kuhn, 1982). Über die Natur dieser Interaktionen ist noch nichts bekannt, allerdings sind die NK-Zellen die einzigen Lymphozyten, die zu solchen Reaktionen befähigt sind. Außer *T. cruzi* sind auch andere Trypanosomen-Arten wie z.B. *Trypanosoma lewisi* von zytotoxischen Aktivitäten der NK-Zellen betroffen. Interessanterweise ist *Trypanosoma musculi*, ein an die Maus angepaßter Parasit, vor der Aktivität muriner NK-Zellen geschützt. Der Grund dafür konnte noch nicht geklärt werden (Albright et al., 1984).

Fragestellung und Ziele der Arbeit

NK-Zellen beteiligen sich in vielfältiger Weise an der Immunantwort gegen *Trypanosoma cruzi*. Insbesondere in der frühen Phase der Infektion ist die Aktivität von NK-Zellen von entscheidender Bedeutung, um die Parasiten erfolgreich zu kontrollieren. Die bisherigen Untersuchungen konnten eine deutliche Steigerung der Parasitämie und Sterblichkeit durch eine Depletion von NK-Zellen aufzeigen, die auf eine verminderte Sekretion von IFN- γ zurückgeführt werden kann.

Allerdings konnte noch nicht gezeigt werden, inwieweit die Depletion von NK-Zellen die Persistenz in den einzelnen Geweben beeinflußt. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Parasitenlast in einigen Geweben in An- bzw. Abwesenheit von NK-Zellen untersucht und die daraus gewonnen Erkenntnisse *in vitro* erweitert werden. Dazu soll eine Fibroblasten-Zelllinie mit *T. cruzi* infiziert und die Induktion von antimikrobiellen Prozessen unter Beteiligung von Milz- und NK-Zellen untersucht werden.

Desweiteren sollen die Erkenntnisse der direkten Interaktionen von NK-Zellen und *T. cruzi* erweitert werden. Diesbezüglich werden Experimente angestrebt, die die Mechanismen bezüglich Erkennung und Abtötung von extrazellulären *T. cruzi* durch NK-Zellen klären sollen. Wichtig dabei ist die Untersuchung, ob die Aktivität kontaktabhängig oder zytokinvermittelt ist und ferner, ob zytotoxische Mediatoren für die Immobilisierung der Parasiten verantwortlich sind.

Charles River Laboratories, Wilmington,

Charles River Laboratories

Charles River Laboratories

Charles River Laboratories

MPI für Immunbiologie, Freiburg

MPI für Immunbiologie, Freiburg

MA, USA

BNI

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mausstämme

Die mit * gekennzeichneten Mäuse wurden im hauseigenen Tierstall gezüchtet. Alle verwendeten Mäuse wurden im Alter zwischen fünf bis acht Wochen eingesetzt.

BALB/c-Mäuse (H-2^b) *

C57BL/6-Mäuse (H-2^b) * IFN- $\gamma^{-/-}$ -Balb/c (H-2^d) * IL-12 -/--C57BL/6-Mäuse (H-2^b) * $CBAj (H-2^k)$ C.B.-17 (Scid, $H-2^{d}$) Perforin^{-/-} C57BL/6-Mäuse (H-2^b)

2.1.2 Parasiten

Tulahuen (WHO Referenz-Stamm M/HOM/	
CH/00/Tulahuen C2)	MPI für Immunbiologie, Freiburg
Tehuantepec (transfiziert mit lacZ-Gen)	im BNI vorhanden, zur Verfügung gestellt
	von Dr. Sebastian Gräfe

2.1.3 Zelllinien

Yac-1 (Lymphoma-Zelllinie, die durch einen	
Moloney Leukämie Virus induziert wurde)	Forschungszentrum Borstel
L-929 (fibroblasten-ähnliche Tumorzellen)	ATCC, Rockville Maryland, USA
86-HG-39 (humane Neuroblastomazellen)	BNI

2.1.4 Antikörper

Antikörper für FACS und ELISA: Ratte-anti-Maus-CD4-CyChrome Ratte-anti-Maus-CD8-FITC (CT-CD8a)

PharMingen CALTAG

Ratte-anti-Maus-CD3-CyChrome (17A2)	PharMingen
Ratte-anti-Maus-IL 12 (C15.6)	PharMingen
Ratte-anti-Maus-IL 12-Biotin (C17.8)	PharMingen
Ratte-anti-Maus-IFN-γ (R4-6A2)	PharMingen
Ratte-anti-Maus-IFN-7-Biotin (XMG1.2)	PharMingen
Ratte-anti-Maus-CD49b/Pan NK-Zellen (DX5)-FITC	PharMingen

Antikörper für Neutralisation, Blot und Depletion:

Anti-NKG-2D (Klon 191004) Ratte-anti-Maus-IL 12 (neutralisierend, C17.8) Ratte-anti-Maus-IFN-γ (XMG1.2) Kanninchen-anti-Maus-iNOS/NOS II

Kanninchen-anti-Maus-Asialo GM1 Ziege-anti-Kanninchen (Blot) R&D Systems, Wiesbaden PharMingen BNI Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY Cedarlane, Canada Dako

2.1.5 Primer

murines IFN- α sense	5' – TGT CTG ATG CAG CAG GTG G – 3'
murines IFN- α anti-sense	5' – AAG ACA GGG CTC TCC AGA C – 3'
murines IFN-β sense	5' – CCA TCC AAG AGA TGC TCC AG – 3'
murines IFN-β anti-sense	5' – GTG GAG AGC AGT TGA GGA CA – 3'
murines β -actin sense	5'- GTC GTA CCA CAG GCA TTG TGA TGG – 3'
murines β -actin anti-sense	5' – GCA ATG CCT GGG TAC ATG GTG G – 3'

TacMan-PCR

T. cruzi	sense	5' – GGC TGC
	anti-sense	5' – GCA TAT
FAM/TAMRA-Sonde		FAM – TAG C

5' – GGC TGC AGA GTC AGG TGT TT – 3' 5' – GCA TAT CGG CAA ACC AGC A – 3' FAM – TAG GCT TCC ATG ATG – CAA AAA GAA ACA AAA GAA A - TAMRA - TA

2.1.6 Geräte

Analysenwaage Blotting-Kammer ("semidry") CO₂-Inkubator (Brutschrank) Critical Point Dryer CPD 7501 Digitalwaage Sartorius AG, Göttingen BioRAD, München Heraeus Instruments, Hanau Plano, Wetzlar Kern & Söhne, Alberstadt

ELISA-Reader Lambda E	MWG Biotech, Ebersberg
ELISPOT-Reader (Bioreader-2000)	Bio-Sys, Karben
FACSAria Zellsorter	Becton Dickinson, Heidelberg
FACScan Durchfluss-Zytometer	Becton Dickinson
Filmentwickler M35-X-OMAT	Kodak, USA
γ-Counter (Wizard, 1470)	Wallac, USA
Gelkammern für Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Keutz, Reiskirchen; BioRAD
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf, Hamburg
Invert-Mikroskop (Modell TMS)	Nikon, Japan
Kühlanlage (Modell K20/DC3)	Haake, Karlsruhe
Magnetrührer	Janke & Kunkel, IKA [®] Labortechnik
	Staufon

```
Mehrbeschichtungsanlage NED 010
Mikropipetten (1000 µl, 100 µl, 10 µl)
Mikrowelle
MidiMACS-Zellseparationssytem
Netzteil für Agarose-Gelelektrophorese
Netzteil für Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR-Thermocycler
```

pH-Meter (WTW pH 537) Photoapparatur für DNA-Gelphotos Pipettierhilfe Raster-Elektronenmikroskop PSEM 500 Schüttelgerät (Vortexer) Schüttelinkubator für Bakterienkulturen Spektralphotometer (Modell U-2000) Sterile Arbeitsbank (Lamin Air HB 2448) UV-Tisch

Wasserbad Wasserdeionisierungsanlage (Milli-Q-Plus) Zentrifugen

k, Staufen Baltec, Schalksmühle Eppendorf Panasonic Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach **BioRAD** Consort, München Hybaid OmniGene, Hybaid Ltd., Middlesex, England Labotec, Wiesbaden Mitsubishi, Tokio, Japan Hirschmann, Eberstadt Fei-Philips, Kassel Janke & Kunkel, IKA[®] Labortechnik Infors AG, Bottmingen, Schweiz Hitachi, Japan Heraeus Instruments Internat. Biotechnologies, New Haven, CT, USA GFL, Burgwedel

Modell 5415C, Eppendorf; Biofuge 13R, Megafuge 2.0R und Suprafuge 22, Heraeus Instruments

2.1.7 Plastik- und Glaswaren

Alle mit * versehenen Waren wurden steril bezogen.

Cellolate (Glasplättchen)	Eppendorf
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Einfrierröhrchen für Zellen (1,8 ml)*	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvetten (0,4 cm Schichtdicke)*	Eurogentec, Seraing, Belgien
ELISPOT-Platte	
FACS-Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson
Gewebekulturflaschen (50 ml und 250 ml)*	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (6 oder 24 Vertiefungen)*	Greiner
Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen)*	Greiner
(Flach- und Rundboden)	
Kanülen*	Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer	Brandt, Melsungen
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (Ø 35 mm; Typ 1008)*	Falcon
Petrischalen (Ø 90 mm) [*]	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg;
	Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich
Pipettenspitzen (gestopft) für PCR	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)*	Sarstedt
Platten für die Proteinbestimmung	Greiner
(96 Vertiefungen)	
Platten für ELISA (MaxiSorb Immuno Plate;	Nunc
96 Vertiefungen)	
Quarzküvetten	Hellma
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Safelock-Reaktionsgefäße (0,5 ml und 1,5 ml)	Eppendorf
Schnappdeckel-Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson
Spritzen (2 ml, 5 ml, 50 ml)*	Brandt
Sterilfilter $(0,22 \ \mu m)^*$	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkultureinsätze für Gewebekulturplatte	Nunc
(24 Vertiefungen)	
Zellkultureinsätze (Transwells)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (Spitzboden; 15 und 50 ml) *	Falcon
(Rundboden; 5 ml)*	Falcon

2.1.8 Material für molekularbiologische Arbeiten

2.1.8.1 Reagenzien

Agarose	Biomol, Hamburg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein
DNA-Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas
(100 bp-Leiter, 100 bp plus, 1 kB-Leiter)	
Ethidiumbromid	Sigma
Glykogen	Sigma
Mineralöl	Sigma
Oligo(dT)15-Primer	Boehringer
PCR Taq-DNA-Polymerase	MBI
Proteinpräzipitations-Lösung	Gentra, USA
SuperScript Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
(SUPERSCRIPT TM II)	
TRI Reagent [®]	Molecular Research Center, Cincinnati,
	OH, USA
Zell-Lysis-Puffer	Gentra

2.1.8.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

<u>Desoxyrib</u>	onukleotid-Gemi	sch (dNTPs)) für die PCR
2 mM	dATP		
2 mM	dTTP		
2 mM	dCTP		

2 mM dGTP

 \rightarrow in autoklaviertem Aqua dest.

Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTPs) für die Reverse Transkription

10 mM	dATP
10 mM	dTTP
10 mM	dCTP
10 mM	dGTP

 \rightarrow in autoklaviertem Aqua dest.

6x DNA-Beladungspuffer für die Agarose-Gelelektrophorese

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

DNA-Molekulargewichtsmarker 100 bp-Leiter

 $83 \ \mu g/ml$

DNA-Molekulargewichtsmarker 1 kb-Leiter

83 µg/ml

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml

Oligo(dT)15-Primer-Lösung für die Reverse Transkription

 $8 \, \mu M$

Proteinase K-Stock

20 mg/ml

10x TBE-Puffer

0,89 M	TrisBase
0,89 M	Borsäure
20 mM	Na2EDTA x 2H2O

 \rightarrow auf pH 8,0 einstellen

2.1.9 Material für biochemische Arbeiten

2.1.9.1 Reagenzien

Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Roth
BSA (Peroxidase-frei)	Serva, Heidelberg
Centricon-Filter YM-10 (10 kD)	Millipore, Bedford, MA, USA
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
Dialyse-Schlauch (Typ 27/32)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia
Filmkassette (18 cm x 24 cm)	Siemens, München
Hybond-ECL-Nitrozellulose-Membran	Amersham Pharmacia
Hyperfilm-ECL	Amersham Pharmacia
Imidazol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma
Milchpulver	Nestle, Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRAD, München
Protein-A/G-Säule	Pierce
Proteinase-Inhibitor-Tabletten ("Complete")	Boehringer, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard (10 kD-Leiter)	Gibco BRL, Eggenstein
Protein-Molekulargewichtsstandard ("prestained")	Gibco BRL
Streptavidin-HRPO	DAKO, Glostrup, Dänemark
Triton-X-100	Sigma
Trocknungsfolien für PA-Gele (Large Cellophane)	Novex, San Diego, CA, USA
Tween-20	Sigma
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.9.2 Puffer und verwendete Stammlösungen

Zum Ansetzen aller im folgenden genannten Puffer und Stammlösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, doppelt destilliertes Wasser (Aqua dest.) verwendet.

Ammoniumpersulfat-Stammlösung

10%

5x Beladungspuffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

50 mM	Tris
2%	SDS
5%	Glycerin
0,1 M	DTT
0,03%	Bromphenolblau

 \rightarrow auf pH 6,8 einstellen

10x CAPS-Puffer

22,13 g	CAPS in 900 ml ddH ₂ O
pH-Wert	mit 5 M NaOH auf pH 11 einstellen

 \rightarrow ad 1 l Aqua dest

1x CAPS-Puffer

100 ml 10x CAPS-Puffer 100 ml Methanol → ad 1 l mit Aqua dest

10x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

250 mM	Tris
2,5 M	Glycin
1%	SDS

 \rightarrow auf pH 8,3 einstellen

Natriumthiosulfat-Stammlösung

430 mg	Na2S2O3x5H2O
5 ml	Aqua dest

4x Sammelgel-Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

0,5 M	Tris
0,4%	SDS

 \rightarrow auf pH 6,8 einstellen

4x Trenngel-Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1,5 M	Tris
0,4%	SDS

 \rightarrow auf pH 8,8 einstellen

Triton-Lysispuffer

137 mM	NaCl
50 mM	Tris
1 mM	Orthovanadat
2 mM	EDTA
10%	Glycerin
1%	Triton-X-100

 \rightarrow + 1 Proteinase-Inhibitor-Tablette pro 100 ml Puffer

2.1.10 Material für zellbiologische Arbeiten

2.1.10.1 Reagenzien

Aminoguanidin	Sigma
BSA (Peroxidase-frei)	Serva, Heidelberg
Chrom 51 ⁺ (1mCi/ml)	Amersham Pharmacia
Cohn-II (gamma-Globuline)	Sigma
CMFDA (5-Chloromethylfluoreszin-	Molecular Probes, Eugene, OR
diacetat)	
CPRG (Chlorophenol rot-β-D-galaktopyranosid)	Roche, Mannheim
Diethylether	Merk
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma
Gentamycin	Gibco BRL
Glutaraldehyd	Sigma
L-Glutamin	Gibco BRL
LPS	PharMingen, Hamburg
LS ⁺ -Separationssäulen	Miltenyi Biotec
MACS anti-FITC-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Metofan	Janssen-Cilag, Neuss
murines IFN-γ	PharMingen
murines IL-2	PharMingen
Naphtylethylendiamin	Sigma
Nonidet-P40	ICN Biomedical, Aurora, Ohio
Osmium Tetraoxid	Plano
Peroxidase-Blocking-Reagenz	DAKO
Paraformaldehyd (PFA)	Serva
Phosphorsäure	Merk
poly I:C (Polyinosinic-Polycytidylic Säure)	Sigma
Poly L-Lysin	Sigma
Propandiol (2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol)	Sigma
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA, Cölbe
Sulfanilamid	Sigma
Schwefelsäure	Merk
Streptavidin-HRP	DAKO
Strontiumchlorid	Sigma
Trypanblau	Serva
Wachsstift	DAKO

2.1.10.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

Fötales Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren vor Gebrauch für 45 Minuten auf 56°C erhitzt und bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

RPMI-Zellkulturmedium mit 10% FCS ("Vollmedium")

500 ml	RPMI 1640 ohne L-Glutamin
50 ml	FCS
10 ml	L-Glutamin (200 mM)

 \rightarrow Lagerung bei 4°C

Einfriermedium

20 ml	Vollmedium
25 ml	FCS
5 ml	DMSO

CMFDA-Stammlösung

10 mM in DMSO

CPRG-Stammlösung

1 mM in PBS 0,1% Nondet-P40

Cohn-II-Stammlösung

10 mg/ml in 1x PBS

ELISA-Oberflächenpuffer

Lösung A: 10 mM Na₂CO₃ Lösung B: 20 mM NaHCO₃

 \rightarrow Lösung B wird zu 70 ml Lösung A gegeben, bis pH 9,6 erreicht ist

ELISA- Substratpuffer

100 mM NaH2PO4

 \rightarrow auf pH 5,5 einstellen

ELISA-Substratlösung

200 µl	TMB-Stammlösung
1 0 1	

- 1,2 μl H2O2 (30%ig)
- 12 ml Substratpuffer

 \rightarrow stets frisch ansetzen

ELISA-TMB-Stammlösung

30 mg Tetramethylbenzidin (TMB) in 5 ml DMSO

ELISpot-Oberflächenpuffer

100 mM NaHCO₃

 \rightarrow auf pH 9,2-9,5 einstellen

ELISpot-Substratlösung

10 ml 100 mM Tris pH 7,5 200 μl DAB-Stock (40 mg/ml)

50 μ l NiCl₂-Stock (80 mg/ml)

 \rightarrow Puffer steril filtrieren und 5 $\mu l \; H_2O_2$ zufügen

Erythrozyten-Lysis-Puffer (Gey's Lösung)

0,83%	NH4Cl
	\rightarrow mit Tris-HCl (pH 9) auf pH 7,5 einstellen

FACS-Puffer

1%	FCS
0,05%	NaN3

 \rightarrow in 1x PBS

Griess-Stammlösungen

- Lösung 1: 1% Sulfonamid 2,5% Phosphorsäure
- Lösung 2: 0,1% Naphtylethylendiamin 2,5% Phosphorsäure

LIT-Medium

Hemin-Lösung:
 25 mg in 5 ml 0,01 M NaOH

 \rightarrow 2 Stunden bei 30°C schütteln

 \rightarrow 20 min bei RT und 15.000 rpm zentrifugieren

2. Leberpulver-Lösung

5,0 g Difco-Leberpulver in 50 ml Aqua dest.

- \rightarrow 1 Stunde bei 50°C rühren; 5-10 min bei 95°C
- \rightarrow 20 min bei RT und 3500 rpm zentrifugieren
- 4,0 g NaCl 0,4 g KCl 8,0 g Na₂HPO₄ 2,0 g Glukose 5,0 g Tryptose

 \rightarrow in 900 ml Aqua dest.

- + 5 ml Hemin-Lösung
- + 50 ml Leberpulver-Lösung
- + 50 ml FCS

 \rightarrow steril filtrieren

MACS(magnetic cell sorting)-Puffer

2 mM	EDTA
1%	BSA

 \rightarrow in 1x PBS

20x Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

180 g/l	2,7 M	NaCl
35 g/l	0,2 M	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
5.44 g/l	0,4 M	KH ₂ PO ₄

 \rightarrow auf pH 7,4 einstellen

Trypanblau-Stammlösung

2 mg in 100 ml PBS

2.2 Methoden

2.2.1 In vivo-Infektion

2.2.1.1 Infektion der Mäuse mit Trypanosoma cruzi

Der *T. cruzi*-Stamm Tulahuen wurde durch 10 bis14 tägige Mauspassagen in 4 bis 6 Wochen alte männliche Balb/c Mäuse *in vivo* erhalten. Zur Erhaltung wurde mit Ether betäubten infizierten Mäusen durch Herzpunktion Blut entnommen und nicht-infizierten Balb/c-Mäusen intraperitoneal (i.p.) inokuliert.

Für die Untersuchung des Parasitämieverlaufes wurde ebenfalls Herzblut gewonnen und die Parasitenzahl im Blut bestimmt, wobei die Zählung störende Erythrozyten durch Zugabe von Erythrozyten-Lysis-Puffers eliminiert wurden. Daraufhin wurden die Parasiten auf eine Anzahl von 2 x 10^5 *T. cruzi*/ml (bzw. 5 x 10^3 *T. cruzi*/ml) mit sterilem PBS eingestellt, was einer sublethalen Dosis von $1x10^4$ *T. cruzi* in 50 µl (bzw. einer nicht lethalen Dosis von 250 *T. cruzi*) entspricht und 4 bis 6 Wochen alten männliche C57BL/6 Mäuse subkutan in die Fußsohle injiziert.

2.2.1.2 Bestimmung der Parasitämien

NK-Zellen wurden beschrieben als die Zellpopulation, die sehr schnell und als erste Lymphozyten-Population in einer *T. cruzi*-Infektion mit der Freisetzung von IFN- γ antworten kann (siehe Einleitung).

Um die Notwendigkeit einer Beteiligung von NK-Zellen an der Immunantwort in der frühen akuten Phase einer *T. cruzi*-Infektion zu untersuchen, wurden NK-Zell-defiziente C57BL/6 Mäuse in den Experimenten verwendet. Grundsätzlich kann diese Defizienz auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden: Zum einen durch ein Ausschalten der entsprechenden Gene in der Keimbahn, sodass sich keine NK-Zellen entwickeln können und zum anderen durch Applikation von spezifischen Antikörpern, sodass die "markierten" Zellen von phagozytischen Zellen erkannt und eliminiert werden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde auf die letztere Methode zurückgegriffen. Die Depletion durch Antikörper hat den Vorteil, dass die behandelten Mäuse sich nicht von den unbehandelten Kontroll-Mäusen unterscheiden und nicht etwa einen differenzierten Phänotyp entwickeln, wie es bei genetisch veränderten Mäusen der Fall sein könnte. Der Nachteil dieser Methode liegt in der nicht kompletten Depletion aller NK-Zellen.

Die NK-Zellen wurden mit Antikörpern, die gegen das Asialo-GM1-Molekül gerichtet waren, depletiert. Das Asialo-Molekül ist auf mehreren Zelltypen expremiert, dennoch konnte eine spezifische Depletion der NK-Zellen mittels diesen Antikörpers *in vivo* beschrieben werden (Emoto & Kaufmann, 2003).
Die Antikörper wurden C57BL/6 Mäusen in 50 μ l PBS einen Tag vor der Infektion, mit der Infektion und drei bzw. sieben Tage nach der Infektion i.p. injiziert. Zur Kontrolle wurde eine zweite Gruppe mit 50 μ l PBS i.p. behandelt. Jede Gruppe bestand aus fünf Tieren. Die Infektion erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

Die Parasitämie wurde ab dem siebten Tag nach Infektion alle drei bis vier Tage durch Auftragen eines Tropfen Blutes, der aus der angeschnittenen Schwanzspitze der Maus gewonnen wurde, auf einem Objektträger durch Auszählen von 100 Gesichtsfeldern in einer 400fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch bestimmt. Dabei entsprach eine Anzahl von durchschnittlich einem Parasiten pro Gesichtsfeld einer Parasitämie von 1x10⁶ *T. cruzi*/ml Blut (Schuster & Schaub, 2000).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen (in RPMI-Medium) wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Labormaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden in feuchter Hitze für 20 min bei 135°C und 2 bis 2,2 bar autoklaviert. Glasgeräte wurden bei 180°C für 3 Stunden sterilisiert. Zur Pelletierung eukaryontischer Zellen wurden diese bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert.

2.2.2.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurde ihnen durch Zugabe des stark hydroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam Wasser entzogen. Mindestens 5 x 10^6 Zellen und max. 2 x 10^7 Zellen wurden auf Eis in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Einfrierröhrchen überführt und auf -70°C abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Nach dem schnellen Auftauen kryokonservierter Zellen bei 37°C müssen diese mit Kulturmedium gewaschen werden, um das toxische DMSO zu entfernen.

2.2.2.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zahl der lebendigen Zellen wurde der Trypanausschlußtest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus, während tote Zellen blau gefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

2.2.2.4 In vitro Trypanosomen Kulturen

2.2.2.4.1 Zellkultur von trypomastigoten Parasiten

Die Stammerhaltung in Mäusen hat den Vorteil mit Bluttrypomastigoten weitere Mäuse infizieren zu können, sodass eine kontinuierliche Infektiösität gesichert ist. Für *in vitro* Versuche eigenen sich diese Parasiten nicht, da die Anpassung an *in vitro*-Bedingungen sehr schwanken können. Außerdem wäre ein unnötig hoher Verbrauch an Mäusen erforderlich. Deshalb wurde auf extrazelluläre trypomastigote *T. cruzi* zurückgegriffen, die einer Zellkultur entstammten. Zur Erhaltung dieser Kultur wurden Fibroblasten der Zelllinie L929 (Westfall, 1961), die in einer 50 ml Gewebekultur-Flasche zu einem einschichtigen Zellrasen gewachsen waren, mit Bluttrypomastigoten infiziert und durch regelmäßige Passagen von trypomastigoten Parasiten im Kulturüberstand der infizierten Kultur auf nicht infizierte L929 übertragen.

2.2.2.4.2 Zellkultur von epimastigoten Parasiten

Für einige Versuche wurden epimastigote *T. cruzi* eingesetzt (siehe Einleitung). Diese Zyklusformen wurden in einem sogenannten LIT (Liver-Infusion-Tryptose)-Medium bei 27°C und normalem CO₂-Gehalt generiert. Blutrypomastigote wurden in 10 ml LIT-Medium mit 10% FCS in einem Zentrifugenröhrchen aufgenommen und alle drei Tage 5 ml des Mediums ausgetauscht. Nach 10 bis12 Tagen wurden 0,5 ml der Kultur in 5 ml LIT-Medium mit 5% FCS überführt. Diese Passage wiederholte sich alle 5 bis 6 Tage. Zur exponentiellen Anzucht der Trypanosomen und um die prozentualen Anteile anderer Zyklusstadien zu minimieren, wurden 2 ml der Epimastigoten in eine 250 ml Gewebekulturflasche überführt und in 30 ml LIT-Medium aufgenommen, wovon 20 ml jeden dritten Tag ausgetauscht wurden. Nach 10 Tagen erfolgte der Einsatz der Trypanosomen in den entsprechenden Experimenten.

2.2.2.5 Gewinnung einer Milzzell-Suspension

Um die Reaktion von Lymphozyten und NK-Zellen im speziellen in unterschiedlichen Fragestellungen *in vitro* untersuchen zu können, wurden diese Zellen aus präparierten Milzen gewonnen.

Dafür wurde eine 23G-Kanüle in die präparierte Milz eingeführt und die Lymphozyten mit 3 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer ausgespült, um diese möglichst vollständig von den strukturgebenden Zellen, wie z.B. Retikularfibroblasten und Zellen der Milzkapsel zu trennen. Nach kurzer Inkubation von 2 bis 3 min wurde die Erythrozyten-Lyse mit 5 ml Medium gestoppt, die Zellen dreimal gewaschen und gezählt. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Zellen für alle Experimente in einer 6-well-Gewebekulturplatte über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.6 Vorbehandlung der Milzzellen

Nach Isolierung der Lymphozyten (siehe 2.2.2.5) wurden die Milzzellen, bevor sie über Nacht inkubiert wurden, mit verschiedenen Substanzen versetzt, um unterschiedliche Fragestellung zu bearbeiten. Die vorrangigste Behandlung war die Stimulation mit 0,2 mg/ml poly I:C, einer Substanz, die doppelsträngige RNA imitiert, an Toll-Like-Rezeptor 3 bindet und dadurch eine allgemeine Aktivierung der Milzzellen auslöst. Daneben kamen aber noch folgende Substanzen zum Einsatz:

Anti-IFN-γ (Klon XMG 1.2, neutralisierende Wirkung): 30 μg/ml

Anti-NKG2D (Klon 191004): 30 µg/ml

Anti-IL-12 (Klon C17.8): 10 μg/ml

Aminoguanidin (Hemmung der induzierbaren NO-Synthetase, iNOS): 5 mM

Strontiumchlorid (SrCl₂, verursacht eine Degranulierung von zytotoxischen Zellen): 25 mM.

Bis auf das SrCl₂ wurden die im Medium gelösten Substanzen zusammen mit den Milzzellen in den jeweiligen Experimenten eingesetzt. Die mit SrCl₂ vorinkubierten Milzzellen und die entsprechenden Kontrollen wurden vor der Inkubation mit den Trypanosomen gewaschen und in normalem Medium aufgenommen.

Der Anti-NKG2D-Antikörper wurde erst kurz (30 min) vor der Inkubation mit den Trypanosomen zu der Milzzellsuspension gegeben.

2.2.2.7 Analyse der Aktivierung von NK-Zellen im Chrom-Freisetzungs-Test

Aktivierte NK-Zellen zeigen neben erhöhter Zytokinausschüttung ein gesteigertes Maß an Zytotoxizität. Mit Hilfe von Zellen, die aufgrund einer stark verminderten Expression von MHC-I Molekülen auf ihrer Zelloberfläche von NK-Zellen als "nicht-selbst" erkannt und lysiert werden, kann der Aktivierungsgrad von NK-Zellen bestimmt werden (siehe Einleitung). Yac-Zellen besitzen kaum MHC-I-Moleküle und eignen sich daher als Zielzellen. Werden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom inkubiert, dringt das Isotop in die Zelle ein und bildet eine derart große Hydrathülle, dass es nicht mehr aus der Zelle austreten kann. Eine

Freisetzung des Isotops erfolgt demnach nur, wenn die behandelte Zelle zerstört wird. Die Freisetzung des Isotops kann deshalb als Maßstab für eine erfolgte Lyse der Zellen gelten.

 5×10^{6} Milzzellen einer C57BL/6-Maus wurden über Nacht entweder mit 0,2 mg/ml poly I:C stimuliert oder mit 5×10^{5} extrazellulären trypomastigoten *T. cruzi* inkubiert. Als Kontrolle dienten Lymphozyten, die nur in Medium inkubiert wurden. Kurz vor Zugabe der radioaktiv-markierten Yac-Zellen wurden 100 µl der Milzzell-Suspension, ausgehend von 2 x 10^{5} Zellen/well, im Verhältnis 1:2 in sechs Stufen in eine 96-well-Rundbodenplatte verdünnt.

1-3 x 10^6 Yac-Zellen, die sich in der exponentiellen Phase befanden, wurden in einem Schnappdeckel-Röhrchen 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. In den Rücklauf (ca. 200µl) wurden 100 µl radioaktives Chrom 51 (Cr⁵¹⁺) pipettiert (aus 1 mCi/ml-Stock-Lösung (entspricht 0,1 mCi)) und eineinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 37°C warmen Medium gewaschen und 2000 Zellen (in 100 µl) zu den bereits vorgelegten Lymphozyten gegeben. Die Lymphozyten und radioaktiv-markierten Yac-Zellen wurden vier Stunden zusammen inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl des gemeinsamen Kulturüberstandes vorsichtig abgenommen und die im Überstand enthaltene Radioaktivität im γ -Counter analysiert.

2.2.2.8 Durchfluss-Zytometrie (FACS)

2.2.2.8.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für durchfluss-zytometrische Messungen (FACS)

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren oder die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchfluss-zytometrische Messungen (FACS, Fluorescence activated cell sorter) durchgeführt.

Je Färbung wurden zwischen 2 x 10^5 und 1 x 10^6 Zellen, die zuvor in FACS-Puffer aufgenommen und zweimal gewaschen wurden, in ein FACS-Röhrchen pipettiert und abzentrifugiert. Die Fc-Rezeptoren der Zellen wurden mit 20 µl Cohn-II (20 µg/ml) auf Eis für 15 min blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. 1 µl des primären oder direkt markierten Antikörpers wurde in 50 µl FACS-Puffer zugefügt und für 30 min auf Eis oder 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper (1 µl in 50 µl FACS-Puffer, nur im Fall von unmarkierten primären Antikörpern) zugegeben und 30-60 min auf Eis oder bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung des Fluoreszenzkonjugierten Sekundär-Antikörpers zu beurteilen, wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 200 µl 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und nach 60 min Inkubation bei 37°C bzw. bei 4°C über Nacht ausgewertet. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers (FACScan Flow Cytometer) unter Verwendung der dazugehörigen Software (CellQuest, Becton Dickinson, Heidelberg).

2.2.2.8.2 Sortieren von fluoreszenz-markierten Zellen

Durch die Markierung von Oberfächenmolekülen auf Zellen durch fluoreszierende Antikörper können die Zellen nicht nur quantitativ ausgewertet werden, sondern auch selektioniert werden. Diese "Sortierung" der Zellen erfolgt in einem sogenannten "FACS-Sorter", der schematisch wie folgt funktioniert: Die Zellen werden in einzelnen Tropfen aufgenommen, deren Volumen so gering ist, dass sich in jedem Tropfen nur eine Zelle befindet. Die Fluoreszenz dieser Zelle wird wie in einem Durchfluss-Zytometer mit einem Laser bestimmt und je nach emitierter Wellenlänge wird der Tropfen elektrostatisch aufgeladen. Die Stärke und Art der Ladung unterscheidet sich abhängig von der Fluoreszenz der markierten Zellen. Die aufgeladenen Tropfen mit den Zellen durchwandern anschließend ein elektrisches Feld indem sie je nach Beschaffheit ihrer Oberflächenladung abgelenkt und die Zellen voneinander getrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig T-Zellen aus einer Milzzellsuspension sortiert, wobei die Reinheiten konstant über 96%, oft über 98% lagen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben gefärbt und nach dem Sortieren zentrifugiert und erneut in Medium aufgenommen, um sie in den Versuchen einzusetzen.

2.2.2.9 Messung von CMFDA-markierten Zellen im FACS

Die Färbung von Zelloberflächenmolekülen gibt Aufschluss über einige Charakteristika der untersuchten Zellen, nicht jedoch, ob die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung lebend oder tot waren. Diese Unterscheidung sollte im Fall der Inkubation von T. cruzi mit Milzzellen jedoch getroffen werden. Trypanosomen internalisieren radioaktives Chrom in zu geringem Maß, als dass eine Untersuchung einer eventuellen Lyse im oben beschriebenen Test möglich wäre (siehe 2.2.2.7). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, mit der sich die Lyse in einem Durchfluss-Zytometer untersuchen läßt. Dazu werden kulturtrypomastigote T. cruzi mit dem Fluoreszenz-Farbstoff 5-Chloromethylfluoreszin-diacetat (CMFDA) markiert. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen in der Ausgangsform nicht fluoreszierenden Ester, der ungehindert in eine Zelle diffundieren kann. Im Zytosol der Zelle wird CMFDA durch dort ubiquitär vorhandene Esterasen gespalten und dadurch in eine fluoreszierende Form umgewandelt. Das gespaltene Molekül ist stark hydrophil, sodass sich eine Hydrathülle um CMFDA bildet, die eine Diffusion aus dem Zytosol und Interaktionen mit Membranen verhindert. Aufgrund dieser Eigenschaften können nur vitale Zellen mit CMFDA angefärbt und im Fall einer Aufhebung der Membranintegrität ein Entweichen von CMFDA durch hydrophobe Wechselwirkungen nicht unterbunden werden.

Für die Versuche wurden 1 x 10^8 *T. cruzi* in FCS-freiem Medium aufgenommen und für 10 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Das Pelett wurde in 1 ml FCS-freiem Medium resuspendiert. 200 µl der Suspension wurden abgenommen und als unmarkierte Probe zurückbehalten. Zu den restlichen 800 µl wurden 200 µl einer 20 µM CMFDA-Lösung (aus

einer 10 mM Stock-Lösung) pipettiert und für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, in warmen 5% igem Medium aufgenommen und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Parasiten auf 1 x 10^7 /ml eingestellt. 100 µl (entsprach einer Absolutzahl von 1 x 10^6 *T. cruzi*) wurden zu 1 x 10^7 unbehandelter oder mit poly I:C bzw. SrCl₂ (siehe 2.2.2.6) vorbehandelter C57BL/6 Milzzellen in 500 µl in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 10 min und 1200 rpm zentrifugiert und einmal in FACS-Puffer gewaschen, bevor sie mit 200 µl 4% Paraformaldehyd fixiert und im FACScan-Durchfluss-Zytometer analysiert wurden.

Für die Analyse der NK-Zell–Trypanosomen-Komplexe wurden 7 x 10^5 CMFDAmarkierte *T. cruzi* zu 2 x 10^6 Milzzellen von SCID-Mäusen pipettiert. Die Milzzellen waren entweder unbehandelt oder mit poly I:C stimuliert, alle waren aber mit einem PE-markierten Antikörper gegen das DX5-Molekül auf NK-Zellen gefärbt. Im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen wurden die SCID-Milzzellen nur eine Stunde auf Eis mit den Trypanosomen inkubiert und dann mit 4% PFA für 2 Stunden fixiert, bevor sie sofort im FACS analysiert wurden.

2.2.2.10 Bestimmung der Parasitenlast einer in vitro-Fibroblasten-Kultur

T. cruzi infiziert im Säugerwirt eine Vielzahl von Zelltypen, sodass neben konditionierten professionellen APZ, die dem Organismus ein Eindringen von Pathogenen signalisieren, auch Zellen im Bindegewebe, wie z.B. Fibroblasten, infiziert werden, die eingeschränkt immunkompetent sind. Dennoch können diese Zellen aktivierten Lymphozyten die Invasion mit *T. cruzi* signalisieren. Um zu untersuchen, ob auch in diesen Zellen Effektormoleküle induziert werden können, die zu einer Reduzierung der Anzahl intrazellulärer *T. cruzi* führen, ist ein System von nöten, mit dessen Hilfe die Parasitenlast in infizierten Zellen ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurden dazu *T. cruzi* des Tehuantepec-Stammes verwendet, die mit einem lacZ-Gen transfiziert waren, wobei die von den transfizierten Trypanosomen produzierte β -Galaktosidase das Substrat CPRG zu einer violetten Färbung umsetzt, die photometrisch auswertbar ist. Die Intensität der Färbung korreliert dabei mit der Anzahl der sich in Kultur befindlichen *T. cruzi*. Als Wirtszellen wurden Fibroblasten der Zelllinie L929 eingesetzt, bei der es sich um eine Fibroblasten-Tumorzelllinie aus einem CBA/j-Mausstamm handelt. 3-5 x 10^4 L929 wurden in 1 ml Medium in 24 well-Gewebekulturplatten zu einem bodenbedeckenden, einschichtigem Zellrasen kultiviert und nach drei bis vier Tagen mit 5 x 10^5 kultur-trypomastigoten *T. cruzi* infiziert, wobei das Medium vollständig erneuert wurde. Nach drei Tagen wurde die Zellkultur mit Medium gewaschen, um extrazelluläre Trypanosomen zu entfernen und Milzzellen von CBA/j-Mäusen bzw. SCID-Mäusen zur Kultur hinzugefügt. Diese Zellen wurden unter unterschiedlichen Edingungen mit den infizierten Fibroblasten inkubiert: unbehandelt bzw. mit poly I:C stimuliert, ferner mit

blockierenden Substanzen (z.B. Aminoguanidin) vorinkubiert (siehe 2.2.2.6) oder in Zellkultur-Einsätzen (sog. Transwells). Diese verhindern durch eine 0,2 µm-Membran einen direkten Kontakt der Milzzellen mit den infizierten Zellen, lösliche Faktoren wie Zytokine werden aber in ihrer Wirkung nicht inhibiert. Das Kulturmedium wurde in der Co-Kultur auf 2 ml erhöht und nach zwei Tagen wurden 200 µl Medium abgenommen und durch 200 µl einer 1 mM CPRG-Stammlösung (Endkonzentration 100 µM) ersetzt. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Färbung photometrisch im ELISA-Reader bei 560 nm mit 630 nm als Referenzwert analysiert. Der abgenommen Medium-Überstand wurde im ELISA auf Zytokine (siehe 2.2.2.11) bzw. im Griess-Test auf NO untersucht (siehe 2.2.2.12).

2.2.2.11 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit Hilfe des ELISAs lassen sich einzelne in einer Lösung befindliche Proteine spezifisch quantifizieren. In der Immunologie wird dieser Test hauptsächlich genutzt, um die Menge verschiedener Zytokine in Zellüberständen oder spezieller Antikörper im Blut zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zytokine Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN)-γ im Überstand einer *in vitro* Co-Kultur von Milzzellen mit infizierten Fibroblasten mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Der ELISA wurde aber auch bei anderen Fragestellungen eingesetzt, allerdings mit unverändertem Versuchsprotokoll.

Die Quantifizierung der Zytokine IL-12 und IFN-y in den Überständen erfolgte mit Hilfe eines sogenannten "Sandwich"-ELISAs. Dazu wurde ein für das entsprechende Zytokin spezifischer Antikörper in Oberflächenpuffer verdünnt (anti-IL-12: 2 µg/ml bzw. anti-IFN-y: 2 µg/ml Endkonzentration) und durch Inkubation über Nacht bei 4°C an die Böden der Vertiefungen einer speziellen Platte (MaxiSorb Immuno Plate) immobilisiert (50 µl je Vertiefung). Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween-20 in 1x PBS wurden noch unbesetzte Bindungsstellen durch zweistündiges Inkubieren bei RT in 1% BSA (Peroxidasefrei) in 1x PBS blockiert (200 µl je Vertiefung), um eine unspezifische Bindung des zu quantifizierenden Cytokins an den Plattenboden zu vermeiden. Anschließend wurden die Vertiefungen entleert und die zu untersuchenden Überstände hineinpipettiert. Dabei wurden jeweils 50 µl Überstand je Vertiefung eingesetzt und zur späteren Auswertung des Versuchs jeweils eine Standardreihe des zu messenden Zytokins in Form von Doppelwerten mitgeführt (ausgehend von einer Konzentration von 4 ng/ml IL-12 bzw. 8 ng/ml IFN-γ). Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde viermal in 0,05% Tween-20 in 1x PBS gewaschen und der zweite, biotinylierte Antikörper, verdünnt in 0,1% BSA (Peroxidase-frei) in 1x PBS, zu jeweils 50 µl in die Vertiefungen pipettiert (anti-IL-12-Biotin: 0,5 μg/ml bzw. anti-IFN-γ -Biotin: 0,5 μg/ml Endkonzentration). Der Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann fünfmal in 0,05% Tween-20 in 1x PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 50 µl HRP-konjugiertes Streptavidin (0,05 U/ml in 0,1% BSA in 1x PBS) in jede Vertiefung pipettiert und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen in 0,05% Tween-20 in 1x PBS erfolgte die Zugabe von farbloser,

frisch angesetzter Substratlösung (100 μ l/Vertiefung), welche sich in Abhängigkeit von der in den verschiedenen Vertiefungen befindlichen HRP-Menge blau verfärbte. Bei ausreichender Blaufärbung (d.h. schwache Färbung der Negativkontrolle), spätestens aber nach 20 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 25 μ l 2 M Schwefelsäure-Lösung je Vertiefung gestoppt, wodurch ein Farbumschlag zu Gelb erfolgte. Schließlich wurden die unterschiedlichen Gelbfärbungen mit Hilfe eines ELISA-Readers photometrisch durch Messung der Extinktion bei 450 nm erfaßt und konnten dann anhand der mitgeführten Standardreihe in Zytokinkonzentrationen umgerechnet werden.

2.2.2.12 Quantitativer NO-Nachweis (Griess-Test)

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der wichtigsten Effektormoleküle zur Abwehr von intrazellulären Pathogenen. Anhand der Griess-Reaktion kann der Gehalt an produziertem NO in Kulturüberständen nachgewiesen werden. Das hochreaktive NO wird im Medium sehr schnell zu Nitrit umgesetzt, das mit einem primären aromatischen Amin zu einem Diazonium-Ion reagiert, das in einer Kupplungsreaktion mit einer weiteren aromatischen Komponente zu einem roten Azofarbstoff umgesetzt wird, der spektrophotometrisch bei rund 550 nm ausgewertet werden kann (Griess, 1864).

50 μ l der entnommenen Kulturüberstände (siehe 2.2.2.10) wurden in eine 96 well-Flachbodenplatte pipettiert und eine Doppelwert-Standardreihe mit definiertem NO-Gehalt angelegt. Das Griess-Reagenz wurde frisch aus den Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 angesetzt und 50 μ l zu den Proben gegeben. Je nach NO-Gehalt erfolgte ein sofortiger Farbumschlag und wurde im ELISA-Reader bei 560 nm mit 630 nm als Referenzwert gemessen.

2.2.2.13 ELISpot (Enzyme-linked ImmunoSpot)

Das Prinzip des ELISpots ist dem des ELISA angelehnt, mit dem Unterschied, dass im ELISpot einzelne Zellen auf die Produktion eines Moleküles untersucht werden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen in eine spezielle membran-beschichteten Platte pipettiert, die ein lokales Anheften der Zellen bewirkt. Anschließend können die Zellen mit unterschiedlichen Stimuli inkubiert werden. Nach dem Prinzip des ELISAs ist die Platte zusätzlich mit einem Antikörper vorbehandelt, der spezifisch für das untersuchte Molekül ist, so dass die Moleküle direkt an Ort und Stelle verankert werden. Nach einer individuell festgelegten Inkubationszeit werden die Zellen aus der Platte ausgewaschen und das Protokoll des ELISAs mit für den ELISpot optimierten Puffer-Lösungen angewandt (siehe 2.2.2.11).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob NK-Zellen in An- bzw. Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen von extrazellulären *T. cruzi* zur Bildung von IFN- γ stimuliert werden können. Dazu wurde eine ELISpot-Platte mit 200 µl PBS gespült und über Nacht mit 5 µg/ml anti-IFN- γ -Antikörper in 50 µl Oberflächen-Puffer bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl PBS wurden restliche Bindungsstellen für zwei Stunden mit 1% BSA in PBS bei RT abgesättigt. Folgend wurden 2 x 10⁵ Gesamtmilzzellen einer SCID-Maus und 1 x 10⁵ mit MACS-Beads aufgereinigte NK-Zellen (siehe 2.2.2.14) in 100 µl Medium in die entsprechenden Vertiefungen einer für ELISpots vorpräparierten Platte pipettiert und mit unterschiedlichen Stimuli inkubiert:

- 1. 100 µl Medium
- 2. 1×10^4 kultur-trypomastigote *T. cruzi*
- 3. die gleiche Anzahl toter Trypanosomen (durch 20 min bei 95°C hitzeinaktiviert).

Das Endvolumen in den wells betrug 200 μ l und die Zellen wurden für rund 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und 1 μ g/ml vom biotinyliertem anti-IFN- γ -Antikörper in 50 μ l 0,1% BSA in PBS zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen und 50 μ l Avidin bzw. Streptavidin in der angegebenen Verdünnung in 0,1% BSA in PBS zugefügt; erneute Inkubation von 1-2 Stunden bei RT und erneutes Waschen. Die Entwicklung erfolgte mit der Substratlösung und wurde nach Identifikation der Spots mit Aqua dest. gestoppt und im Bioreader analysiert.

2.2.2.14 Aufreinigung/Depletion von Lymphozyten mit MACS-Beads

In einigen Experimenten sollte die Auswirkung von *T. cruzi* auf isolierte NK-Zellen untersucht werden, wie z.B. im ELISpot oder in der Elektronenmikroskopie (siehe 2.2.2.17). Diese Isolation wurde mit Hilfe von Macs-Beads durchgeführt. Das System basiert auf der spezifischen direkten oder indirekten Kopplung von Zell-Oberflächenmoleküle an magnetische Beads, die in einer metallischen Säule, die einem Magnetfeld ausgesetzt ist, zurückgehalten und so von nicht markierten Zellen getrennt werden können.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die NK-Zellen von SCID-Mäusen durch einen FITC-markierten DX5-Antikörper und einem magnetisch-gekoppelten Antikörper gegen das FITC-Molekül von den APZ getrennt. Dazu wurde die Bindung mit dem ersten Antikörper wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben durchgeführt. Nachdem der ungebundene Überschuss des DX5-Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt worden war, wurden die markierten Zellen in 80 µl kaltem Bead-Puffer aufgenommen, mit 20 µl der Bead-gekoppelten anti-FITC-Antikörper-Suspension versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Eine MS-Säule wurde in den passenden Magnet-Halter eingespannt und mit 500 µl Bead-Puffer äquilibrierte. Anschließend wurden die Zellen mit 400 µl Bead-Puffer aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl Bead-Puffer gewaschen, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen, und nach erfolgtem Durchlauf wurden die NK-Zellen mit 500 µl Medium aus der dem Magnet-Halter entnommenen Säule gespült und zweimal gewaschen. Die Reinheit der NK-Zellen wurde im FACS analysiert und die Zellen direkt in den Experimenten eingesetzt.

2.2.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen aus einem Proteingemisch. Dabei hebt das im Laufpuffer und dem Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) durch Anlagerung an die Proteine deren dreidimensionale Struktur auf und überdeckt gleichzeitig ihre Eigenladung mit einer stark negativen Ladung. Infolgedessen wandern die aufzutrennenden Proteine in einem elektrischen Feld nur in Abhängigkeit von ihrer Größe von der Kathode zur Anode. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) in infizierten L929 in An- und Abwesenheit von Milzzellen untersucht.

Die Fibroblasten wurden mit Triton-Lysis-Puffer, der mit Proteinaseinhibitor versetzt war, lysiert und das Lysat 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde mit 5x Ladepuffer für 5 bis 10 min bei 95°C gekocht und auf Eis abgekühlt. Als Größenstandards wurden 10 µl "prestained" Protein-Molekulargewichtsmarker eingesetzt.

Die Auftrennung der Proben erfolgte dabei stets in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970), bei dem die in einer Probe enthaltenen Proteine zuerst mit Hilfe eines Sammelgels fokussiert und anschließend in einem Trenngel separiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>Sammelgel</u>		Trenngel (10%	<u>o)</u>
3,75 ml	4x Sammelgel-Puffer	7,5 ml	4x Trenngel-Puffer
2,4 ml	Acrylamid-Lösung	10,5 ml	Acrylamid-Lösung
150 μl A	APS-Stammlösung	300 µl	APS-Stammlösung
15 µl	ГЕМЕD	30 µl	TEMED
8,85 ml	Aqua dest	12 ml	Aqua dest.

Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von kleinen Gelen (7x10 cm) und bei 20 mA und unbegrenzter Spannung bei RT, bis das im 5x Beladungspuffer enthaltene Bromphenolblau gerade aus dem Gel herausgelaufen war.

2.2.2.16 Westernblot

Beim Westernblot werden zuvor in einem Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit Hilfe von Antikörpern oder anderen an das Zielprotein bindenden Reagenzien nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der sogenannte "Semidry-Blot" verwendet, um die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose-Membran zu überführen. Dazu wurden fünf Schichten in CAPS-Puffer getränktes Whatmanpapier auf die Kathodenplatte einer Blotting-Kammer gelegt. Darauf wurden dann das Gel und die mit CAPS-Puffer angefeuchtete Nitrozellulose-Membran geschichtet. Es folgten fünf Lagen in CAPS-Puffer getränktes Whatmanpapier, bevor dann die Anodenplatte aufgelegt wurde. Der Blot erfolgte bei 1 mA/cm² Membran und unbegrenzter Spannung für eine Stunde.

Danach wurde die Membran zum Blocken unbesetzter Bindungsstellen auf einem Schüttler mindestens 45 min bei RT in 3% Milchpulver in 1x PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in 0,1% Tween-20 in 1x PBS wurde der Primär-Antikörper (Kaninchen anti-murines iNOS, 1 µg/ml in 1% BSA in 1x PBS) hinzupipettiert und der Ansatz eine Stunde lang bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgten vier Waschschritte in 0,1% Tween-20 in 1x PBS für jeweils 15 min, bevor der Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen), gekoppelt mit HRP, verdünnt in 5% Milchpulver in 1x PBS auf die Membran gegeben wurde. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Membran viermal für je 15 min in 0,1% Tween-20 in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulose rund 1 min in ECL-Lösung inkubiert, vorsichtig und unter Vermeidung von Luftlasen zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und mit einem speziellen ECL-Film bedeckt. Nach 2 min Exposition erfolgte die Entwicklung des Films in einem automatischen Entwickler. In Abhängigkeit von der Stärke der auf dem Film zu erkennenden Signale wurden anschließend weitere Filme für unterschiedliche Dauer der Membran ausgesetzt und entwickelt.

2.2.2.17 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Um die Beschaffenheit von Zellkompartimenten und -strukturen mikroskopisch zu untersuchen reicht die Auflösung der Lichtmikroskopie nicht aus. Zudem kann der Kontrast nicht genügend verschärft werden, um die einzelnen Strukturen voneinander unterscheidbar werden zu lassen. In der Elektronenmikroskopie können beiden Ziele erreicht werden. Durch Anlagerung von hydrophoben, elektronendichten Ionen (wie z.B. Gold oder Osmium) an die Außenmembran kompletter Zellen oder an Membranen der Zell-Kompartimente in geschnittenen Zell-Präparaten können diese Strukturen untersucht werden.

Das Prinzip der Elektronenmikroskopie beruht auf der Streuung eines stark fokussierten Elektronenstrahles, der auf die mit elektronendichten Elementen behandelten Zellproben gelenkt und von diesen reflektiert oder adsorbiert wird. Durch Detektoren kann das Maß der Streuung oder Adsorption analysiert und in ein zweidimensionales Bild umgewandelt werden. Für diese Arbeit wurde die Oberfläche von isolierten Milzzell-Populationen (NK-, CD4- und CD8-Zellen) und den mit den Milzzellen inkubierten Trypomastigoten mit Gold bedampft und in der Raster-Elektronenmikroskopie analysiert. Bei dieser Methode wurde die Streuung des Elektronenstrahles bestimmt, der von der goldbedampften Oberfläche der Zellen

reflektiert wurde. Daraus ließen sich die Interaktionen zwischen den Milzzellen und den Trypanosomen analysieren.

Die poly I:C voraktivierten und anschließend isolierten Lymphozytenpopulationen wurden in 1 ml FCS-freiem Medium für vier Stunden mit epimastigoten T. cruzi in einem Zentrifugenröhrchen inkubiert, wobei die Milzzellen in einem zehnfachen Überschuss vorlagen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml 2%igen Glutaraldehyd in Natrium-Cacodylat-Puffer fixiert. Die fixierten Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf den Rücklauf (rund 200-300 µl) verworfen, sodass eine dichte Zellsuspension entstand, die auf runde, mit 0,1% Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen (Cellocate) aufgetragen wurde. Nach zweistündiger Lagerung in einer feuchten Kammer wurden die Plättchen dreimal mit Natrium-Cacodylat-Puffer gewaschen und 30 min bei 4°C mit 1% Osmiumoxid in Natrium-Cacoldylat-Puffer nachfixiert. Anschließend wurde fünfmal gewaschen. Zur Entwässerung wurden eine aufsteigende Ethanolreihe angesetzt, bei der die Plättchen jeweils 10 min in 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 96% Ethanol bei RT und zum Abschluss noch zweimal 15 min in 100% Ethanol inkubiert wurden. Die "kritische Punkt-Trocknung" wurde mit CO₂ im "Critical Point Dryer" durchgeführt. Die getrockneten Proben wurden auf einen Probenhalter montiert, ungerichtet mit Gold bedampft und im Raster-Elektronenmikroskop (PSEM 500, Philips) betrachtet. Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden von Frau Christel Schmetz im Bernhard-Nocht-Institut angefertigt, wofür Ihr an dieser Stelle herzlich gedankt wird.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die exakte Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte unter Verwendung von 500 μ l Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) in einem Spektralphotometer. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der zu untersuchenden Lösung mit einfach destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Proben-Schichtdicke etwa einer Konzentration von 50 μ g/ml bei doppelsträngiger DNA, 40 μ g/ml bei RNA, langer einzelsträngiger sowie Plasmid-DNA und 30 μ g/ml bei kurzkettigen Oligonukleotiden. Eventuelle Verunreinigungen der DNA oder RNA durch Proteine wurden durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm (A₂₈₀) und der anschließenden Berechnung des Quotienten aus A₂₆₀ und A₂₈₀ ermittelt. Dieser liegt bei sehr reinen DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,95, bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen oder Verunreinigungen mit z.B. Phenol, während höhere Werte anzeigen, daß die Nukleinsäure denaturiert ist.

2.2.3.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktion ist ein in vitro-Verfahren zur enzymatischen Die Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki et al., 1988). Die bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerasen verwenden einzelsträngige DNA als Matrize ("Template") für die Synthese eines neuen, komplementären DNA-Stranges. Als Template eignen sich Oligonukleotide, doppelsträngige DNA oder auch RNA-DNA-Hybride, wie sie bei der Reversen Transkription entstehen. Durch Erhitzen der doppelsträngigen Nukleinsäure auf 95°C denaturiert diese und liegt als einzelsträngige Matrize vor. Anschließendes Abkühlen ermöglicht die Hybridisierung ("Annealing") zweier im Überschuß vorliegender, sequenzspezifischer Oligonukleotide ("Primer") an die Matrize, welche zu dieser komplementär sind und den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die für das Annealing notwendige Temperatur ist in erster Linie von der Primersequenz und -länge abhängig und sollte zwischen 55°C und 65°C liegen, um eine spezifische Amplifikation zu erreichen. Nach dem Annealing erfolgt durch Erhitzen auf 70°C bis 75°C die Verlängerung der Primer in 5'->3'-Richtung ("Elongation") durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, die in diesem Temperaturbereich optimal arbeitet. Die bei der Elongation entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle werden anschließend erneut auf 95°C erhitzt und weiteren Zyklen aus Annealing, Elongation und Denaturierung unterzogen, so daß eine exponentielle Anreicherung erfolgt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die PCR-Reaktionen in einem autoklavierten 0,5 ml Eppendorf-Safelock-Gefäß angesetzt, wobei zur Vermeidung von Kontaminationen gestopfte Pipettenspitzen verwendet wurden, die ebenfalls autoklaviert waren. Ein 25 μ l Einfachansatz enthielt:

x μl	DNA- bzw. cDNA-Template
2,5 µl	Desoxyribonukleotid-Gemisch (2 mM)
2,5 µl	Primer 1 (10 μM)
2,5 µl	Primer 2 (10 μM)
2,5 µl	MgCl ₂
2,5 µl	10x Taq-Reaktionspuffer
1,0 µl	Taq-Polymerase
ad 25 µl	Aquq dest.

Der so zusammengestellte Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in einen Thermocycler überführt. Um sicher zu sein, daß entstandene PCR-Produkte spezifisch waren und nicht von der Amplifikation einer DNA-Kontamination in einem oder mehreren der verwendeten Reagenzien herrührten, wurde bei jedem PCR-Lauf eine sogenannte "Wasserkontrolle" mitgeführt, in der kein Template enthalten war.

Für die Typ-I Interferone bzw. β-Actin wurden folgende Temperatur-Programme verwendet:

Typ-I Interferone

Denaturierung: 5 min 94°C

35 Zyklen:	1 min	95°C
	1 min	62°C
	1 min	72°C
Elongation:	10 min	72°C

ß-Actin

Denaturierung:	3 min	94°C	
35 Zyklen:		30 sec	94°C
		30 sec	62°C
		1 min	72°C
Elongation:		10 min	72°C.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die entstandenen Amplifikate durch Auftrennen eines Aliquots des jeweiligen PCR-Ansatzes in einem Agarosegel detektiert.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden. Sie erfolgt in pH-neutralen Gelen aus Agarose, deren Konzentration je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle zwischen 0,3% und 2,0% liegt. Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE-Gele in entsprechendem Puffer durchgeführt. Um die Gele leichter beladen und außerdem die eigent-lichen Gelläufe verfolgen zu können, wurden die Proben mit 6x DNA-Beladungspuffer versetzt. Zur Bestimmung von Größe und ungefährer Menge einzelner Nukleinsäure-Fragmente wurden jeweils 500 ng DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp plus, 100 bp- bzw. 1 kb-Leiter) mit auf das Gel aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Mole-küle erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, welcher den Gelen zugesetzt wurde (Endkonzentration: 0,2 μ g/ml). Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele in UV-Durchlicht unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

2.2.3.4 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte nach der "acidguanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)"-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987), bei der Zelllyse, Denaturierung und Phenol-Chloroform-Extraktion in einem Arbeitsschritt stattfinden und vorhandene RNasen sofort inaktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde die gebrauchsfertige AGPC-Lösung TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) unter Verwendung RNase-freier Reagenzien sowie autoklavierter gestopfter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.3.5 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, bei der RNA mit Hilfe einer aus Retroviren isolierten DNA-Polymerase, der "Reversen Transkriptase", in komplementäre einzelsträngige DNA ("cDNA") umgeschrieben werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Umschreibung der mRNA aus der präparierten Gesamt-RNA in cDNA unter Verwendung des Enzyms SUPERSCRIPT[™] II und Oligo(dT)₁₅-Primern, welche mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können. Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 4 µl Oligo(dT)₁₅-Primer-Lösung, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl DTT-Lösung (0,1 M) sowie 2 µl dNTP-Gemisch (10 mM) versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 65°C wurde der Ansatz 5 min lang auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Dann wurde 1 µl SUPER-SCRIPT[™] II hinzugefügt und der Ansatz weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Schließlich erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Die so erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.6 Quantitative PCR (TacMan)

Die Methode der PCR erlaubt den Nachweis, ob eine gesuchte DNA- bzw. RNA-Sequenz in einer Probe enthalten ist. Es ist jedoch schwierig mit Hilfe der PCR eine vergleichende Aussage über den Gehalt der gesuchten Sequenzen zu treffen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch der Gehalt genomischer Informationen von *T. cruzi* in unterschiedlichen Geweben untersucht werden und dabei Gewebe von NK-defizienten mit denen von Kontroll-Mäusen verglichen werden. Um dieses zu bewerkstelligen, wurde auf die Methode der TacMan-PCR zurückgegriffen.

Dabei handelt es sich um ein PCR-Verfahren, bei dem neben den üblichen Primern DNA-Sonden verwendet werden, die innerhalb der DNA-Sequenz bindet, die durch die Primer in der PCR vervielfacht wird. Die Sonde ist mit zwei Molekülen gekoppelt, die ebenfalls miteinander verbunden sind. Durch die Bindung an die DNA-Fragmente werden diese Moleküle von der Sonde abgespalten und trennen dadurch auch ihre gegenseitige Bindung. Aus der Dissoziation resultiert eine Fluorenszenz, die mit steigender Anzahl der ungebundenen Moleküle und damit steigender Anzahl replizierter DNA zunimmt. Abhängig von der Menge an ursprünglich eingesetzter DNA erreicht die Fluoreszenz nach unterschiedlicher Zyklenzahl einen definierten Schwellenwert. Das TacMan-PCR-Gerät mißt die entstehende Fluoreszenz und ordnet sie der entsprechenden Zykluseinheit zu, sodass unterschiedliche Proben auf ihren Ausgangswert der untersuchten DNA verglichen werden können. Im Allgemeinen wird der Gehalt an DNA der Organismen, die von Interesse sind mit dem des β -Aktin in der Probe verglichen. β -Aktin ist ein ubiquitäres Protein, das für das Zytoskelett von Bedeutung ist und dessen Gehalt mit dem der eingesetzten Menge an Gewebe-DNA korreliert werden kann. Setzt man den ermittelten Gehalt an Parasiten-DNA vergleichend dagegen, kann eine Aussage getroffen werden, wie stark das jeweilige Gewebe von einem Parasiten befallen ist.

Zu Beginn der Untersuchung muß der Gewebeverband durch Kollagenase-Verdau gespalten werden und die erhaltenen einzelnen Zellen lysiert werden. Anschließend wird die DNA aus dem Lysat extrahiert und als Template in der TacMan-PCR eingesetzt.

Mit T. cruzi infizierten C57BL/6-Mäusen wurden nach unterschiedlicher Infektionsdauer (12 dpi, 30 dpi und ein Jahr nach Infektion) Proben des Herzens, der Leber, der Milz, der Lymphknoten und der quergestreiften Skelett-Muskulatur entnommen und mechanisch mit einem Stempel zerrieben. Die Gewebe entstammten Mäusen, deren NK-Zellen zuvor mit dem polyklonalen anti-Asialo GM-Antikörper depletiert worden waren bzw. unbehandelten Kontroll-Mäusen (siehe 2.2.1.1 und 2.2.1.2). Das zerkleinerte Gewebe wurde in 1 ml Zell-Lysis-Puffer aufgenommen und mit 10 µl einer Proteinase K Stock-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden bei 55°C im Schüttler inkubiert bis sämtliche Geweberückstände aufgelöst waren. Im Allgemeinen war dies nach 15-18 Stunden der Fall. Aus dem Zelllysat wurden 100 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl gekühlter Proteinpräzipitations-Lösung auf Eis gemischt und anschließend sorgfältig resuspendiert. Nach einer drei- bis fünfminütigen Zentrifugation mit 14.000 rpm wurde der Überstand erneut in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 700 µl kaltem Isopropanol und 0,5 µl Glykogen (20 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde 1 min resuspendiert und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 100 µl DNA-Hydrations-Lösung gelöst und über Nacht bei RT inkubiert.

Die Ansätze wurden nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt: Für *T. cruzi*:

5 µl	DNA-Template
4 µl	Desoxyribonukleotid-Gemisch (2 mM)
2 µl	Primer 1 (10 μM)
2 µl	Primer 2 (10 μM)
6 µl	MgCl ₂
5 µl	10x-Reaktionspuffer
0,2 µl	ATG-Polymerase
0,6 µl	DMSO
0,5 µl	Sonde
ad 50 µl	autoklaviertes Aqua dest.

Die Ansätze für β -Aktin enthielten nur 3 μ l Template-DNA. Anschließend wurde die DNA wie folgt amplifiziert:

Denaturierung:	15 min	95°C
45 Zyklen:	20 sec	95°C
	40 sec	58°C

Die Auswertung erfolgte mit einer Abi Prism 7700 SDS Software (Applied Biosystems). Die statistischen Auwertungen wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Gräfe durchgeführt. Für die Unterstützung bei der Analyse der Gewebeparasitämien danke ich herzlich Ulricke Klauenberg, die die PCR durchgeführt hat.

2.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test mit der Graph Pad Prism-Software (Graph Pad Software, San Diego, CA) verwendet. Signifikanzen wurden ab $p \le 0.05$ mit einem * und ab 0.005 mit ** versehen. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in der Legende der jeweiligen Abbildung angegeben.

3. Ergebnisse

Die Immunantwort gegen *Trypanosoma cruzi* ist sehr komplex und auch die Aktivität der NK-Zellen folgt keinem festgelegten Ablauf, sondern gliedert sich in unterschiedliche Reaktionen. Im Ergebnisteil wird sowohl die Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre als auch gegen die extrazellulären Parasiten untersucht. Dabei handelt es sich vorrangig um *in vitro*-Versuche. Um jedoch Rückschlüsse auf die Infektion im lebenden Organismus ziehen zu können, wurden zudem *in vivo*-Versuche durchgeführt. Eine Untersuchung der NK-Zell-Aktivität im Menschen ist natürlich nicht möglich. Deshalb wurde der Infektionsverlauf in Mäusen verfolgt, da gezeigt werden konnte, dass sich die Immunantwort von Nagern auf eine Reihe von Infektionen sehr gut auf den menschlichen Organismus übertragen lassen. Bei den mit Mäusen durchgeführten Experimenten wurden die Auswirkungen einer Depletion von NK-Zellen zum Zeitpunkt der Infektion in Bezug auf den Parasitämieverlauf und die Persistenz in den Geweben analysiert.

3.1 Depletion von NK-Zellen in vivo

3.1.1 Parasitämieverlauf und Überlebensrate

NK-Zellen sind die ersten Lymphozyten, die nach erfolgter Invasion von T. cruzi aktiviert werden. Um die Bedeutung dieser frühzeitigen Aktivierung des Immunsystems erfassen zu können, wurden die NK-Zellen in vivo durch Applikation eines für eine NK-Zell-Depletion als geeignet beschriebenen Antikörpers depletiert. Obwohl das Molekül Asialo GM auf mehreren Zellpopulationen vorkommt, konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung der spezifischen Antikörper ausschließlich NK-Zellen aus dem Organismus depletiert werden (Emoto & Kaufmann, 2003). Die Depletion durch einen Antikörper hat den Vorteil gegenüber einer genetisch-defizienten Maus, dass u.U. auftretende Kompensationen auf genetischer Ebene durch verstärkte Expression anderer Zytokine ausgeschlossen werden können. Allerdings war eine mehrmalige Injektion des Antikörpers notwendig, um eine anhaltende Defiziens von NK-Zellen sicher zu stellen, da eine permanente Generierung der NK-Zellen im Knochenmark stattfindet. Um die Wirkung des Antikörpers zu kontrollieren, wurde den infizierten Mäusen während der ersten 12 Tage nach Infektion Blut entnommen und im Durchfluss-Zytometer auf das Vorhandensein von NK-Zellen untersucht. Dazu wurden die Blutlymphozyten mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen das DX5-Molekül auf NK-Zellen und gegen den CD3-Molekül-Komplex auf T-Zellen inkubiert.



Abb. 3.1: Kontrolle der Depletion von NK-Zellen *in vivo* durch Injektion des polyklonalen anti-Asialo Antikörpers.

FACS-Analyse von Blutlymphozyten am 12. Tag nach Infektion mit *T. cruzi* von Kontroll-Mäusen (**A**) und NK-Zell depletierten Mäusen (**B**). Den Mäusen wurden am Tag -1, 0, 3 und 7 der Infektion mit *T. cruzi* 50 µl des anti-Asialo Antikörpers i.p. inokkuliert. Als Kontrolle wurden C57BL/6-Mäuse mit 50 µl PBS i.p. behandelt.

In unbehandelten Mäusen ließ sich ein NK-Zell-Anteil von rund 5% nachweisen (Abb. 3.1 A), was einem physiologischen Wert an der Gesamtlymphozytenzahl im Blut entsprach (Bisset et al., 2004). Durch die Verabreichung des Antikörpers sank der Anteil der NK-Zellen auf unter 1% (Abb. 3.1 B). Eine vollständige Depletion ist durch den Einsatz von Antikörpern nur schwer zu erreichen, da es zu einer permanenten Neubildung von NK-Zellen im Knochenmark kommt. Trotzdem zeigten die Mäuse auch fünf Tage nach der letzten Injektion des Antikörpers noch eine verminderte Anzahl an NK-Zellen im Blut, sodass von einer wirkunsvollen Defizienz zum Zeitpunkt der Infektion ausgegangen werden konnte.

Die mit Antikörpern behandelten C57BL/6-Mäuse und die Mäuse der Kontrollgruppe, denen PBS i.p. verabreicht wurde, wurden subcutan in die Fußsohle mit *T. cruzi* infiziert. Dabei wurde die im Menschen auftretende Schwellung (Chagom) bei Mäusen nicht beobachtet. Der Infektionsverlauf der akuten Phase vollzieht sich in Mäusen in einer wesentlich kürzeren Zeitspanne als sie im Menschen zu beobachten ist. Die Blutparasitämie, die ein wesentliches Merkmal der anfänglichen Krankheit ist und die im Menschen im Durchschnitt drei Monate anhält, ist bei Mäusen schon nach rund vier Wochen abgeschlossen.

Die ersten Parasiten waren im Blut von C57BL/6-Mäusen frühestens sieben Tage nach Infektion lichtmikroskopisch zu erkennen und erreichten zwischen dem 16. und 20. Tag nach Infektion ihre maximale Anzahl.

Die experimentelle Injektion von *T. cruzi* erlaubt eine Infektion mit einer definierten Anzahl an Parasiten, die je nach Fragestellung des jeweiligen Experimentes, lethal oder nichtlethal verläuft. Für den verwendeten Tulahuen-Stamm stellte sich eine Infektions-Dosis von 1×10^4 *T. cruzi* als sub-lethal und von 250 Parasiten als nicht-lethal heraus. Beide Dosen wurden den NK-Zell-defizienten- und Kontroll-Mäusen injiziert.

In unbehandelten Mäusen konnte der typische Verlauf einer Parasitämie beobachtet werden. Im Fall einer Infektion mit 1 x 10^4 *T. cruzi* traten die Parasiten ab dem 7. dpi im Blut auf. Die Anzahl blieb bis zum 16.-17. Tag auf einem gleichbleibenden Niveau bevor sie dramatisch zunahm, was bei dieser Dosis ab dem 17. dpi zum Tod der ersten Mäuse führte (Abb 3.2 A). Wurde den Mäusen die geringe Dosis mit 250 *T. cruzi* verabreicht, stieg die Anzahl der Parasiten auf maximal $5x10^5$ am Tag 18 nach Infektion und fiel in den folgenden Tagen wieder stark ab, bis schließlich ab dem 31. dpi kaum noch Trypanosomen im Blut nachzuweisen waren (Abb. 3.2 B).

Die Depletion von NK-Zellen führte zu einem erheblichen Anstieg der Parasiten im Blut. In den Maximalwerten um den 17.-18. dpi war die Anzahl 3-4 mal so hoch verglichen mit unbehandelten Mäusen (Abb. 3.2 A und B). Die Kinetik des Parasitämieverlaufes war dabei nahezu identisch. So fanden sich ebenfalls erst ab dem 7. Tag nach Infektion Parasiten im Blut und konnten bei der niedrigen Infektionsdosis von 250 *T. cruzi* nach 30 Tagen kaum noch nachgewiesen werden (Abb 3.2 B). Trotz dieser ausgeprägten Steigerung der Parasitenlast im Blut traten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate der Antikörper-behandelten Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Mäuse auf (Abb. 3.2 C).







NK-depletierte C57BL/6- und Kontroll-Mäuse wurden mit 1 x 10^4 (A) und 250 (B) *T. cruzi* subkutan in den Fuß infiziert. Die Mäuse, deren NK-Zellen depletiert worden waren (gestrichelte Linie), enthielten die 3-4fache Menge an Trypanosomen im Blut im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (durchgezogene Linie); * p \leq 0,05. Die höhere Dosis führte zu einer Sterblichkeit der meisten infizierten Mäuse. Die Überlebensraten (C) der beiden Gruppen zeigten jedoch keine Signifikanz. Die Versuche wurden zweimal durchgeführt mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe.



3.1.2 Persistenz in unterschiedlichen Geweben

T. cruzi ist in der Lage jedes Gewebe zu invadieren und in ihm zu persistieren. Hauptsächlich betroffen von einer stark schädigenden Persistenz sind die Muskulatur des Herzens und die glatte Muskulatur des Darmes und der Speiseröhre. Daneben wird aber auch die normale quergestreifte Skelettmuskulatur in großem Umfang von den Parasiten befallen.

Die Depletion von NK-Zellen führte zu einer beträchtlichen Steigerung der Parasitenanzahl im Blut, sodass postuliert werden kann, das wesentlich mehr *T. cruzi* im gesamten Körper der Mäuse die jeweiligen Organe invadieren konnten. Ob die Depletion der NK-Zellen also zu einer verstärkten Persistenz in unterschiedlichen Organen führte, wurde mit einer quantitativen PCR untersucht (siehe 2.2.3.6). Die Gewebslasten der Skelettmuskulatur, des Herzens, der Lymphknoten, der Leber und der Milz wurden in der akuten Phase (12 dpi), in der frühen chronischen Phase (30 dpi) und in der voll etablierten chronischen Phase (1 Jahr nach Infektion) bestimmt.

Die Analyse der Gewebslast in den unterschiedlichen Geweben mit Hilfe der quantitativen PCR basiert auf dem Quotienten des Gehaltes an Parasiten-DNA im Gewebe und dem der ubiquitär vorkommenden β -Aktin-DNA. Dadurch wird ein Vergleich der Persistenz zwischen den antikörper-behandelten und den Kontroll-Mäusen in den einzelnen Geweben ermöglicht.

Bei allen Untersuchungen zeigten Leber und Milz Gewebslasten, die unterhalb oder nahe der Nachweisgrenze waren. Aus diesem Grund wurden diese Gewebe bei der Darstellung der Persistenz nicht berücksichtigt (Abb. 3.3 A-C).

In der akuten Phase 12 dpi konnte in den Geweben der Muskulatur, des Herzens und der Lymphknoten *T. cruzi*-DNA nachgewiesen werden. Dabei war die Gewebslast in allen Organen bei den NK-defizienten Mäusen leicht verringert im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Mäusen (Abb. 3.3 A).

In der chronischen Phase war die Persistenz im Herzen und in den Lymphknoten vergleichbar zur akuten Phase, während sich die Menge an *T. cruzi*-DNA in der Muskulatur stark erhöht hatte (Abb. 3.3 B und C). Allerdings änderte sich die Menge im Verlauf der chronischen Phase nicht mehr. Im Vergleich zur akuten Phase hatte sich das Verhältnis in den einzelnen Geweben verändert. Die Lymphknoten und das Herz der NK-depletierten Mäuse zeigten zwar nach wie vor die gleiche oder eine etwas geringere Persistenz als die Kontroll-Mäuse, im Muskelgewebe hingegen war die Parasitenlast in Antikörper-behandelten Mäusen stärker ausgeprägt. Obwohl deutliche Unterschiede der Persistenz in den einzelnen Geweben beobachtet werden konnten, zeigte der Vergleich der beiden Gruppen keine Signifikanz.





Abb. 3.3: Gewebslasten unterschiedlicher Organe von NK-defizienten und Kontroll-C57BL/6-Mäusen.

Der *T. cruzi*-DNA Gehalt wurde 12 dpi (A), 30 dpi (B) und ein Jahr nach Infektion (C) in den bezeichneten Geweben mittels quantitativer PCR untersucht. Die Gewebe wurden lysiert und die DNA extrahiert. In Milz und Leber, die ebenfalls untersucht wurden, lagen die Gewebslasten unterhalb der Nachweisgrenze. In der akuten Phase zeigten

die NK-defizienten Mäuse (**graue Balken**) geringeren *T. cruzi* DNA-Gehalt in den untersuchten Geweben als die Kontroll-Mäuse (**weiße Balken**). In der frühen und voll etablierten chronischen Phase veränderte sich das Verhältnis teilweise: die Belastung in NK-defizienten Mäusen blieb in Herz und Lymphknoten leicht unterhalb bzw. gleich im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. In der Muskulatur allerdings nahm die Belastung stärker zu und lag letztlich über der der unbehandelten Mäuse. Eine Signifikanz konnte aber zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

3.2 Die Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre T. cruzi in vitro

3.2.1 Aktivierung von NK-Zellen durch eine T. cruzi-Infektion

3.2.1.1 Zytotoxische Aktivität

Um die Frage beantworten zu können, ob NK-Zellen in den durchgeführten *in vitro*-Systemen eine Aktivität ausüben, wurde der Aktivierungszustand von NK-Zellen nach Inkubation mit *T. cruzi* analysiert.

Aktivierte NK-Zellen besitzen nicht nur zytokin-vermittelte Aktivitäten, sondern zeigen ebenso eine ausgeprägte Zytotoxizität. Ausschlaggebend, ob eine Zielzelle von einer NK-Zelle erkannt wird oder nicht, ist die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzelle. Bei einem hohen Anteil von MHC-I-Molekülen sind die Zellen in der Regel geschützt, bei einem Fehlen von MHC-I zerstören aktivierte NK-Zellen die Zielzelle, da sie als fremd erkannt wird. In einem *in vitro*-System, in dem Zellen eingesetzt werden, die kein MHC-I expremieren, kann der Aktivierungszustand von NK-Zellen ermittelt werden, wenn die Zielzellen mit radioaktivem Chrom inkubiert wurden. Das Chrom dringt durch Diffusion

in die Zellen ein, kann aber nur durch eine Zerstörung der Zelle wieder in den Medium-Überstand freigesetzt werden. Durch die Analyse der Radioaktivität im Medium kann der Grad der Lyse der Zielzellen und damit das Ausmaß der Aktivität von NK-Zellen ermittelt werden. Da nur NK-Zellen die Eigenschaft besitzen, MHC-I defiziente Zellen zu attackieren, handelt es sich bei diesem *in vitro*-System um einen sehr spezifischen Nachweis.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Yac-Zellen eingesetzt, die kein MHC-I auf ihrer Zelloberfläche tragen. Milzzellen einer C57BL/6-Maus wurden mit Trypanosomen über Nacht inkubiert und die Aktivität von NK-Zellen mit Hilfe eines Zytotoxizitäts-Testes analysiert (siehe 2.2.2.7). Als Positiv-Kontrolle diente eine Inkubation mit poly I:C, einer Substanz, die doppelsträngige RNA imitiert und an Toll-like Rezeptor 3 bindet, was u.a. zu einer Freisetzung von IL-12 durch APZ führt und dadurch NK-Zellen aktiviert. poly I:C eignete sich gut als positive Kontrolle, weil durch die Zugabe alle APZ und infolgedessen auch NK-Zellen aktiviert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen nur in Medium inkubiert.

Abb. 3.4 zeigt die Aktivität von NK- (Effektor; E) gegen die Yac-Zellen (Ziel; T). Die NK-Zellen wurden in aufsteigendenm Verhältnis gegen die Yac-Zellen eingesetzt, wobei mit steigendem Verhältnis Effektor- : Zielzellen (E:T) eine ansteigende Aktivität beobachtet werden konnte.

Durch poly I:C aktivierte NK-Zellen besaßen selbst bei niedrigen E:T-Verhältnissen die Fähigkeit, die Zielzellen zu lysieren, was sich bei einem Überschuss von 100:1 bis zu einer 80% igen Lyse der Yac-Zellen steigern ließ. Die Inkubation der Milzzellen mit *T. cruzi* führte ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zellen, verglichen mit der Positiv-Kontrolle allerdings nicht so stark ausgeprägt. Besonders bei niedriger Effektorzellzahl war kein Unterschied zur Medium-Kontrolle erkennbar. Das eine Aktivierung aber dennoch erfolgte, zeigte sich deutlich ab einem Verhältnis von 25:1 NK- zu Yac-Zellen (7% Lyse im Vergleich zu 1% in der Kontrolle). Die unbehandelten NK-Zellen verursachten eine maximale Lyse von 10% der Yac-Zellen, während mit *T. cruzi* stimulierte NK-Zellen 28% der Zielzellen bei einem 100 fachen Überschuss lysierten.



Abb. 3.4: Aktivierung von NK-Zellen durch *T. cruzi.*

 $6 \ge 10^3 - 2 \ge 10^5$ Milzzellen von C57BL/6-Mäusen wurden 4 Stunden mit 2 $\ge 10^3$ radioaktiv markierten Yac-Zellen inkubiert und anschließend die freigesetzte Radioaktivität gemessen. Die Milzzellen wurden zuvor entweder mit 0,2 mg/ml poly I:C (**Dreiecke**), mit 5 $\ge 10^5$ *T. cruzi* (**Quadrate**) oder in Medium (**Rauten**) über Nacht inkubiert. Aus dem Maß an Radioaktivität im Überstand kann der prozentuale Anteil an lysierten Yac-Zellen abgeleitet werden. Das E:T-Verhältnis gibt die Anzahl der Milzzellen (**Effektor; E**) zu Yac-Zellen (**Ziel; T**) an.

Milzzellen, die mit *T. cruzi* inkubiert wurden, zeigten eine deutlich höhere Aktivität als die Negativ-Kontrolle (Medium), wenn auch eine wesentlich geringere als mit poly I:C stimulierte; * $p \le 0,05$. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Versuche.

3.2.1.2 Induktion einer Zytokin-Sekretion durch NK-Zellen nach Inkubation mit T. cruzi

Für den Nachweis einer Zytokin-Produktion eignet sich der ELISpot-Test, weil in diesem Test nicht nur nachgewiesen werden kann, ob es zu einer Zytokin-Produktion kommt, sondern auch wieviele Zellen das entsprechende Zytokin sezernieren. Die Zellen werden mit den zu untersuchenden Stimuli in einer speziellen Platte inkubiert, deren Boden mit einem spezifischen Antikörper bedeckt ist, der lokal das freigesetzte Zytokin bindet. Dadurch entstehen durch chemische Reaktionen des Substratpuffers mit den HRP-gekoppelten Detektionsantikörpern Spots an den Stellen, wo Zellen waren, die das Zytokin sezerniert haben. Damit kann eine Aussage getroffen werden, wieviele Zellen aktiviert wurden oder ob nur wenige Zellen sehr viel Zytokin gebildet haben. Die Skala der Ordinatenachse gibt deshalb die Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen an. IFN-γ ist ein guter Marker für eine Aktivierung der NK-Zellen, weil es sich dabei um ein Zytokin handelt, das Effektormechanismen auslösen kann.

Um den Nachweis führen zu können, dass die gemessene IFN-γ-Antwort auf NK-Zell-Aktivität zurückgeführt werden kann, wurden Milzzellen von SCID-Mäusen verwendet. Diese Mäuse haben einen natürlichen Defekt im Gen für die Rekombinase, die für die Umbildung des T- und B-Zell-Rezeptors verantwortlich ist, sodass diese Mäuse nicht in der Lage sind, funktionsfähige T- und B-Zellen hervorzubringen. Die Milzzellen wurden entweder mit Medium als Kontrolle oder mit *T. cruzi* bzw. unter Hitzeeinwirkung abgetöteter *T. cruzi* inkubiert. Auf diese Weise konnte unterschieden werden, ob nur lebende Trypanosomen oder auch phagozytierte tote Zellen eine Aktivierung auslösen können. Ebenfalls wurde untersucht, ob isolierte NK-Zellen unter Ausschluss von APZ auf eine Inkubation mit *T. cruzi* mit IFN-γ antworten können.



Abb. 3.5: ELISpot-Analyse von NK-Zellen nach Inkubation mit T. cruzi.

 2×10^5 Milzzellen (hellgraue Balken) oder 1×10^5 aufgereinigte NK-Zellen (dunkelgraue Balken) wurden entweder mit Medium, mit 1×10^4 Trypomastigoten oder der gleichen Anzahl hitze-inaktivierter (h.i.) Trypomastigoter für 24 Stunden inkubiert. Die Angabe entspricht der Anzahl an IFN- γ produzierenden Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der eingesetzten Lymphozyten.

Aus dem Graphen geht hervor, dass die NK-Zellen nur durch lebende *T. cruzi* zur IFN- γ Produktion animiert werden konnten und dazu die Anwesenheit von APZ obligat erforderlich war; * p \leq 0,05. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Versuche.

Durch die Inkubation von Milzzellen aus SCID-Mäusen, die nur in Medium inkubiert wurden, sezernierten nur wenige Zellen IFN- γ (Abb. 3.5). Diese Aktivität konnte durch die Inkubation mit viablen Trypanosomen signifikant gesteigert werden. Diese insgesamt 450% ige Steigerung ist zwar sehr deutlich, dennoch sind nur 0,2% der gesamten Milzzellen aktiviert worden. Mit hitze-inaktivierten *T. cruzi* fiel die Anzahl an IFN- γ -produzierende Zellen quasi auf das Niveau der Medium-Kontrolle ab (Abb. 3.5). Eine Induktion von IFN- γ wurde also nur durch lebende Parasiten ausgelöst. NK-Zellen, die durch Aufreinigung mit MicroBeads von den APZ isoliert worden waren, konnten nicht zu einer IFN- γ -Produktion stimuliert werden.

In NK-Zellen wird demnach in einer *T. cruzi*-Infektion sowohl eine zytotoxische Aktivtiät als auch eine Zytokin-Sekretion induziert.

3.2.2 Reduktion der intrazellulären Parasitenlast in Fibroblasten durch Milzzellen

Die Kontrolle des intrazellulären Stadiums von *T. cruzi* ist für eine erfolgreiche Immunabwehr des Parasiten von entscheidender Bedeutung, weil innerhalb der Zellen die massenhafte Vermehrung von *T. cruzi* im Wirt stattfindet. In Makrophagen konnte die Induktion von antimikrobiellen Prozessen bereits gezeigt werden, die zu einer Verminderung der Parasitenlast in den Zellen führt (siehe Einleitung). Bei Makrophagen handelt es sich allerdings um Zellen, die auf die Abwehr und das Abtöten von Pathogenen spezialisiert sind, während die Frage, ob nicht immunkompetente Zellen wie Fibroblasten ebenfalls intrazelluläre *T. cruzi* beseitigen können, noch nicht geklärt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, in denen Milzzellen von CBA/jund SCID-Mäusen mit infizierten Fibroblasten der Zelllinie L929 inkubiert wurden. Dazu wurden *T. cruzi* des Tehuantepeq-Stammes verwendet, die mit dem lacZ-Gen stabil transfiziert worden waren. Je nach Anzahl an Trypanosomen in der Kultur wurden unterschiedliche Mengen an β -Galaktosidase gebildet und durch ein zugefügtes Substrat umgesetzt. In den durchgeführten Versuchen wurde als Substrat CPRG verwendet, das durch die Aktivität der β -Galaktosidase zu Produkten umgesetzt wird, die eine photometrisch auswertbare violette Färbung des Kulturmediums bewirken. Dadurch kann die Anzahl an *T. cruzi* in einer *in vitro*-Kultur bestimmt werden.



Abb. 3.6: Reduktion der Parasitenlast in L929-Fibroblasten durch Inkubation mit Milzzellen von CBA-Mäusen.

 1×10^4 Fibroblasten wurden in einer Zellkulturplatte zu einem einschichtigen Zellrasen kultiviert und mit 1×10^5 lacZ-transfizierten *T. cruzi* infiziert. Nach drei Tagen wurden der Kultur 3×10^6 Milzzellen, die entweder unbehandelt oder über Nacht mit 0,2 mg/ml poly I:C inkubiert worden waren, hinzugefügt und für zwei Tage mit den infizierten Fibroblasten inkubiert.

Die gemessene Extinktion korrelierte direkt mit der Anzahl an Trypanosomen in der Kultur. Durch die Inkubation der Milzzellen mit den infzierten Fibroblasten konnte eine Aktivierung der unbehandelten Milzzellen beobachtet werden, die zu einer Reduzierung der Parasitenlast in den Fibroblasten führte, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie durch voraktivierte Milzzellen; * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.005$.

Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die CBA/j-Mäuse besitzen den gleichen MHC-Haplotyp wie die L929-Fibroblasten und wurden deshalb für die Versuche verwendet, wodurch erreicht wurde, dass die Fibroblasten von den Lymphozyten nicht als Fremd-Zellen erkannt wurden und so ungewollte direkte Aktionen gegen die L929-Zellen verhindert wurden. Die Milzzellen wurden für 48 Stunden mit den zu über 70% infizierten Fibroblasten inkubiert, daraufhin wurden Aliquots des Überstandes auf die Zytokine IL-12 und IFN- γ sowie das Effektormolekül Stickstoffmonoxid (NO) analysiert und der Kultur eine CPRG-Lösung mit geringem Detergenzanteil zugefügt. Dies führte zu einer vollständigen Lyse aller Zellen, sodass der gesamte Gehalt an β -Galaktosidase durch das CPRG umgesetzt werden konnte. Als Positiv-Kontrolle wurde der Gehalt an β -Galaktosidase einer infizierten Fibroblasten-Kultur ohne Milzzellen bestimmt, während zur Vermeidung von Verfälschungen der Ergebnisse einer Hintergrundfärbung, nicht-infizierte Fibroblasten mit CPRG inkubiert wurden.

Durch die Inkubation der L929-Fibroblasten mit den Milzzellen von CBA/j-Mäusen konnte die Parasitenlast deutlich gesenkt werden. Im Vergleich zur infizierten Kultur ohne Milzzellen sank die Parasitenlast durch unbehandelte Milzzellen auf 43% des Ausgangswertes ab. Eine Aktivierung der Milzzellen vor der Zugabe zu den Fibroblasten durch poly I:C ließ die Parasitenlast sogar auf 27% absinken (Abb. 3.6).



Abb. 3.7: Zytokinproduktion in einer Co-Kultur aus infizierten L929-Fibroblasten und Milzzellen von CBA-Mäusen.

Die gezeigte Produktion an IL-12, IFN- γ und NO wurde aus den Kulturüberständen der in Abb. 3.6 gezeigten Inkubation von Milzzellen und infzierten Fibroblasten ermittelt. IL-12 konnte sowohl mit unbehandelten als auch mit voraktivierten Milzzellen detektiert und als Anzeichen für die Aktivierung der Milzzellen angesehen werden.

IL-12 war im Kulturüberstand in deutlichen Mengen vorhanden, die sich allerdings in unbehandelten und voraktivierten Zellen nicht unterschieden (Abb. 3.7). Es ließ sich also erkennen, dass auch unbehandelte Milzzellen durch die Inkubation mit den infizierten Fibroblasten aktiviert wurden. Die infizierten Fibroblasten ohne Milzzellen sezernierten kein IL-12, sodass als Quelle nur die APZ der Milzzell-Suspension in Frage kommen und die Lymphozyten nicht direkt durch die Fibroblasten aktiviert wurden. IFN- γ dagegen wird von poly I:C aktivierten Milzzellen wesentlich stärker sezerniert. Mit rund 4 ng/ml erzeugten sie fünfmal mehr IFN- γ als die unbehandelten Milzzellen. Das hatte Auswirkungen auf die Produktion von NO: rund 70 μ M in der Kultur mit unbehandelten Milzzellen und rund 105 μ M durch poly I:C-Behandlung. Diese stärkere Induktion des wichtigen Effektormoleküls könnte also für die bessere Abwehr der intrazellulären *T. cruzi* auch in Fibroblasten verantwortlich sein.

3.2.3 Kontaktunabhängige Aktivität der Milzzellen gegen infizierte Fibroblasten

Neben der Zytokin-Sekretion sind, wie bereits beschrieben, auch andere Mechanismen denkbar, die intrazellulären Parasiten zu bekämpfen. Dazu zählt u.a. die Lyse der infizierten Zellen durch eine zytotoxische Aktivität, aber auch die Auslösung des induzierten Zelltodes (Apoptose). Diese Mechanismen beruhen jedoch grundsätzlich auf direkter Interaktion der Lymphozyten mit den infizierten Zellen und können deshalb durch eine räumliche Trennung unterbunden werden (Kuhn & Murnane, 1977; Clark & Kuhn, 1999).

Die Inkubation von Milzzellen in einem Zellkultur-Einsatz (sog. Transwell) ermöglicht den Austausch von Zytokinen in der Zellkultur, verhindert jedoch durch eine Membran den direkten Kontakt zu den infizierten Zellen. Auf diese Weise konnte die Abhängigkeit der Aktivität von einem Kontakt zwischen den Lymphozyten und Fibroblasten untersucht werden.



Abb. 3.8: Die Aktivierung und Induktion der Effektormechanismen sind nicht kontaktabhängig.

Die Fibroblasten wurden wie in Abb. 3.6 beschrieben mit den Milzzellen inkubiert, mit der Variante, dass in einem Ansatz die Milzzellen direkt mit den L929-Zellen inkubiert wurden oder durch einen Zellkultur-Einsatz (sog. Transwell; **TW**) von den Fibroblasten getrennt wurden, sodass direkte Zell-Zell-Interaktionen unterbunden wurden.

Die Aktivität der Milzzellen wurde dadurch nicht beeinflußt; * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.005$.

Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die räumlich getrennte Inkubation der Milzzellen von den infizierten Fibroblasten zeigte keine Auswirkungen auf die Aktivität gegen die intrazellulären *T. cruzi* (Abb. 3.8). Sowohl die unbehandelten als auch die voraktivierten Milzzellen waren in der Lage durch die Membran hindurch die Parasitenlast unabhängig vom Zellkultur-Einsatz zu minimieren. Dabei zeigte sich wiederum die erhöhte Aktivität der poly I:C stimulierten Milzzellen.

IL-12, IFN-γ und NO waren auch in der Kultur mit dem Zellkultur-Einsatz deutlich nachzuweisen, während Indizien für direkte Zell-Zell-Interaktionen, wie z.B. die Induktion der Apoptose, in keinem Versuch auftraten (Iris Gaworski, persönliche Mitteilung).

3.2.4 Blockade von IFN-γ und Stickstoffmonoxid in der Fibroblasten-Kultur

NK-Zellen sind in der *T. cruzi*-Infektion als wichtig beschrieben worden, weil sie sehr frühzeitig nach der Infektion IFN- γ produzieren können, was in infizierten Makrophagen die Umsetzung von Arginin zu NO induziert und die Vermehrung der intrazellulären Parasiten beeinträchtigt. In Fibroblasten scheint die Sekretion von IFN- γ durch Milzzellen ebenfalls NO zu induzieren. Ob dieser Mechanismus in Fibroblasten ebenfalls essentiell zur erfolgreichen Reduktion der Parasitenlasten in den Zellen ist, sollte durch eine Blockade von sowohl IFN- γ durch neutralisierende Antikörper als auch von NO durch Aminoguanidin, das die Synthese von NO aus Arginin verhindert, untersucht werden.

Dazu wurden Milzzellen über Nacht mit 30 μ g/ml eines neutralisierenden Antikörpers gegen IFN- γ (Klon XMG1.2) und 5 mM Aminoguanidin inkubiert, bevor sie den Fibroblasten zugesetzt wurden.

Die Blockade von IFN- γ inhibierte die Aktivität der Milzzellen gegen die infizierten Fibroblasten: die Parasitenlast konnte in Anwsenheit der neutralisierenden Antikörper um 30% gesenkt werden. Die Inhibierung der NO-Synthese hob die Aktivität sogar fast vollständig auf; die Parasitenlast betrug noch über 90% nach Inkubation mit den Milzzellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: Die Inhibierung von IFN-γ und NO führt zu einer stark verminderten Milzzell-Aktivität.

Infizierte Fibroblasten wurden wie in Abb. 3.6 mit Milzzellen von CBA-Mäusen inkubiert. Die Milzzellen waren unbehandelt oder entweder mit 30 µg/ml eines IFN- γ neutralisierenden Antikörpers (**anti-IFN-** γ) oder 5 mM Aminoguanidin (**AG**) über Nacht inkubiert worden; * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,005.

Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die Zytokin-Produktion wurde ebenfalls durch die Zugabe der blockierenden Antikörper und Reagenzien beeinflußt (Abb. 3.10). Die XMG1.2-Antikörper hoben nicht nur die Wirkung von IFN- γ auf, sondern senkten auch die Sekretion von IL-12, was auf einen allgemein niedrigeren Aktivierungszustand hindeutete. Als Folge davon war wesentlich weniger NO in der Kultur nachzuweisen. Die Konzentration von NO scheint der kritische Punkt einer erfolgreichen Abwehr der Parasiten zu sein, da die Co-Inkubation mit Aminoguanidin sowohl die Sekretion von IL-12 als auch von IFN- γ z.T. stark erhöhte, was jedoch die Inhibierung einer Aktivität nicht beeinflußt.



Abb. 3.10: Durch Einsatz der neutralisierenden Antikörper und des Aminoguanidin können IFN-γ und NO geblockt werden.

Die Zytokin-Produktion zeigte deutlich, dass die inhibierte Wirkung des IFN- γ (anti- IFN- γ) sowohl die Produktion von NO beeinflußt als auch die von IL-12 vermindert. Obwohl durch die Zugabe von Aminoguanidin (AG) die Freisetzung von IFN- γ beträchtlich gesteigert werden konnte, wurde die Aktivität durch die iNOS-Blockade nahezu aufgehoben.

3.2.5 Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in L929 Fibroblasten

NO ist für eine erfolgreiche Bekämpfung intrazellulärer Parasiten erforderlich. Die Induktion in *T. cruzi* infizierten Makrophagen durch IFN- γ konnte bereits mehrfach beschrieben werden. Da in der Milzzell-Suspension, die zu den infizierten Fibroblasten gegeben wurde, auch Makrophagen enthalten waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das nachgewiesene NO in der Co-Kultur aus Fibroblasten und Milzzellen durch die mitgeführten Makrophagen gebildet worden ist und in den Fibroblasten selbst keine Effektormoleküle induziert wurden.

Der Nachweis einer iNOS-Induktion sollte durch einen Western-Blot erfolgen. Dazu wurden die Zellen durch ein Detergenz lysiert und dieses Lysat in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose transferiert und mit einem Antikörper detektiert.

Die Infektion mit *T. cruzi* löste in L929-Fibroblasten keine iNOS-Induktion aus (Abb. 3.11). Weder zum Zeitpunkt der Milzzell-Zugabe nach drei Tagen, noch nach dem Ende der Inkubation am fünften Tag, konnte eine deutliche iNOS-Menge nachgewiesen werden. Dies änderte sich durch die Inkubation mit Milzzellen von CBA/j-Mäusen. Die direkte Inkubation mit Milzzellen induzierte eine gut nachweisbare iNOS-Synthese in der Kultur. Waren die Milzzellen allerdings durch poly I:C voraktiviert stieg die Menge an gebildeter iNOS noch stärker an.

Durch die seperate Inkubation der Milzzellen in einem Zellkultur-Einsatz (TW), konnten die Milzzellen vor Addition des Detergenz aus der Kultur entnommen werden, sodass ausschließlich Fibroblasten auf den Gehalt an iNOS untersucht werden konnten. Auch in diesem Fall konnte eine deutliche Bande des iNOS-Proteins im Blot beobachtet werden, womit bewiesen werden konnte, dass tatsächlich in den Fibroblasten Effektormechanismen induziert werden können.



Abb. 3.11: Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in L929-Fibroblasten durch die Inkubation mit Milzzellen.

Die Analyse der iNOS-Expression wurde mit Hilfe eines Western Blots durchgeführt. Dazu wurden die L929-Zellen mit Triton-Lysis-Puffer aufgelöst und ein Teil des Lysates mit denaturierendem Beladungspuffer aufgekocht. Die Proteine wurden über eine 10% ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dort wurde die iNOS spezifisch durch einen Antikörper detektiert. Die einzelnen Spuren geben folgendes wieder: L929: uninfizierte Fibroblasten; L929+T.c.: infizierte Fibroblasten; naiv: Co-Inkubation von naiven Milzzellen von CBA/j-Mäusen mit den infizierten L929; naiv+TW: naive Milzzellen, die in einem Zellkultur-Einsatz mit den infizierten L929 inkubiert wurden; +poly I:C: Inkubation voraktivierter Milzzellen mit den infizierten Fibroblasten. Die Pfeile geben die spezifische Bande der iNOS an.

3.2.6 Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre T. cruzi

In den bisherigen Experimenten im verwendeten *in vitro*-Infektionssystem wurden Milzzell-Suspensionen eingesetzt, in denen neben NK-Zellen auch T- und B-Zellen vorhanden waren. Aufgrund der sehr schnellen Reaktion der Milzzellen gegen die infizierten Fibroblasten ist eine Beteiligung von T- oder B-Zellen sehr unwahrscheinlich. Um jedoch die Aktivität explizit für NK-Zellen gegen die intrazellulären *T. cruzi* zeigen zu können, wurden

Milzzellen verwendet, die SCID-Mäusen entstammten, weshalb eine Aktivität gegen infizierte Fibroblasten ausschließlich auf NK-Zellen zurückzuführen ist. Die Milzzellen wurden ebenfalls entweder unbehandelt oder durch poly I:C voraktiviert in den Versuchen eingesetzt.



Abb. 3.12: NK-Zellen reduzieren die Parasitenlast in infizierten Fibroblasten.

 1×10^4 Fibroblasten wurden in einer Zellkultur-Platte zu einem einschichtigen Zellrasen kultiviert und mit 1×10^5 lacZtransfizierten *T. cruzi* infiziert. Nach drei Tagen wurden der Kultur 5×10^5 Milzzellen von SCID-Mäusen, die entweder unbehandelt oder über Nacht mit 0,2 mg/ml poly I:C inkubiert worden waren, hinzugefügt und für zwei Tage mit den infizierten Fibroblasten inkubiert.

Auch unbehandelte Milzzellen von SCID-Mäusen wurden durch die Inkubation mit infizierten Fibroblasten aktiviert und reduzierten die Parasitenlast, wenn auch in geringerem Ausmaß als Milzzellen von CBA/j-Mäusen. Es konnten keine Unterschiede der Aktivität durch Inkubation in Zellkultur-Einsätzen beobachtet werden. Die Aktivität konnte wiederum durch Voraktivierung der Milzzellen durch poly I:C verstärkt werden; * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.005$. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die nicht voraktivierten SCID-Milzzellen besaßen eine geringere Fähigkeit die Parasitenlast zu reduzieren verglichen mit den Milzzellen, die auch T- und B-Zellen enthielten (Abb. 3.12). So konnte nur eine um 35% verminderte Anzahl an intrazellulären Parasiten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Diese geringere Reduzierung ging einher mit einer ausbleibenden Sekretion von IL-12 und IFN- γ sowie der Produktion von NO (Abb. 3.13).

Wiederum zeigte die Inkubation der Milzzellen im Zellkultur-Einsatz keinen Unterschied zu den kontakt-inkubierten Milzzellen (nicht gezeigt). Die Aktivierung durch poly I:C jedoch führte zu einer vergleichbaren Aktivität der SCID- zu den CBA-Milzzellen. Nach der Inkubation waren nur noch 30% der ursprünglichen Parasitenlast vorhanden. Ebenso konnten sowohl IL-12 und IFN- γ (IFN- γ allerdings in stark minimierten Konzentrationen von gerade 250 pg/ml im Vergleich zu rund 4000 pg/ml mit CBA-Milzzellen) als auch eine NO-Produktion beobachtet werden (ebenfalls wesentlich weniger: 20 μ M zu 105 μ M bei CBA).



Abb. 3.13: Die unbehandelten Milzzellen von SCID-Mäusen üben eine Aktivität gegen intrazelluläre *T. cruzi* aus ohne Induktion von IL-12, IFN-γ oder NO.

Unabhängig von der Verwendung eines Zellkultur-Einsatzes konnten bei unbehandelten Milzzellen die oben beschriebene Zytokin-Produktion und NO-Induktion nicht beobachtet werden. Trotzdem waren diese Zellen in der Lage, die Parasitenlast in den Fibroblasten zu reduzieren. Durch die Stimulation der Milzzellen durch poly I:C waren sowohl IL-12 als auch IFN-γ nachzuweisen, was zu einer NO-Produktion führte.

3.2.7 Neutralisation von IL-12

Die fehlende Sekretion von IL-12 und IFN- γ unter Verwendung von SCID-Milzzellen bei dennoch zu beobachtender Aktivität kann nicht in das Bild eingeordnet werden, wie es sich anfangs bei CBA-Milzzellen abgezeichnet hatte. Wie schon gezeigt, führte die Aktivierung von Milzzellen durch infizierte Fibroblasten zu einer Ausschüttung von IL-12, was zu einer IFN- γ -Sekretion führte, was wiederum eine NO-Produktion stimulierte, die unbedingt notwendig war, um die intrazellulären Parasiten zu bekämpfen.

SCID-Milzzellen konnten die Parasitenlast aber auch ohne IL-12 oder IFN- γ , sogar ohne NO reduzieren. Um die Abhängigkeit der Aktivität von IL-12 zu untersuchen, wurde diesem Zytokin durch einen neutralisierenden Antikörper die Wirksamkeit genommen. Grundsätzlich ist es denkbar, dass zwar die Sekretion von IFN- γ von IL-12 abhängt, parallel jedoch andere Effektormechanismen induziert werden können, die unabhängig von den bisher beschriebenen wirken können.



Abb. 3.14: Die Aktivierung von Milzzellen durch infizierte Fibroblasten kann unabhängig von IL-12 erfolgen.

Infizierte Fibroblasten wurden wie in Abb. 3.6 mit Milzzellen von CBA-Mäusen inkubiert. Die Milzzellen waren unbehandelt oder entweder mit 10 μ g/ml eines IL-12 neutralisierenden Antikörpers (**anti IL-12**) oder gleichzeitig mit poly I:C und anti IL-12 über Nacht inkubiert worden; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,005. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die Milzzellen von CBA-Mäusen wurden über Nacht mit dem neutralisierenden Antikörper inkubiert, bevor sie zu den Fibroblasten gegeben wurden. Neben den naiven Lymphozyten wurde eine gleichzeitige Aktivierung durch poly I:C und der Neutralisation von IL-12 untersucht.

In diesem Fall zeigten die unbehandelten CBA-Milzzellen ebenfalls eine verminderte Aktivität: nur um 25% konnte die Parasitenlast durch die Milzzellen reduziert werden. Allerdings unterschied sich die Aktivität in An- bzw. Abwesenheit des neutralisierenden Antikörpers nicht (Abb 3.14). Durch poly I:C konnte auch in diesem Fall eine erhebliche Steigerung der Aktivität erreicht werden; die Parasitenlast reduzierte sich auf rund 40% des Ausgangswertes. Dies konnte ebenfalls durch den neutralisierenden Antikörper nicht verhindert werden.

Im ELISA konnte die Wirksamkeit des Antikörpers bestätigt werden, es wurde kein IL-12 in der Kultur nachgewiesen. IFN- γ und NO wurden durch den Antikörper wenig beeinflußt, sodass vergleichbare Konzentrationen auch in Anwesenheit des Antikörpers nachzuweisen waren (Abb 3.15).



Abb. 3.15: Die Neutralisation von IL-12 beeinflußt die Freisetzung von IFN-γ und NO nur geringfügig.

Trotz Blockade von IL-12 kann eine Induktion von IFN- γ und NO erfolgen. Es existieren somit alternative Aktivierungsmechanismen, die auch von poly I:C induziert werden können, da die gleichzeitig Behandlung von anti IL-12 und poly I:C trotzdem zu einem sehr hohen Gehalt an IFN- γ und NO in der Kultur führt. Aber auch unbehandelte Milzzellen sind für diesen alternativen Weg empfänglich.

3.2.8 Induktion von Typ-I-Interferonen

Die Neutralisation von IL-12 konnte die Sekretion von IFN-γ und NO nicht beeinflussen, was sich auch in vergleichbaren Aktivitäten der unbehandelten bzw. aktivierten Milzzellen wiederspiegelte. Dennoch scheinen SCID-Milzzellen aktiviert werden zu können und Prozesse induziert zu werden, die die Parasitenlast drücken können.

Ein sehr bekannter Stimulus für Effektormechanismen sind die Typ-I-Interferone, von denen mehrere unterschiedliche Typen beschrieben wurden. Die am besten untersuchten Typ-I-Interferone sind IFN- α und β . Ihnen konnte eine aktivierende Wirkung auf NK-Zellen zugeordnet werden und die Sekretion von IFN- α/β durch NK-Zellen hat ebenfalls aktivierende Wirkung auf APZ.

Es sollte untersucht werden, ob diese beiden Interferone in infizierten Fibroblasten nachgewiesen werden konnten. Dazu wurde eine reverse Transkriptase verwendet, die bereits transkribierte mRNA in cDNA umschreibt, die dann mittels einer PCR nachgewiesen werden kann. Dabei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die allerdings den Nachteil besitzt, den endgültigen Nachweis der Proteinsynthese nicht erbringen zu können.

In uninfizierten L929-Fibroblasten ist weder IFN- α noch IFN- β nachzuweisen. Dies ändert sich durch die Infektion mit *T. cruzi*; danach konnte die mRNA beider Interferone nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Auch in Milzzellen von CBA-Mäusen, die durch einen Zellkultur-Einsatz von den Fibroblasten getrennt waren und deshalb unabhängig von diesen untersucht werden konnten, zeigten eine deutliche Induktion der Interferone.



Abb. 3.16: Die Infektion mit T. cruzi führt in Fibroblasten und Milzzellen zu einer Induktion von Typ-I-Interferonen.

Infizierte und nicht-infizierte L929-Fibroblasten sowie Milzzellen von CBA/j Mäusen wurden lysiert, die mRNA mit Phenol und Propanol gefällt und durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von IFN- α und β wurde mit einer PCR geführt.

3.3 Die Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre T. cruzi

Im vorangegangenen Abschnitt konnte eine Aktivität, die von NK-Zellen vermittelt wurde, gegen intrazelluläre *T. cruzi in vitro* nachgewiesen werden. Die stärksten Unterschiede bei der NK-Zell-Depletion *in vivo* konnten in Bezug auf die Parasitämie beobachtet werden, während die Persistenz in den Geweben, auch in der akuten Phase, keine signifikanten Veränderungen zeigten; im Gegenteil in der frühen Phase nach der Infektion (12 dpi) waren in den Geweben von NK-Zell-defizienten Mäusen sogar weniger Parasiten als in den unbehandelten Kontrollen. Dieses Verhältnis änderte sich erst in der chronischen Phase und nur in der Skelettmuskulatur. Es ist also denkbar, dass sich die Aktivität der NK-Zellen in der akuten Phase der Krankheit auf die extrazellulären Trypomastigoten im Blut konzentriert. Es konnten bereits direkte Interaktionen zwischen NK-Zellen und *T. cruzi* gezeigt werden, jedoch ist nichts über die Natur dieser Interaktionen bekannt.

Im folgenden Abschnitt sollen diese Interaktionen von NK-Zellen gegen extrazelluläre Parasiten nachgewiesen und Anstrengungen unternommen werden, die Mechanismen, die diesen Interaktionen zugrunde liegen, aufzuklären. Außerdem soll versucht werden, auslösende Faktoren der Aktivierung von NK-Zellen durch extrazelluläre *T. cruzi* zu finden.
3.3.1 Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre Trypanosomen

Hatcher und Kuhn haben Anfang der 1980er die Aktivität von NK-Zellen, die *ex vivo* aus *T. cruzi* infizierten Mäusen oder mit poly I:C behandelten Mäusen mit den extrazellulären Stadien von *T. cruzi* inkubiert wurden, mittels der Lichtmikroskopie untersucht. Dabei wurden alle Trypanosomen, die ihre Mobilität eingebüßt hatten als tot angesehen (Hatcher & Kuhn, 1982).

Die ersten Versuche diesen Themenkomplex betreffend waren denen von Hatcher und Kuhn angelehnt, allerdings in der Variation, das Milzzellen aus naiven, unbehandelten Mäusen verwendet wurden, von denen ein Teil über Nacht mit poly I:C stimuliert wurden. Dadurch sollte analysiert werden, ob nur voraktivierte Milzzellen die extrazellulären *T. cruzi* bekämpfen können oder ob die direkte vierstündige Inkubation der Milzzellen mit *T. cruzi in vitro* die Aktivität auslösen konnte.

Tab. 3.1 zeigt, dass Milzzellen von C57BL/6-Mäusen sowohl Epimastigote als auch Trypomastigote in einem deutlich erkennbaren Maß abtöten konnten. In den Kontroll-Ansätzen wurden die Trypanosomen nur in Medium ohne Milzzellen inkubiert. Naive Milzzellen wurden durch die Inkubation mit *T. cruzi* innerhalb der kurzen vierstündigen Inkubationsdauer in die Lage versetzt, eine Aktivität gegen die Trypanosomen auszuüben. Diese wurde durch die Voraktivierung mit poly I:C z.T. um das Doppelte erhöht (bei den Trypomastigoten). Auffällig war die Fähigkeit von den Milzzellen neben den Trypomastigoten, denen sie während einer *T. cruzi*-Infektion ausgesetzt werden, auch die epimastigote "Insektenform" bekämpfen können, obwohl diese Zellen natürlicherweise nicht aufeinander treffen.

	Epimastigote	Trypomastigote
Kontrolle	0%	0%
C57BL/6	39%	23%
+ poly I:C	59%	50%
B-Zellen	0%	0%

Tab. 3.1: Milzzellen von C57BL/6-Mäusen töten extrazelluläre T. cruzi.

 1×10^{6} Milzzellen wurden mit 1×10^{5} epi- bzw. trypomastigoten *T. cruzi* 4 Stunden inkubiert und anschließend im Lichtmikroskop auf ihre Mobilität untersucht. In der Kontrolle wurden die Trypanosomen ohne Milzzellen inkubiert. Die Milzzellen waren entweder unbehandelt oder durch poly I:C voraktiviert.

Die Prozente geben die Anteile an toten *T. cruzi* in Bezug auf die Kontrolle an. Die gezeigten Ergebnisse stehen repräsentativ für eins von vier unabhängigen Experimenten.

Wie schon in Abschnitt 3.2 beschrieben, kann durch die Verwendung einer Milzzell-Suspension, die alle Lymphozyten-Populationen also sowohl T- und B-Zellen als auch NK-Zellen besitzen keine Aussage getroffen werden, welche Zellen letztendlich für die Aktivität verantwortlich sind. Allerdings kann eine Aktivität von B-Zellen ausgeschlossen werden (Tab. 3.1; siehe auch 3.3.7). Deshalb wurden auch in diesen Versuchen Milzzellen von SCID-Mäusen verwendet, die weder T- noch B-Zellen besitzen (siehe 3.2.1.2), sodass eine eventuelle Aktivität dieser Milzzellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* von NK-Zellen ausgehen muß.

	Epimastigote	Trypomastigote
Kontrolle	0%	0%
SCID	31%	40%
+ poly I:C	58%	44%
isolierte NK-Zellen	0%	0%
isol. NK-Zellen + poly I:C	50%	40%

Tab. 3.2: NK-Zellen können extrazelluläre T. cruzi bekämpfen.

Der Versuchsablauf entspricht dem unter Tab. 3.1 beschriebenen. Der Vergleich der Aktivitäten, die von SCID- bzw. C57BL/6-Milzzellen ausgeübt wurden, ließ keine Unterschiede erkennen.

Die Prozente geben die Anteile an toten *T. cruzi* in Bezug auf die Kontrolle an. Die gezeigten Ergebnisse stehen repräsentativ für eins von vier unabhängigen Experimenten.

Milzzellen von SCID-Mäusen waren ebenfalls in der Lage die Anzahl an lebenden Trypanosomen in einer *in vitro* Kultur zu reduzieren (Tab. 3.2). Auch in diesem Fall wurden naive Milzzellen durch die Inkubation aktiviert. Aber auch in diesem Fall hing eine Aktivität von der Anwesenheit von APZ ab. Isolierte NK-Zellen waren nur dann in der Lage die Parasiten zu töten, wenn sie einer Milzzellsuspension entstammten, die durch poly I:C aktiviert worden war (Tab.3.2).

Problematisch an der Auszählung im Lichtmikroskop war die subjektive Entscheidung, ob der jeweilige Trypanosom als tot oder viabel angesehen werden mußte. Innerhalb eines Experimentes entstand zwar ein einheitliches Bild, der Vergleich von zwei oder mehreren Experimenten führte aber zu ungewöhnlich hohen Standardabweichungen, die z.T. über 50% des Mittelwertes erreichten.

3.3.2 Direkter Kontakt zwischen NK-Zellen und extrazellulären T. cruzi

Schon bei der lichtmikroskopischen Auswertung konnten vereinzelt direkt miteinander verbundene Trypanosomen-NK-Zell-Komplexe beobachtet werden. Um diese Interaktionen weiter zu analysieren, wurden Präparate für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) hergestellt. Dabei wurden die NK-Zellen vor der Inkubation mit den Parasiten mit Hilfe von MicroBeads aufgereinigt. Durch die Zugabe von NK-Zellen zu extrazellulären Trypanosomen (in diesen Experimenten wurden ausschließlich Epimastigote verwendet) kam es zu zahlreichen Kontakten zwischen den Immunzellen und den Parasiten (Abb. 3.17). Die REM-Bilder zeigen repräsentative Beispiele dieser Interaktionen. Typisch waren die angesprochenen Komplex-Bildungen, bei denen mehrere NK-Zellen und *T. cruzi* miteinander in Kontakt traten. Bisweilen führten diese Interaktionen zu erheblichen Zellkorpusdeformationen der Parasiten, was auf ein Einwirken der NK-Zellen auf die extrazellulären Parasiten hindeutete (siehe Pfeil in mittlerem Bild).



Abb. 3.17: REM-Aufnahme nach Inkubation von aufgereinigten NK-Zellen mit epimastigoten T. cruzi.

 1×10^{6} NK-Zellen wurden mit 1×10^{5} Epimastigoten 4 Stunden inkubiert und anschließend mit 2% Glutaraldehyd fixiert. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte aus den Präparaten. Insgesamt waren zwischen 5-10% der eingesetzten Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung miteinander verbunden. Z.T. kommt es zu ausgeprägten Komplexen, in denen die Zellkörper der Trypanosomen stark deformiert werden (**Pfeil**). Die Bilder zeigen eine 8300fache (Bild links) bzw. 4500fache (Bilder Mitte und rechts) Vergrößerung.

NK-Zellen schienen dabei die einzige Population der Lymphozyten zu sein, die in der Lage war, derartig engen Kontakt mit den Trypanosomen aufzubauen. So konnte zwar auch ein Kontakt sowohl zwischen isolierten CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen mit den Parasiten beobachtet werden, doch waren kaum Interaktionen am Korpus nachzuweisen (Abb. 3.18 A

und B). In überwiegender Mehrheit handelte es sich um Kontakte des Flagellums der Trypanosomen mit den T-Zellen. Das Flagellum besitzt stark hydrophobe Regionen mit deren Hilfe sich die Parasiten sehr leicht an Membranen der T-Zellen anheften können.



Abb. 3.18: REM-Aufnahme von isolierten T-Zellen mit epimastigoten *T. cruzi.*

 $CD8^+$ (A) und $CD4^+$ (B) -T-Zellen wurden mit dem FACSAria aufgereinigt und 1 x 10⁶ Zellen mit 1 x 10⁵ Epimastigoten für 4 Stunden inkubiert. Durch Inkubation der T-Zellen mit den Trypanosomen konnten wesentlich weniger Kontakte vor allem am Zellkorpus von *T. cruzi* beobachtet werden als bei entsprechender Inkubation mit NK-Zellen.

3.3.3 Etablierung eines Test-Systems zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi*

Die Inkubation der Milzzellen mit extrazellulären *T. cruzi* führte zu einer stark erhöhten Immobilität der Trypanosomen. Die lichtmikroskopische Untersuchung läßt neben dem Nachteil, dass sehr subjektive Entscheidungen getroffen werden müssen, keine Aussagen über den Mechanismus der Aktivität der NK-Zellen zu, die zum Zelltod von *T. cruzi* führen. Die naheliegendste Erklärung der Induktion des Zelltodes ist die Freisetzung von zytotoxischen Granula nach Kontaktaufnahme, die die Unversehrtheit der Zellmembran aufheben.

Die Ausschüttung von zytotoxischen Granula bewirkt eine Durchlässigkeit der Zellmembran, die einen semi-permablen Austausch von Flüssigkeiten nicht mehr verhindern kann. Um zu untersuchen, ob die Inkubation von NK-Zellen mit den Trypanosomen zu einer beeinträchtigten Membranfunktionalität führte, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Test-System etabliert, das auf dem Einsatz des fluoreszierenden Moleküls CMFDA beruht (siehe 2.2.2.9 und Abb. 3.19). Der Vorteil dieses Moleküls liegt in der selektiven Markierung von lebenden Zellen. CMFDA diffundiert in nicht-fluoreszierender Form in die Zelle ein und muß von Esterasen gespalten werden, um in die fluoreszierende Form umgesetzt zu werden. Dadurch wird das Moleküle stark hydrophil, was eine erneute Diffusion aus der Zelle verhindert. Außerdem werden dadurch im Fall einer Lyse der Zelle keine CMFDA-Moleküle durch Interaktionen mit der Zell-Membran oder den Zell-Kompartimenten zurückgehalten.

Sollte es zu einer Permeabilität der Trypanosomen-Zellmembran durch die Inkubation mit Milzzellen kommen, verlieren die Zellen das eingeschlossene CMFDA und damit ihre Fluoreszenz. Dadurch würden neue Einblicke in den Mechanismus wie NK-Zellen extrazelluläre *T. cruzi* bekämpfen können erzielt.



Abb. 3.19: Markierung von trypomastigoten T. cruzi mit CMFDA.

Trypomastigote wurden mit 2 μ M CMFDA inkubiert, was eine starke Fluoreszenz des gesamten Zellkörpers bei allen lebenden *T. cruzi* zur Folge hat **(B)**. Die fluoreszierenden Trypanosomen wurden anschließend für 4 Stunden mit Milzzellen verschiedener Mäuse inkubiert und im Durchfluss-Zytometer auf ihre verbliebene Fluoreszenz untersucht. Ist eine *T. cruzi*-Population nachzuweisen, die keine Fluoreszenz mehr besitzt, wurde die Membran-Integrität zerstört und die *T. cruzi* können als tot betrachtet werden. Lebende Trypanosomen erscheinen weiterhin fluoreszierend **(A)**.

Für die Aussage, ob die Aktivität der NK-Zellen mit einer Lyse von *T. cruzi* einhergeht, ist es essentiell nur die Veränderungen der Fluoreszenz innerhalb der Trypanosomen-Population bestimmen zu können. Ermöglicht wird diese Auswertung durch die unterschiedlichen Zellgrößen (Abb. 3.20, Forwardscatter, FSC-H) und granulären Eigenschaften (Abb. 3.20, Sidewardscatter, SSC-H) von *T. cruzi* im Vergleich zu den Milzzellen der Mäuse.

Im Durchfluss-Zytometer (FACS) und mit Hilfe der Cell-Quest-Software konnten die Trypanosomen getrennt von den Lymphozyten dargestellt werden (Abb. 3.20). Dies ermöglichte die isolierte Analyse der jeweiligen Population in Bezug auf ihre Fluoreszenz. Diese getrennte Darstellung war nur mit Trypomastigoten zu erreichen; Epimastigote besaßen immer eine Schnittmenge mit der Milzzell-Popuplation, sodass eine separate Untersuchung der Epimastigoten nicht möglich war.



Abb. 3.20: Darstellung der *T. cruzi* - und Lymphozyten-Population im Durchfluss-Zytometer.

Die Zellsuspension der Trypanosomen-Milzzell-Kultur wurden mit den Parametern der Zellkörpergröße (FSC-H) und der granulären Beschaffenheit der Zellen (SSC-H) analysiert. Die Verwendung von Trypomastigoten in den Versuchen ermöglichte, dass die beiden Population getrennt voneinander untersucht werden konnten. Durch die Einfassung der jeweiligen Population mit einem Gate (schwarze Umrandung) ist mit Hilfe der Cell-Quest-Software möglich, es Veränderungen innerhalb der einzelnen Zell-Populationen zu bewerten. Dies wurde im folgendem in Bezug auf die CMFDA-Fluoreszenz der T. cruzi unternommen.

3.3.4 NK-Zellen lysieren extrazelluläre T. cruzi

Die Analyse fluoreszenz-markierter Trypanosomen im Durchfluss-Zytometer erlaubt eine gleichzeitige Untersuchung von mehreren tausend *T. cruzi*. Dadurch können Abweichungen minimiert und die Objektivität erhöht werden. In der lichtmikroskopischen Auszählung konnte festgestellt werden, dass die eingesetzten Verhältnisse von Milzzellen zu *T. cruzi* ganz entscheidende Auswirkungen auf die Aktivität der Milzzellen hatten. Bei gleichen Verhältnissen konnte nahezu keine Aktivität beobachtet werden, während ein zehn- oder zwanzigfacher Überschuss an Milzzellen zu einer starken Zunahme von toten Trypanosomen führte. Um für die folgenden Versuche eine optimale Aktivität erreichen zu können, wurden in den ersten Experimenten mit den CMFDA-markierten *T. cruzi* unterschiedliche Mengen an Milzzellen eingesetzt. Dazu wurden die Milzzellen in einem fünf-, zehn- und zwanzigfachen Überschuss eingesetzt und ihre Aktivität wie oben beschrieben analysiert (siehe 3.3.3).

In der Kontrolle, bei der die Trypanosomen unter Ausschluss der Milzzellen inkubiert wurden, zeigten 93% der Trypanosomen eine intensive Fluoreszenz und nur sehr wenige Zellen besaßen bereits vor der Inkubation mit den Milzzellen keine CMFDA-Markierung mehr (Abb. 3.21 A). Die gesteigerte Zugabe von Milzzellen zu den Trypomastigoten erhöhte den Anteil der toten Parasiten. Bei einem Verhältnis von 5:1 war der Anteil der toten Zellen rund 20%, bei 10:1 über 30% und bei 20fachem Überschuss 43% (Abb. 3.21 B-D).

Mit diesem Ergebnis konnte eine Lyse in Abhängigkeit der Anzahl an eingesetzten Milzzellen nachgewiesen werden, sodass die Aktivität gegen die extrazellulären *T. cruzi* durch eine Zerstörung der Membran-Integrität erfolgt.



Abb. 3.21: Die Aktivität von Milzzellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* hängt von der Anzahl der eingesetzten Milzzellen ab.

1 x 10⁵ Trypomastigote wurden mit CMFDA markiert und für 4 Stunden mit poly I:C voraktivierten Milzzellen inkubiert. Als Kontrolle wurden die Trypanosomen ohne Milzzellen inkubiert (A), in den anderen Ansätzen wurde die Anzahl der Milzzellen von 5:1 (B) über 10:1 (C) bis letztlich 20:1 (D) erhöht. Die Abzisse gibt die Intensität der CMFDA-Fluoreszenz an. Mit steigendem Milzzellzahl-Verhältnis nahm der Anteil der nicht fluoreszierenden Trypanosomen stark zu.

Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.5 Zeitabhängigkeit der Aktivität

In den vorherigen Experimenten wurde die Aktivität der Milzzellen nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden analysiert. In dieser kurzen Zeitspanne können naive Milzzellen aktiviert werden und noch bis zu 40% der eingesetzten *T. cruzi* töten. Eine Aktivierung durch kontakt-abhängige Prozesse erfolgt erst mit der Erkennung der fremden Zelle, woraufhin sofort Abwehrmechanismen wie z.B. die Freisetzung von gespeicherten Granula, erfolgen können. Im Gegensatz dazu benötigt eine Aktivierung durch Zytokine mehr Zeit, da sie unabhängig von der Erkennung und vor der Ausübung einer Aktivität erfolgen muß. Deshalb wurde in diesen Experimenten die Inkubationsdauer mit 30 min und 60 min bzw. mit 2, 3 und 4 Stunden variiert.

Die Milzzellen von C57BL/6-Mäusen waren entweder unbehandelt (Abb. 3.22 A-C) oder mit poly I:C voraktiviert (Abb. 3.22 D-F). Wiederum zeigten bereits unbehandelte Milzzellen eine deutliche Aktivität gegen die Trypomastigoten. Bereits nach 30 min waren rund 35% der Trypanosomen nicht mehr fluoreszierend (Abb. 3.22 A). Dieser Anteil konnte im Verlauf der Inkubation nur noch wenig gesteigert werden. Nach 60 min waren 37% der *T. cruzi* tot (Abb. 3.22 B) und innerhalb der folgenden 3 Inkubations-Stunden stieg die Anzahl auf schließlich rund 41% (Abb. 3.22 C). Voraktivierte Milzzellen übten erneut eine erhöhte Aktivität gegen

die Parasiten im Vergleich zu den unbehandelten Milzzellen aus. So konnten nach 30 min schon über 40% tote Trypanosomen detektiert werden (Abb. 3.22 D). Auch in diesen Ansätzen stieg der prozentuale Anteil während der Inkubation nur noch leicht an. Er stieg über 43% nach 60 min (Abb. 3.22 E) auf knapp 49% nach 4 Stunden an (Abb. 3.22 F).



Abb. 3.22: T. cruzi wird sehr schnell von NK-Zellen attackiert und lysiert.

 $1x 10^5$ CMFDA-markierte Trypomastigote wurden mit 1×10^6 Milzzellen mit variierter Zeitdauer inkubiert. Die Milzzellen waren entweder unbehandelt (A-C) oder mit poly I:C voraktiviert (D-F). Die *T. cruzi* wurden nach 30 min (A+D), 60 min (B+E) und nach 4 Stunden (C+F) auf ihre verbliebene Fluoreszenz analysiert. Unbehandelte Milzzellen zeigten schnell eine hohe Aktivität, die im Verlauf der Inkubation nur noch leicht anstieg. Die Aktivität voraktivierter Milzzellen lag unwesentlich über der der unbehandelten Zellen, folgte aber der gleichen Kinetik. Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.6 Detektierung der NK-Zell – Trypanosomen-Kontakte in der Durchfluss-Zytometrie

In der Elektronenmikroskopie konnten zahlreiche Kontakte zwischen NK-Zellen und *T. cruzi* beobachtet werden, die mit einer Aktivität gegen die Parasiten einhergingen. Die Frage ist jedoch, ob eine NK-Zelle nur einmal diese Aktivität ausüben kann, weil z.B. mit Freisetzung von gespeicherten Granula die Werkzeuge für einen zweiten Einsatz fehlen. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Inkubation der Milzzellen mit *T. cruzi* zu einem statischen Zustand führt, in dem jede NK-Zelle mit einem Trypanosom verbunden ist oder ob es sich um ein dynamisches System handelt, in dem nur ein Bruchteil der eingesetzten NK-Zellen zu bestimmten Zeitpunkt mit den Parasiten interagiert.

Zu diesem Zweck wurden Milzzellen von SCID-Mäusen verwendet und die NK-Zellen mit einem Antikörper, der gegen das für NK-Zellen spezifische DX5-Molekül gerichtetet ist, markiert. Das ermöglicht die seperate Detektion sowohl der Trypanosomen in der einen

cruzi Kontakten

im

Fluoreszenz als auch der NK-Zellen in einer anderen. Ziel des Versuches sollte die Identifizierung von "doppelt-positive" Zell-Zell-Verbindungen sein, bei denen es sich um die gesuchten NK-Zell – T. cruzi-Interaktionen handelt. Durch die statistische Auswertung dieser "doppelt-positiven" Population können Rückschlüsse auf die prozentualen Anteile an miteinander verbundenen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl getroffen werden.



Trypomastigote

Die Zellen wurden sofort im FACS analysiert. Bezüglich der Zellgröße und der Granularität (A) wurden andere Einstellungen verwendet als unter 3.2.3 beschrieben. Die Milzzellen teilten sich dabei in drei Subpopulationen und waren überwiegend in Gate R2 zu finden. Die Trypanosomen lagen ganz rechts unten im Gate R1. Zur Detektion der "doppelt-positiven" NK-Zell – T. cruzi Interaktionen wurden sowohl Gate R1 (B) als auch R2 (C) in ihrer Fluoreszenz untersucht. In R1 sind kaum

"doppelt-positive" Zell-Zell-Verbindungen zu finden, die in Gate R3

lokalisiert sein müssen. Die Anzahl der sich dort befindlichen Zellen unterschied sich jedoch nicht von der Kontrolle (B). Innerhalb der Milzzell-Population kommt es jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Komplexe (C) in R3.

Für die Untersuchungen mußten die Einstellungen im Durchfluss-Zytometer geändert werden, da mit den bisherigen Geräteeinstellungen (Abb. 3.20) keine "doppelt-positiven" Zellen gefunden werden konnten. Deshalb wurden Einstellungen gewählt, die die Lymphozyten in den Mittelpunkt stellen. Mit diesen Parametern für Zellgröße und Granularität lagen die Trypanosomen links unten (Abb. 3.23 A in Gate R1), während die NK-Zellen zentral zu finden waren (Abb. 3.23 A in Gate R2). Die in rot dargestellten Zellen (Abb. 3.23 B) beinhalteten alle Zellen, die in Abb. 12 A im Gate R1 lagen; die blau dargestellten Zellen (Abb. 3.23 C) waren ausschließlich in Gate R2 zu finden. Beide Zellpopulationen (Gate R1 und R2) wurden auf die Anteile der "doppelt-positiven"-Komplexe untersucht (Abb. 3.23 B und C, Gate R3).

Im Gate R1 stellten die Trypanosomen die überwiegende Mehrheit der Zellen. Dennoch waren einige NK-Zelle und viele nicht fluoreszierende Zellen, bei denen es sich vorrangig um tote Trypanosomen handeln dürfte, nachzuweisen (Abb. 3.23 B). Die Anzahl an Zell-Zell-Verdindungen war innerhalb dieses Gates sehr gering. Die Gesamtzahl von 250 Zellen

unterschied sich nicht von der Kontrolle, in der keine NK-Zellen vorhanden waren (keine graphische Darstellung).

In Gate R2 waren, neben wenigen Trypanosomen, vor allem NK-Zellen und "doppeltnegative" APZ vorhanden (Abb. 3.23 C). Bei den Zellen in R2 nahm die Zellzahl der "doppelt-positiven"-Komplexe stark zu. Im Vergleich zur Kontrolle, in der nur Milzzellen vorhanden waren, stieg die Anzahl von 48 Zellen auf über 1500 (Abb. 3.23 C, Gate R3). Der prozentuale Anteil war jedoch gemessen an der Gesamtzahl der Zellen im Gate R2 mit 0,45% relativ gering. Insgesamt waren nur rund 2% der eingesetzten NK-Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung mit einem *T. cruzi* verbunden, während knapp 10% der *T. cruzi* in einem Komplex gebunden waren, was an dem Überschuss an NK-Zellen lag.

3.3.7 Sind nur die NK-Zellen gegen extrazelluläre T. cruzi aktiv?

In Abschnitt 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen mit den Trypanosomen interagieren. Auch im vorangegangenen Abschnitt 3.3.6 wurden nur NK-Zellen eingesetzt. Die Frage, ob der Kontakt für die Lyse der Trypanosomen notwendig ist und ob nur die NK-Zellen die Fähigkeit besitzen, eine Aktiviät auszuüben, konnte nicht geklärt werden. In den ersten Versuchen mit CMFDA-markierten *T. cruzi* wurden ausschließlich Milzzellen von C57BL/6-Mäusen eingesetzt, sodass auch T-Zellen aktiv gewesen sein könnten, obwohl Milzzellen von SCID-Mäusen eine vergleichbare Aktivität zu normalen C57BL/6-Milzzellen besaßen (siehe 3.3.1).

Aufschluss soll eine *in vitro* Depletion von NK-Zellen aus der Milzzell-Suspension von C57BL/6-Mäusen mit MicroBeads geben. In den Experimenten wurden auch Milzzellen von SCID-Mäuse eingesetzt, um die Ergebnisse von 3.3.1 zu bestätigen.



Abb. 3.24: Depletion von NK-Zellen *in vitro* führt zu einer stark verminderten Aktivität.

 1×10^5 CMFDA-markierte Trypomastigote wurden mit 1×10^6 Milzzellen für 4 Stunden inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Die NK-Zellen wurden mit Micro-Beads depletiert; * $p \le 0,05$. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt. Sowohl die Milzzellen der C57BL/6-Mäuse als auch die der SCID-Mäuse waren in der Lage die Trypomastigoten zu lysieren (Abb. 3.24). Die Milzzellen der SCID-Mäuse zeigten dabei sogar mit rund 45% eine etwas höhere Aktivität als die der C57BL/6-Mäuse (37%). Die Milzzellen, aus denen die NK-Zellen depletiert wurden, besaßen noch etwa die Hälfte der Ausgangsaktivität im Vergleich zu den Gesamtmilzzellen (18%).

Dies könnte zwei Gründe haben:

- die Depletion der NK-Zellen war nicht vollständig, da mit MicroBeads maximal Reinheiten von 80-90% erreicht werden. Und eine Kontroll-Färbung im Durchfluss-Zytometer zeigte in der Tat noch verbliebene NK-Zellen.
- trotz des in der Elektronenmikroskopie gezeigten Ausbleibens von Zell-Zell-Kontakten zwischen T-Zellen und *T. cruzi* kommt es zu Wechselwirkungen, die unabhängig von NK-Zellen die Parasiten abtöten.

Deshalb wurden aus den Milzzellen von C57BL/6-Mäusen nicht nur die NK- sondern auch die T-Zellen (CD3⁺-Zellen) mit MicroBeads depletiert. Zur Kontrolle, ob auch von den T-Zellen eine Aktivität ausgehen kann, wurden CD3⁺-Milzzellen der gleichen Maus markiert und im FACSAria mit einer Reinheit von 99% separiert. Diese aufgereinigten T-Zellen wurden den NK und T-Zell-defizienten Milzzellen zugeführt und die Aktivität getestet, sodass letztlich in diesen Ansätzen nur die NK-Zellen fehlten.





 5×10^5 CMFDA-markierte *T. cruzi* wurden mit 5×10^6 unbehandelten Milz-Zellen von C57BL/6-Mäusen (A), mit 3,5 x 10^6 Milzzellen aus denen die NK- und CD3⁺-Zellen mit MicroBeads entfernt wurden (B), mit 5×10^6 MicroBeads behandelter Milzzellen, denen hochreine CD3⁺-T-Zellen der gleichen Maus wieder zugeführt wurden (C) und 1,5 x 10^6 hochreinen CD3⁺-T-Zellen (D) für 4 Stunden inkubiert. Die Aktivität der Milzzell-Ansätze wurde im Durchfluss-Zytometer analysiert. Die Gesamtmilz-Zellsuspension zeigte eine Aktivität gegen die markierten Trypomastigoten, die sehr stark zurückging, wenn die NK- und T-Zellen fehlten und sich auch durch eine Rückführung der T-Zellen nicht wieder erhöhte. Isolierte T-Zellen zeigten ebenfalls keine Aktivität, sodass letztlich nur NK-Zellen für die Aktivität gegen extrazelluläre Trypanosomen verantwortlich sind. Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

Insgesamt war die Aktivität der unstimulierten Milzzellen in diesen Versuchen nicht so hoch wie in den vorangegangenen. Die Anzahl der toten Trypanosomen betrug bei Einsatz der gesamten Milzzellen 22% (Abb. 3.25 A). Wurden die NK- und T-Zellen depletiert fiel der Anteil toter *T. cruzi* auf 5% ab (Abb. 3.25 B). Dieser geringe Anteil konnte auch durch erneute Zugabe der CD3⁺-T-Zellen nicht gesteigert werden. Er blieb konstant bei 5% (Abb. 3.25 C). Auch die isolierten T-Zellen zeigten keine messbare Aktivität, da die verbliebenen 3% toter Zellen der Negativ-Kontrolle entsprachen (Abb. 3.25 D).

Zusätzlich wurden auch B-Zellen einer Hybridoma-Zelllinie auf mögliche Aktivität gegen die Parasiten lichtmikroskopisch untersucht, da eine Auswertung dieser Zellen im Durchfluss-Zytometer nicht möglich war. Aber auch bei diesen Zellen konnte keine Aktivität beobachtet werden (3.3.1).

3.3.8 Die Aktivität gegen extrazelluläre *T. cruzi* ist kontaktabhängig.

Bisher konnte eine Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* und ein enger Kontakt zwischen diesen Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis, ob die Aktivität von diesem Kontakt abhängt, mußte noch erbracht werden.

Dazu wurden Milzzellen direkt mit den markierten Trypomastigoten oder getrennt von ihnen mit einem Zellkultur-Einsatz (siehe 3.2.3) inkubiert. Die Milzzellen, die direkt mit den Trypomastigoten inkubiert wurden, verursachten dabei erneut ein erhöhtes Absterben der Parasiten (Abb. 3.26 A). Die Trennung der Milzzellen von den Trypanosomen durch die Zellkultur-Einsätze führte zu einem vollständigen Abbruch der Aktivität (Abb. 3.26 B) und auch eine Voraktivierung der NK-Zellen durch poly I:C hatte keinen Einfluss (Abb 3.26 C).





 1×10^5 CMFDA-markierte Trypomastigote wurden mit 1×10^6 C57BL/6-Milzzellen direkt oder durch einen Zellkultur-Einsatz räumlich getrennt für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde im FACS die Aktivität gegen die Parasiten analysiert. Die direkte Inkubation unbehandelter Milzzellen (A) verursachte einen Anstieg toter *T. cruzi*. Wurde der Kontakt durch einen Zellkultur-Einsatz verhindert (B) konnten keine toten Trypanosomen nachgewiesen werden. Dies änderte sich auch dann nicht, wenn die Milzzellen mit poly I:C (C) voraktiviert waren. Die Sekretion von Zytokinen reicht demnach nicht aus, extrazelluläre *T. cruzi* zu beseitigen.

Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.9 Analyse der möglichen Effektormechanismen

NK-Zellen besitzen eine ausgeprägte zytotoxische Aktivität. Deshalb wurde untersucht, ob die nachgewiesene Fähigkeit extrazelluläre *T. cruzi* zu lysieren, durch zytotoxische Granula verursacht wird und welche Moleküle maßgeblich für die Aktivität verantwortlich sind.

Durch Inkubation von Lymphozyten mit Strontiumchlorid (SrCl₂) wird eine spontane Exozytose der zytotoxischen Granula ausgelöst, die u.a. Perforin und die Granzyme A und B enthalten (Quan et al., 1982; Neighbour et al., 1982). Dadurch verlieren zytotoxische Zellen ihre Wirksamkeit und sind nicht in der Lage, eine Zelle zu lysieren.

Wurden Milzzellen von C57BL/6-Mäusen mit SrCl₂ vorinkubiert, waren die NK-Zellen kaum noch in der Lage die Trypomastigoten zu töten (Abb. 3.27). Die Aktivität sank von ursprünglichen 37% der unbehandelten Milzzellen auf rund 11% bei den SrCl₂-behandelten. Die Restaktivität kann wiederum, wie schon bei der Depletion der NK-Zellen, durch unvollständige Degranulierung verursacht worden sein. Dennoch zeigte sich, dass die Aktivität von NK-Zellen gegen *T. cruzi* auf der Sekretion von zytotoxischen Molekülen basiert.

Das prominenteste zytotoxische Molekül ist Perforin. Es besitzt die Fähigkeit in Membranen Poren zu bilden, die zu einem Verlust der Membranfunktionalität führen und außerdem andere Moleküle wie z.B. die Granzyme in die Zelle gelangen zu lassen, wodurch eine Apoptose der Zielzellen ausgelöst wird.



Abb. 3.27: Aktivität gegen *T. cruzi* wird durch zytotoxische Granula vermittelt; ist jedoch unabhängig von Perforin.

5 x 10^5 CMFDA markierte Trypomastigote wurden mit 5 x 10⁶ Milzzellen von C57BL/6-Mäusen inkubiert, die zuvor über Nacht mit 250 mM SrCl₂ (+SrCl₂) behandelt wurden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Milzzellen eingesetzt. Von den Milzzellen der Perforindefizienten Mäuse (Perforin^{-/-}) wurden ebenfalls 5 x 10^6 eingesetzt. Eine induzierte Degranulierung durch Strontiumchlorid führte zu einem starken Absenken der Aktivität. Die Perforin-defizienten Mäuse aber zeigten eine vergleichbare Lyse der T. cruzi wie die unbehandelten Milzzellen von normalen C57BL/6-Mäuse; ** p ≤ 0,005. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Der Nachweis der Beteiligung von Perforin an der Lyse der Parasiten ist bei der gefundenen zytotoxischen Aktivität essentiell. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen von Perforin-defizienten Mäusen, bei denen es sich ebenfalls um C57BL/6-Mäuse handelte, mit den Trypomastigoten inkubiert.

Die Milzzellen dieser Mäuse waren gegen *T. cruzi* aktiv (Abb. 3.27): es konnte keinerlei Unterschied zwischen den Perforin-defizienten und den normalen C57BL/6-Mäusen beobachtet werden. Beide reduzierten den Anteil der lebenden *T. cruzi* um 37%.

Die Lyse von extrazellulären T. cruzi ist demnach nicht von Perforin abhängig.

3.3.10 Aktivierung von NK-Zellen gegen extrazelluläre T. cruzi

Grundsätzlich sind zwei Wege der Aktivierung von NK-Zellen bekannt:

1. Eine direkte Aktivierung über Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen, die ihren Liganden erkennen und binden.

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten intensive Kontakte zwischen den NK-Zellen und extrazellulären *T. cruzi* nachgewiesen werden, deren Ausbildung für die Lyse der Parasiten erforderlich ist. Viele der aktivierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen lösen eine sofortige direkte Lyse der als fremd erkannten Zellen aus. Es ist also denkbar, dass die Aktivierung der NK-Zellen über Rezeptor-Ligand-Interaktionen gesteuert wird. Deshalb wurde in den ersten Experimenten bezüglich der Aktivierung von NK-Zellen durch *T. cruzi* ein stark aktivierender Rezeptor auf der Oberfläche der NK-Zellen blockiert.

 Eine Aktivierung über Zytokine, die von APZ sezerniert werden. Dieser Weg ist ebenfalls möglich, da in allen durchgeführten Experimenten anfangs APZ vorhanden waren, die nach Kontakt mit *T. cruzi* durch eine Freisetzung von Zytokinen NK-Zellen aktivieren könnten.

3.3.10.1 Der NKG2D-Rezeptor

NK-Zellen exprimieren mehrere Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die bei Bindung an ihren Liganden, die NK-Zellen aktivieren können. Der NKG2D-Rezeptor ist einer der bekanntesten und nachweislich für die Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen verantwortlich (Bauer et al., 1999). Ein Engagement von NKG2D induziert eine starke zytotoxische Aktivität. Bei dem Rezeptor handelt es sich um lektin-ähnliches Protein, weshalb es denkbar ist, dass unspezifisch Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der Trypanosomen erkannt werden. Durch Zugabe eines Antikörpers, der spezifisch den NKG2D-Rezeptor erkennt, kann eine eventuelle Interaktion mit *T. cruzi* verhindert werden.

Durch die Vorbehandlung der Milzzellen von C57BL/6-Mäusen mit dem blockierenden Antikörper gegen NKG2D konnte keine Inhibierung der Aktivität gegen *T. cruzi* beobachtet werden (Abb. 3.28). Im Gegenteil kam es bei unbehandelten Milzzellen zu einem Anstieg an toten *T. cruzi* in Anwesenheit des Antikörpers von 35% auf 40%, bei den poly I:C voraktivierten Zellen von 37% auf 41%.

Der NKG2D-Rezeptor ist damit weder an der Aktivierung von NK-Zellen noch an der Freisetzung der zytotoxischen Granula beteiligt.



Abb. 3.28: Die Blockierung des aktivierenden Rezeptors NKG2D kann die Lyse von *T. cruzi* nicht verhindern.

 $1 \ge 10^5$ CMFDA-markierte *T. cruzi* wurden mit $1 \ge 10^6$ Milzzellen 4 Stunden inkubiert. Einem Teil der Milzzellen wurde 30 min vor Zugabe zu den *T. cruzi* 20 µg/ml des gegen NKG2D gerichteten Antikörpers zugesetzt, der eine Blockierung des Rezeptors verursacht. Für die Experimente wurden unbehandelte (A+B) und poly I:C voraktivierte (C+D) Milzzellen eingesetzt. In beiden Fällen konnte die Aktivität der Milzzellen (A+C) durch die Zugabe von anti-NKG2D nicht blockiert werden, sondern führte sogar zu einem leichten Anstieg der Aktivität (B+D). Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.10.2 Einfluss von Zytokinen bei der Aktivierung von NK-Zellen

Neben den kontakt-abhängigen Rezeptor-Ligand-Interaktionen sind wie bereits erwähnt auch durch Zytokin-Sekretion vermittelte lösliche Wirkungsmechanismen möglich, um NK-Zellen zu aktivieren. Antigenpräsentierende Zellen sezernieren sehr schnell nach einer Infektion IL-12, dessen Rezeptor auf NK- und T-Zellen zu finden ist und die deshalb durch IL-12 aktiviert werden können. Um die Frage zu beantworten, ob IL-12 einen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegen *T. cruzi* besitzt, wurden Milzzellen von IL-12 defizienten Mäusen mit den Trypanosomen inkubiert und die Auswirkungen im FACS analysiert.



Abb. 3.29: Milzzellen von IL-12-defizienten Mäusen zeigen kaum Aktivität gegen extrazelluläre Trypanosomen.

1 x 10^5 CMFDA-markierte *T. cruzi* wurden mit 1 x 10^6 Milzzellen von C57BL/6 (A) oder IL-12defizienten Mäusen (B-D) 4 Stunden inkubiert. Die Milzzellen waren entweder unbehandelt (A+B), mit poly I:C voraktiviert (C) oder es wurde durch Zugabe von SrCl₂ eine Degranulierung der zytotoxischen Granula induziert (D).

Die nachgewiesene Anzahl an nicht fluoreszenten *T. cruzi* entsprach einem Niveau, das in vielen Experimenten der Negativ-Kontrolle entsprach, konnte aber durch die Zugabe von SrCl₂ nochmals reduziert werden, sodass die Milzzellen eine minimale Aktivität gegen *T. cruzi* besaßen. Die Ergebnisse repräsentieren einen von drei unabhängigen Versuchen.

Es zeigte sich, dass Milzzellen der IL-12-defizienten Mäusen nicht in Lage waren, die Parasiten zu bekämpfen (Abb. 3.29). Die Aktivität, die bei den normalen Kontroll-Mäusen bei 31% lag (Abb. 3.29 A), blieb deutlich unter 10%. Bei unbehandelten Milzzellen betrug sie 7% (Abb. 3.29 B) und auch die Inkubation mit poly I:C konnte den Anteil an toten *T. cruzi* (8%) nicht steigern (Abb. 3.29 C). Die geringe Aktivität wurde durch die Behandlung der Milzzellen mit Strontiumchlorid auf 2% weiter minimiert, was der Negativ-Kontrolle dieses Experimentes entsprach (Abb. 3.29 D).

4. Diskussion

Der Entwicklungszyklus von *Trypanosoma cruzi* ist durch die intrazelluläre Vermehrung und die extrazelluläre Verbreitung im Wirt charakterisiert. Die Fähigkeit der Replikation ist ausschließlich auf das intrazelluläre amastigote Stadium beschränkt, während die durch den Blutkreislauf stattfindende Distribution im Organismus durch das trypomastigote Stadium erfolgt. Die Immunabwehr ist also nicht nur gefordert, die intrazelluläre Vermehrung zu inhibieren, sondern auch die ungehinderte Verbreitung der Parasiten im Wirt zu verhindern.

Aktivierte NK-Zellen können sich an der Immunantwort sowohl durch Zytokin-Sekretion als auch durch Zytotoxizität beteiligen. In einer *T. cruzi*-Infektion wurden NK-Zellen als Quelle des ersten IFN- γ identifiziert (Cardillo et al., 1996), dessen frühzeitige Freisetzung für eine erfolgreiche Immunantwort gegen die Trypanosomen von immenser Bedeutung ist. Dadurch wird eine T_H1-Antwort initialisiert, also eine zellvermittelte Immunantwort, die infizierte Zellen zur Abwehr von Pathogenen aktiviert und dadurch antimikrobielle Effektormechanismen in infizierten Zellen induziert (Spellberg & Edwards, 2001). Vor allem Stickstoffmonoxid (NO) ist ein potentes Effektormolekül zur Beseitigung von verschiedenen intrazellulären Pathogenen und wird vorrangig durch IFN- γ induziert (Däubener et al., 1999).

Schon 24 Stunden nach Infektion kann ein starker Anstieg an IFN-γ-mRNA nachgewiesen werden, der nicht zu beobachten ist, wenn die NK-Zellen vor der Infektion depletiert wurden. Dies wird auch als Grund für die stark erhöhte Suszeptibilität von NK-Zell-defizienten Mäusen bei einer Infektion mit *T. cruzi* angesehen (Cardillo et al., 1996; Cardillo et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung der NK-Zellen an der Immunantwort bestätigt und die Bedeutung verifiziert werden. Es wurde bewiesen, dass aktivierte NK-Zellen nicht nur die Abwehr intrazellulärer *T. cruzi* unterstützen, sondern auch die Zahl der extrazellulären *T. cruzi* kontrollieren. In Bezug auf die Immunabwehr gegen intrazelluläre Parasiten konnten die erbrachten Ergebnisse belegen, dass nicht nur Makrophagen *T. cruzi* an der Replikation hindern können, sondern auch in Fibroblasten Effektormechanismen zur Abwehr von *T. cruzi* durch NK-Zellen induziert werden.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in einer *T. cruzi*-Infektion wichtig sind, um die Anzahl der extrazellulären Trypanosomen während der akuten Phase im Blut zu minimieren. Das Abtöten der Parasiten wurde durch eine kontaktabhängige Lyse verursacht, wobei neue Erkenntnisse zum Mechanismus dieser lytischen Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* gewonnen werden konnten.

4.1 Aktivierung von NK-Zellen im Verlauf einer T. cruzi-Infektion

In einer *T. cruzi*-Infektion kann eine sehr schnelle Aktivierung von NK-Zellen beobachtet werden. Bereits 24 Stunden nach erfolgter Invasion der Trypanosomen können stark erhöhte mRNA-Expression von IFN- γ nachgewiesen werden (Une et al., 2000). Es wird aber nicht nur eine zytokinfreisetzende Reaktion durch *T. cruzi* induziert, sondern ebenso eine zytotoxische Antwort (Une et al., 2003 und 3.2.1).

Diese Aktivierung war in der *T. cruzi*-Infektion obligat abhängig von einer APZ-Anwesenheit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die zytokin-sezernierende als auch zytotoxische Aktivität von NK-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass isolierte naive NK-Zellen zu keiner lytischen Reaktion veranlaßt werden konnten. Es konnte weder eine verstärkte Immobilität der Trypanosomen in der lichtmikroskopischen Untersuchung der lytischen Aktivität noch eine Freisetzung von IFN- γ im ELISpot beobachtet werden. In einer Leishmanien-Infektion konnte in Bezug auf die Sekretion von IFN- γ gegenteiliges gezeigt werden. Viable extrazelluläre Leishmanien induzierten in diesen Untersuchungen in NK-Zellen eine IFN- γ -Antwort. Hitzeinaktivierte Leishmanien konnten ebenso wie tote *T. cruzi* keine Aktivität auslösen. Der Mechanismus dieser Aktivierung, d.h. auslösende Rezeptoren oder autokrin wirkende Zytokine konnten aber noch nicht beschrieben werden (Nylen et al., 2003). Allerdings konnte bei NK-Zellen in der Leishmanien-Infektion keine zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden.

Unter Beteiligung von APZ dagegen findet in einer *T. cruzi*-Infektion eine Aktivierung von NK-Zellen statt. Im ELISpot wurde eine Milzzellsuspension von SCID-Mäusen, in denen keine T- und B-Zellen nachzuweisen sind, aber APZ *in vitro* durch *T. cruzi* zu einem IFN- γ Ausstoß aktiviert. Gleiches gilt für die zytotoxische Aktivität, die ebenfalls *in vitro* in Anwesenheit von APZ zu einer signifikant gesteigerten Lyse von Yac-Zellen führte, einer Zelllinie, die aufgrund einer fehlenden MHC-I-Expression spezifisch von aktivierten NK-Zellen erkannt und lysiert wird.

Die Abhängigkeit einer NK-Zell-Aktivierung von APZ beruhte auf der Freisetzung von IL-12 durch die antigenpräsentierenden Zellen. IL-12 ist ein dimeres Zytokin, das aus den Untereinheiten p35 und p40 (zusammen als IL-12 p70 bezeichnet) besteht (Schönhaut et al., 1992; Podlaski, 1992). Die p40-Untereinheit ist in der Lage ein Homodimer zu bilden (p80), das die Wirkung des IL-12 p70 neutralisiert, indem es an den IL-12-Rezeptor bindet ohne eine aktivierende Signalkaskade auszulösen (Hölscher et al., 2001). Der Rezeptor von IL-12 wird auf T- und NK-Zellen exprimiert und besteht aus den Untereinheiten R1, an die p40 bindet und R2, an die p35 bindet (Desai et al., 1992). Die Bindung von p35 an die R2-Untereinheit des Rezeptors wird für die biologische Aktivität des IL-12 als essentiell betrachtet.

Ruhende NK-Zellen werden von IL-12 zu einer IFN-γ-Produktion aktiviert (Frosch et al., 1996; Antunez et al., 2000). Diese Aktivierung kann noch synergistisch mit IL-18 gesteigert werden. Sowohl IL-12 als auch IL-18 werden sehr schnell von Makrophagen und dendritischen Zellen nach Kontakt mit Pathogenen sezerniert (Meyer zum Büschenfelde et al., 1997). Allerdings reicht IL-18 nicht aus, NK-Zellen genügend stark zu aktivieren. Dies zeigt

sich in IL-12 defizienten Mäusen. Eine IL-12-Defizienz führt in einer Reihe von Infektions-Modellen wie z.B. *Leishmania major* (Mattner et al., 1996), *L. donovani* (Satoskar et al., 2000), *Toxoplasma gondii* (Ely et al., 1999) oder *Listeria monocytogenes* (Brombacher et al., 1999), aber auch in einer *T. cruzi*-Infektion zu einer stark erhöhten Suszeptibilität (Müller et al., 2001; Michailowsky et al., 2001; Silva et al., 1998; Aliberti et al., 1996), was vermutlich durch eine erheblich geringere IFN- γ -Konzentration verursacht wird, wobei bemerkenswert ist, dass auch in einer IL-12 defizienten Maus noch immer IFN- γ nachzuweisen ist, was auf IL-12 unabhängige Mechanismen der IFN- γ -Induktion hinweist. Eine Defizienz von IL-18 hingegen hat keine Auswirkungen auf die Parasitämie oder Mortalität in *T. cruzi* infizierten Mäusen (Gräfe et al., 2003).

Allerdings nimmt IL-12 nicht nur die Schlüsselrolle bei der Initialisierung einer IFN- γ -Sekretion durch Lymphozyten ein, sondern verstärkt zudem die zytotoxische Aktivität von NK- und T-Zellen und fördert auch die Generierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen (Trinchieri, 1994).

Die durch IL-12 induzierte frühzeitige Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen, das in Makrophagen eine Induktion von NO bewirkt, stand in vorangegangenen Studien im Focus des Interesses (Reed, 1988; Golden & Tarleton, 1991; Rottenberg et al., 1996). Die Wichtigkeit dieser Induktion konnte sowohl anhand von iNOS- als auch von IFN- γ defizienten Mäuse bewiesen werden, da beide eine erheblich gesteigerte Suszeptibilität verglichen mit normalen Mäusen zeigten (Hölscher et al., 1998; Michailowsky et al., 2001).

Wie bereits beschrieben wirkt das von den NK-Zellen produzierte IFN- γ insbesondere auf Makrophagen. Da die Bedeutung von NK-Zellen in der Kontrolle der Parasiten in der Frühphase der Infektion liegt, stellt sich die Frage, ob auch andere Zellen, die von *T. cruzi* infiziert werden auf die Sekretion von IFN- γ mit antimikrobiellen Effektormechanismen antworten können. Hierbei sind vor allem Fibroblasten von Bedeutung, da sie in hoher Anzahl in der extrazellulären Matrix im Unterhautgewebe vorliegen und, wie *in vitro*-Versuche zeigten, stark infiziert werden. Wiederum in Leishmanien-Infektionen wurde gezeigt, dass die Parasiten die Fibroblasten nutzen, um einer Bekämpfung durch aktivierte Makrophagen zu entgehen. Die Fibroblasten werden allerdings nicht zur Vermehrung genutzt, sondern ausschließlich zur Persistenz, da in den Fibroblasten nur ein bis zwei Parasiten pro Zelle gefunden werden konnten. Die Fibroblasten werden wahrscheinlich aufgrund einer eingeschränkten Aktivität der iNOS als optimales Habitat zur Persistenz genutzt (Bogdan et al., 2000). Ob ähnliches in einer *T. cruzi*-Infektion beobachtet werden konnte, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.2 Effektormechanismen in Fibroblasten

Die Infektion von Fibroblasten mit *T. cruzi* bewirkt im allgemeinen eine inhibierte Mitose und eine Schädigung des Zytoskeletts (Clark & Kuhn, 1999). Eine Analyse der mRNA-Expression in infizierten humanen Fibroblasten zeigte in den ersten beiden Stunden nach der Infektion keine Veränderungen und auch 24 Stunden nach Infektion konnte maximal eine Verdopplung der mRNA-Expression einer Anzahl von Genen (darunter die der Typ-I-Interferone; siehe unten) beobachtet werden (Vaena da Avalos et al., 2002).

Außerdem konnten bei *in vitro*-Versuchen mit Maus-Fibroblasten starke Interaktionen mit Milzzellen nachgewiesen werden, die auch durch mehrmaliges Waschen nicht unterbunden werden konnten (Kuhn & Murnane, 1977). Diese Kontakte zwischen Fibroblasten und Milzzellen verursachten eine Lyse der Fibroblasten, die jedoch nie mit einer Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) verbunden war (Kuhn & Murnane, 1977; Clark & Kuhn, 1999). In den Versuchen wurden allerdings Milzzellen von infizierten bzw. immunisierten Mäusen verwendet, bei denen bereits spezifische zytotoxische T-Zellen ausgebildet waren und die somit die Lyse induzieren konnten. Naive Milzzellen waren nicht in der Lage, die infizierten Fibroblasten zu zerstören (Kuhn & Murnane, 1977). NK-Zellen scheinen demnach keine zytotoxische Aktivität gegen infizierte Fibroblasten ausüben zu können.

Grundsätzlich ist eine zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegen infizierte Fibroblasten möglich, wenn auch unwahrscheinlich. Die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche der Fibroblasten wird durch die Infektion mit T. cruzi nicht vermindert bzw. konnte in einigen Zelllinien sogar verstärkt (Stryker & Nickell, 1995). Eine MHC-I-Expression schützt Zellen im Normalfall vor einer NK-Zell-induzierten Lyse, da sie zu einer Inhibierung von zytotoxischer Aktivität führt (siehe Einleitung). Allerdings kann in einigen Fällen eine Aktivität trotz MHC-I-Expression beobachtet werden (z.B. bei mit Adenoviren infizierten Zellen). Als Grund dafür wird eine klonale Selektivität bei der Expression unterschiedlicher Rezeptoren auf den NK-Zellen diskutiert (Routes et al., 2001). Diese Unterschiede in der Rezeptor-Expression können durchaus beobachtet werden. So können sowohl in Mäusen als auch im Menschen aktivierende Rezeptoren nachgewiesen werden, die an MHC-I binden. In Mäusen handelt es sich um den Rezeptor Ly49D. Wie in der Einleitung beschrieben besitzen die aktivatorischen Rezeptoren, die an MHC-I binden, eine wesentlich geringere Affinität zu den Molekülen. Im Fall des Ly49D kann die Affinität durch IL-12 extrem gesteigert werden, sodass auch in Anwesenheit von inhibitorischen Ly49-Rezeptoren eine Aktivierung erfolgen kann. Allerdings konnte bisher nur eine zytokin- und chemokinsezernierende Aktivität beobachtet werden (Ortaldo & Young, 2003). Auf humanen NK-Zellen findet sich der KIR2DL4, der ebenfalls MHC-I erkennt. In aktivierten Zellen kann durch sein Engagement die Zytotoxizität gesteigert werden, in naiven kommt es zu einer IFN- γ -Antwort (Rajugopalan et al., 2001).

Eine zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegen infizierte Zellen ist demnach vorstellbar, in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnten aber keine Anzeichen einer durch NK-Zellen vermittelten Zelllyse beobachtet werden.

Das verwendete Infektions-System erlaubte eine quantitative Analyse der Parasitenlast in den infizierten Zellen. In den Versuchen wurden Milzzellen von CBA/j-Mäusen eingesetzt, die den gleichen Haplotyp wie die L929-Fibroblasten besitzen, wodurch die Lymphozyten die Fibroblasten als "selbst" erkennen und es deshalb in einer Inkubation von nicht-infizierten

Fibroblasten und Milzzellen zu keinerlei Aktivierung kommt. Die Infektion der Fibroblasten unter den gewählten Bedingungen führte dazu, dass innerhalb der Inkubationszeit von drei Tagen mindestens 70% der Zellen infiziert waren. Daraufhin wurden die Zellen weitere zwei Tage mit den Milzzellen inkubiert. In dieser kurzen Inkubationsdauer kann eine spezifische T-Zell-Antwort ausgeschlossen werden.

Die Inkubation der *T. cruzi*-infizierten Fibroblasten mit Milzzellen führte zu einer deutlichen Reduzierung der Parasitenlast innerhalb der L929-Zellen. Dabei zeigten voraktivierte Milzzellen zwar eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu naiven Milzzellen, dennoch waren auch die unbehandelten Lymphozyten gegen die infizierten Fibroblasten aktiv. Milzzellen können demnach von infizierten Fibroblasten aktiviert werden. Diese Aktivierung ist zudem nicht von einem Kontakt zwischen den Lymphozyten und den L929-Zellen abhängig gewesen, da eine unverminderte Aktivität auch unter Verwendung eines Zellkultur-Einsatzes beobachtet werden konnte und die Milzzellen demnach durch lösliche Moleküle aktiviert werden. Allerdings werden von den infizierten Fibroblasten wie zu erwarten kein aktivierendes IL-12 oder TNF- α freigesetzt, deshalb kommen zwei andere mögliche aktivierende Moleküle in Frage:

1. Die Fibroblasten reagieren auf eine *T. cruzi*-Infektion mit einer deulichen Induktion von Typ-I-Interferonen. Zu der Familie der Typ-I-Interferone gehören eine Reihe von unterschiedlichen Molekülen. Die am besten untersuchten sind die Interferone α und β (IFN- α und β). Sie werden sowohl von Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und dendritischen Zellen als auch von NK- und T- Zellen freigesetzt. Eine Induktion in der Zelle erfolgt u.a. durch Viren, mikrobielle Pathogene und deren Produkte. Die Typ-I-Interferone wirken in vielfältiger Weise auf Makrophagen und Fibroblasten, sind aber auch potente Aktivatoren von NK- und T-Zellen (Bogdan, 2000; Salazar-Mather et al., 2002; Une et al., 2003). Für Leishmanien-Infektionen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Applikation von rekombinantem IFN- β *in vivo* neben einer Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität und T-Zell-Proliferation eine Freisetzung von IL-12 und IFN- γ induzieren kann (Mattner et al., 2004).

2. *T. cruzi* expremiert auf seiner Oberfläche sehr viele Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Muzine. Durch diese Muzine wird IL-12 in Makrophagen induziert (Camargo et al., 1997). Interessanterweise waren allerdings nur Trypanosomen in der Lage IL-12 zu induzieren, die bereits einen Zyklus in Wirtszellen durchlaufen haben. Parasiten, die direkt aus den Insektenüberträgern isoliert wurden, riefen keine Reaktion hervor. Ursache für dieses Phänomen könnte die Beladung der Trypanosomenoberfläche mit körpereigenen Sialinsäuren sein. *T. cruzi* sezerniert eine Transsialidase, ein Enzym, das den Transfer von wirtseigenen Sialinsäuren (siehe 4.4.1) vorrangig auf Muzine der Trypanosomen katalysiert (Schenkman, 1999). Ausser bei *T. cruzi* konnte eine homologe Transsialidase nur noch bei *Trypanosoma brucei* (Montagna et al., 2002) unter den Eukaryoten und *Corynebakterium diphtheriae* (Crocker & Varki, 2001) bei den Prokaryoten beschrieben werden. Die Funktion des Transfers von wirtseigenen Sialinsäuren konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Es deutet aber vieles auf eine Unterstützung bei der Invasion in die Wirtszellen hin (Pereira et al.,

1996). Zudem könnten sich die Trypanosomen dadurch der Immunantwort entziehen, da Sialinsäuren im allgemeinen im Blut zirkulierende Zellen vor einem Abbau in der Leber und einer Aktivierung des Komplementsystems schützen.

Diese GPI-verankerten Muzine werden durch die Aktivität der Phospholipase C permanent von der Oberfläche der Trypanosomen abgespalten und liegen somit löslich im Überstand der Zellkultur vor (de Almeida & Heise, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass diese löslichen GPI-verankerten Moleküle von *T. cruzi* an Toll-like Rezeptor 2 binden können (Campos et al., 2001) und möglicherweise dadurch eine IL-12-Freisetzung in Makrophagen, die in der Milzzell-Suspension vorhanden waren, induzieren.

Auf T-Zellen dagegen üben diese Muzine eine suppressorische Wirkung aus. Die bereits beschriebene Suppression von T-Zellen in einer *T. cruzi*-Infektion (Einleitung), kann auch durch nicht-infizierte, eukaryotische Zellen verursacht werden, wenn diese Zellen durch eine Transfektion die *T. cruzi*-spezifischen Muzine auf ihrer Oberfläche exprimieren (Argibay et al., 2002). Eine Aktivierung von NK-Zellen können diese Muzine aber offensichtlich nicht inhibieren.

Durch das in der Zellkultur gut messbare IL-12 wird in NK-Zellen und T-Zellen wie erwähnt IFN- γ induziert. Allerdings ist die Induktion von IFN- γ nicht von IL-12 abhängig. Zwar minimierte sich die Produktion von IFN- γ , wenn IL-12 durch einen Antikörper neutralisiert wurde, doch konnte dieser Effekt gänzlich aufgehoben werden, wenn die Milzzellen mit poly I:C stimuliert waren. Als Folge dessen konnten auch keine Unterschiede in der Reduzierung der Parasitenlast unter Verwendung der anti-IL-12-Antikörper beobachtet werden. Als auslösende Faktoren einer IFN- γ -Antwort kommen wiederum die Typ-I-Interferone in Frage, da auch in den Milzzellen eine deutlich Induktion von IFN- α und β nachgewiesen werden konnte.

Dagegen führte eine Blockierung von IFN- γ zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Aktivität, wodurch deutlich wird, dass IFN- γ der hauptsächliche Induktor von NO in den Fibroblasten ist, von dem die Aktivität ausschließlich abhängt. Im Western-Blot konnte eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch die Inkubation mit Milzzellen gezeigt werden. *T. cruzi* alleine kann keine NO-Synthese induzieren, da infizierte Fibroblasten ohne Milzzell-Einwirkung keine verstärkte iNOS-Induktion zeigten. Die Blockade der iNOS in den Fibroblasten durch Aminoguanidin (AG) bewirkte die nahezu vollständige Aufhebung einer Aktivität gegen die intrazellulären Parasiten. Gleiche Ergebnisse erbrachten *in vivo*-Versuche: Die Applikation von Aminoguanidin *in vivo* ließ die Mortalität der infizierten Mäuse dramatisch steigen (Säftel et al., 2001). Allerdings mußte die Inhibierung mit der Infektion erfolgen, um Wirkung zu zeigen. Begann die Blockade erst einige Tage nach der Infektion waren keine Auswirkungen zu beobachten, was die immense Bedeutung einer frühzeitigen Aktivierung des Immunsystems unterstreicht.



Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Aktivierung von NK-Zellen durch Fibroblasten und die Induktion von Effektormechanismen zur Kontrolle intrazellulärer *T. cruzi*.

Überraschend waren die Befunde, die sich durch Inkubation der infizierten Fibroblasten mit Milzzellen von SCID-Mäusen ergaben. Zwar waren naive Milzzellen ebenfalls in der Lage, in kontakt-unabhängiger Weise die Parasitenlast zu reduzieren; es konnten aber sowohl in einer direkten als auch in einer durch einen Zellkultur-Einsatz räumlich getrennten Inkubation keine Zytokine gemessen werden. Auch die Produktion von NO blieb völlig aus. Anders war der Sachverhalt bei einer Voraktivierung der Milzzellen durch poly I:C, wodurch eine deutlich nachweisbare Menge an IL-12 und IFN-γ sowie einer NO-Synthese induziert wurde. Aber auch in diesem Fall war die freigesetzte Menge an Zytokinen wesentlich geringer verglichen mit der Produktion von Milzzellen von CBA/j-Mäusen. Vermutlich lag die Konzentration der Zytokine, die von unbehandelten Milzzellen von SCID-Mäusen sezerniert wurden unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA, was jedoch nicht bedeutet, dass die biologische Wirksamkeit aufgehoben war. Im ELISA werden die Moleküle erst ab einer Konzentration im Pikogramm-Bereich nachgewiesen, was schon sehr sensitiv ist, aber doch deutlich über den benötigten Konzentrationen für eine funktionelle Wirksamkeit der Zytokine auf die jeweiligen Zellen liegt. Es ist deshalb davon auszugehen, dass auch Milzzellen von SCID-Mäusen ihre Aktivität über IFN-y und NO ausüben, zumal diese Milzzellen von Trypomastigoten im ELISPOT zu einer IFN-γ-Antwort angeregt werden können.

Doch selbst bei einer ausbleibenden Induktion von NO stehen einer Zelle noch weitere Enzyme und Moleküle zur Verfügung, intrazelluläre Pathogen zu bekämpfen. So kann z.B. die Bildung von Wasserstoffperoxid oder andere Sauerstoffradikalen sowie der Indolamin 2,3-dioxigenase (IDO) induziert werden, einem Enzym, das den Verbrauch von Tryptophan katalysiert, das für viele intrazelluläre Parasiten für ihre Entwicklung essentiell ist. Diese Prozesse werden ebenfalls vorrangig durch IFN- γ induziert (Alberati-Giani et al., 1997).

4.3 Auswirkungen der NK-Zell-Depletion auf Parasitämie, Mortalität und Persistenz

In dieser Arbeit konnte eine Aktivität von NK-Zellen gegen intrazelluläre *T. cruzi* nachgewiesen werden. Dabei wurden nicht nur Makrophagen zu einer Reaktion stimuliert, sondern auch Fibroblasten, die nicht auf die Abwehr von Pathogenen spezialisiert sind. Durch eine Depletion der NK-Zellen sollte untersucht werden, ob die frühzeitig einsetzende Aktivität von NK-Zellen auch die Parasitenlast in den infizierten Organen beeinflussen kann. Die Applikation der anti-Asialo GM-Antikörper beseitigte den überwiegenden Anteil der NK-Zellen aus dem Blut. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Berichten (Cardillo et al., 2002), konnte keine erhöhte Mortalität bei NK-Zell-depletierten im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen festgestellt werden. Die Überlebensrate von Mäuse in experimentellen Infektionen unterliegt jedoch oft größeren Schwankungen, da sie extrem vom eingesetzten *T. cruzi*-Stamm abhängt, wobei die Infektiösität durch die Art und Weise der Infektion (ob i.p. oder subkutan, wie in dieser Arbeit) beeinflußt wird, da eine Injektion führt. Deshalb sind Unterschiede in Bezug auf Sterblichkeit in unterschiedlichen Experimenten nicht ungewöhnlich und nicht zu vermeiden.

Dagegen stieg die Anzahl der Parasiten im Blut unter einer NK-Zell-Defizienz dramatisch an. Die Parasitenlast in den untersuchten Geweben blieb allerdings wie die Mortalität relativ unbeeinflusst. Es konnten zwar unterschiedliche Parasiten-Belastungen in den einzelnen Geweben beobachtet werden, doch waren diese zu keinem Zeitpunkt der Infektion signifikant. Dennoch überraschte die Tatsache, dass in der akuten Phase der Infektion (12 dpi) in allen untersuchten Geweben die Persistenz in Organen von NK-Zell-depletierten Mäusen unterhalb der der unbehandelten Mäusen lagen. In beiden Maus-Gruppen zeigte die Herzmuskulatur die geringste Parasitenlast, obwohl im Herzen die verheerendsten Folgen der Chagas-Krankheit zu beobachten sind (Tanowitz, 1992). Auch in der chronischen Phase zeigte das Herz die geringste *T. cruzi*-Anzahl. Das Herz war zudem das einzige Organ, das permanent geringere Parasitenlasten in NK-Zell-defizienten Mäusen aufwies. In der Tat näherten sich die Werte der Nachweisgrenze von *T. cruzi*-DNA, die in der Leber und Milz zu jedem untersuchten Zeitpunkt nicht überschritten wurde. Die Lymphknoten zeigten auch in der chronischen Phase eine deutliche Parasitenlast, die jedoch in beiden Mausgruppen identisch waren.

Die Skelettmuskulatur aber zeigte von allen untersuchten Geweben die mit Abstand höchste Belastung mit *T. cruzi*. Schon in der akuten Phase waren die Werte leicht erhöht verglichen mit den anderen Organen. In der chronischen Phase jedoch stieg die Parasitenlast im Muskel drastisch an. Außerdem änderte sich das Verhältnis in der chronischen Phase: NK-Zell-depletierte Mäuse hatten mehr Parasiten im Gewebe als unbehandelte Mäuse und das, obwohl die Depletion über ein Jahr vergangen war.

Die Skelettmuskulatur konnte nicht nur in dieser Arbeit als das präferierteste Gewebe für die Persistenz von *T. cruzi* identifiziert werden (Kumar & Tarleton, 2001). Die Gründe liegen wahrscheinlich in einer vollständigen Immunsuppression in der Skelettmuskulatur, während

im Herzen auch in der chronischen Phase inflammatorische Herde nachzuweisen sind (dos Santos et al., 2001). Vor allem CD8⁺-T-Zellen invadieren die infizierten Gewebe in hohem Ausmaß. Schon in der latenten Phase sind vorrangig CD8⁺-T-Zellen in den Geweben vorhanden, die permanent die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ sezernieren, während CD4⁺-T-Zellen vermehrt in den parakordialen Lymphknoten anzutreffen sind (dos Santos et al., 2001). Die CD8⁺-T-Zellen zeigen oft einen veränderten Phänotyp und regulieren den T-Zell-Rezeptor hinunter, wodurch die Zytokinproduktion aber nicht beeinträchtigt wird (Grisotto et al., 2001). Durch die permanente Ausschüttung von TNF- α und IFN- γ kommt es zur Induktion von iNOS in den Muskelzellen der parasitierten Gewebe. NO verhindert nicht nur die Teilung der Amastigoten in den Zellen, sondern ist auch für die Zellen ansich toxisch, wodurch es vermutlich zu den starken Entzündungen kommt, die das Gewebe auf Dauer zerstören. In einer veröffentlichten Hypothese, die sich ausschließlich auf bekannte Erkenntnisse stützt, wurde spekuliert, dass der sehr hohe Myoglobin-Gehalt der quergestreiften Muskulatur eine NO-induzierte Inflammation im Gewebe verhindert. Myoglobin kann NO binden und dessen Wirkung neutralisieren. So kommt es zwar zu einer permanenten Produktion von NO, dieses kann aber nicht auf andere Zellen schädlich einwirken, wodurch eine Schädigung der Skelettmuskulatur verhindert wird (Ascenzi et al., 2001). Die Skelett- oder quergestreifte Muskulatur unterscheidet sich in ihrem Aufbau wesentlich von der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur des Darmes. Obwohl auch in diesen Organen Myoglobin nachweisbar ist und eine Inflammation verhindert werden müßte, könnte in der unterschiedlichen Struktur der Grund für die Dilatationen in Herz und Darm liegen. Denn das die permanenten inflammatorischen Reaktionen in den infizierten Geweben zu einer Zerstörung der Gewebestrukturen führen, gilt mittlerweile als sehr wahrscheinlich (Tarleton, 2003; Tarleton & Zhang, 1999).

So sind in den Geweben von iNOS-defizienten Mäusen kaum Inflammationen zu beobachten, allerdings ist die Anzahl an Parasiten in diesen Mäusen stark erhöht (Arrantes et al., 2004). Allerdings wird die These, dass NO für die Entzündung der Gewebe verantwortlich ist, neuerdings bezweifelt. Zwar steht die anhaltende inflammatorische Reaktion als Ursache der Gewebsdilatationen nicht zur Debatte, doch konnte in einer kürzlich erschienenen Untersuchung eine erhöhte Freisetzung von TNF- α und IFN- γ durch die Milzzellen iNOS-defizienter Mäuse *in vitro* gezeigt werden (Cummings & Tarleton, 2004). Die Autoren fanden weiterhin heraus, dass die iNOS bei der Kontrolle von *T. cruzi* in der akuten Phase nicht von Bedeutung ist, da die iNOS-defizienten Mäuse keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebensrate und Persistenz im Herzen und der Skelettmuskulatur verglichen mit normalen Mäusen aufwiesen. Dies steht im Widerspruch zu den oben erwähnten Untersuchungen und auch zu den in dieser Arbeit erbrachten *in vitro*-Ergebnissen.

NK-Zellen üben offensichtlich einen geringen Einfluss auf die Kontrolle der intrazellulären *T. cruzi* aus. Es ist aber auch denkbar, dass durch die Applikation der anti-Asialo-Antikörper nur die NK-Zellen im Blut depletiert wurden und die Anzahl in den Organen unverändert geblieben ist. Eine Untersuchung der Depletionen durch zwei unterschiedliche Antikörper (anti-Asialo und anti-NK1.1) ließ unterschiedliche Depletionen

erkennen. So gelangte die Gruppe zu der Erkenntnis, dass die verabreichte Menge von anti-Asialo Antikörper entscheidend dafür ist, ob NK-Zellen nur aus dem Blut oder auch in den Organen depletiert wurden (Emoto et al., 2000). Leider kann nicht nicht gesagt werden, in welcher Konzentration die anti-Asialo-Antikörper den Mäusen injiziert wurden, da komerziell ausschließlich polyklonales Serum zu beziehen ist, deren genaue Antikörpermenge unbekannt ist. Die Menge an applizierten Antikörper wurde deshalb mit Literaturangaben abgestimmt und wie gezeigt im FACS die erfolgreiche Depletion kontrolliert. Es kann also nicht mit letzter Gewißheit gesagt werden, ob auch die NK-Zellen in den Organen depletiert wurden.

Letztlich wurde einzig die Anzahl der Parasiten im Blut von einer Depletion der NK-Zellen stark verändert, sodass es bei Anwesenheit von den NK-Zellen zu Interaktionen zwischen den Lymphozyten und extrazellulären Trypanosomen in der Frühphase der Infektion kommt, die eine Minimierung von *T. cruzi* im Blut bewirken. Diese Interaktionen werden im folgenden diskutiert.

4.4 Lyse extrazellulärer T. cruzi

4.4.1 Die Erkennung von Trypomastigoten durch NK-Zellen

Die lichtmikroskopische Betrachtung von Blut infizierter Mäuse ließ von Zeit zu Zeit Lymphozyten erkennen, die direkt mit den Trypomastigoten verbunden waren. Dabei handelte es sich offensichtlich um sehr enge Kontakte, da selbst die heftigen, ruckartigen Bewegungen, die charakteristisch für Trypomastigote sind, diese Verbindungen nicht lösen konnten. Die in dieser Arbeit angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder zeigten sehr enge Kontakte zwischen Lymphozyten und Trypanosomen. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass ausschließlich NK-Zellen in der Lage sind, die Kontakte aufzubauen. Es scheinen somit spezifische Rezeptor-Ligand-Interakionen vorzuliegen, deren Natur noch nicht geklärt werden konnte. In der Einleitung wurden eine Reihe von NK-Zell-Rezeptoren vorgestellt. Der Rezeptor mit dem höchsten bekannten aktivatorischen Potential ist der NKG2D-Rezeptor, einem Lektin-ähnlichen Protein. Allerdings hatte die Blockade dieses Rezeptors keinerlei Auswirkungen auf die Kontaktbildung, da weiterhin eine unverminderte Aktivität nachweisbar war. Dieser Befund ist jedoch lediglich ein kleiner Mosaikstein in einem weitreichendem Ausschlussverfahren, weil bis dato davon ausgegangen werden muß, dass noch längst nicht alle Rezeptoren von NK-Zellen bekannt und charakterisiert worden sind (siehe Einleitung).

Beispielsweise konnten vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine (Siglecs) auf der Oberfläche von NK-Zellen gefunden werden (Crocker et al., 1998). Der Name der Siglecs beinhaltet bereits die Interaktion mit Sialinsäuren, Moleküle, die an Zucker auf der Oberfläche von nahezu allen Zellen gebunden sind. Da es unter normalen Umständen zu einer ständigen Bindung zwischen Siglecexprimierenden Zellen und Sialinsäure-tragenden Zellen kommen würde, sind die Siglecs durch Sialinsäuren auf der Oberfläche der selben Zelle gebunden und damit blockiert. Kommt es zu Infektionen, wird die Bindung der Siglec-blockierenden Sialinsäure aufgehoben und eine Bindung an andere Zellen ermöglicht. Die auslösenden Faktoren für diese Freigabe der Siglecs sind ebenfalls nicht bekannt (Crocker & Varki, 2001). Allerdings könnte die Beladung der Oberfläche von extrazellulären *T. cruzi* mit wirtseigenen Sialinsäuren eine Erkennung der Trypanosomen durch Siglecs auf NK-Zellen ermöglichen. So konnten vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe hochaffine Liganden der Siglecs auf der Oberfläche der Trypanosomen gefunden werden (Thomas Jacobs, persönliche Mitteilung). Die Möglichkeit, dass Siglecs in die Erkennung von *T. cruzi* durch NK-Zellen involviert sind, ist allerdings hypothetischer Natur und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4.2 Aktivierung von NK-Zellen

Die Aktivierung der NK-Zellen erfolgte nicht über die Kontaktaufnahme zu den Trypanosomen. Die Induktion der Aktivität hing in jedem Fall von der Anwesenheit von APZ ab. Schon im ELISpot zeigte sich, dass isolierte NK-Zellen kein IFN- γ freisetzen, nur in Kombination mit APZ kam es zu einer Sekretion von IFN- γ . Gleiches kann bei der lichtmikroskopischen Analyse der NK-Zell-Aktivität gegen *T. cruzi* beobachtet werden, naive NK-Zellen sind nicht in der Lage, die Mobilität der extrazellulären *T. cruzi* zu beeinträchtigen, während aktivierte NK-Zellen es können. Die Notwendigkeit der APZ wird besonders deutlich, wenn IL-12 defiziente Mäuse auf ihre Fähigkeit, Trypomastigote zu bekämpfen, untersucht wurden. Wie gezeigt, übten Milzzellen dieser Mäuse keine Aktivität aus, so dass sich ein klar zu umreissendes Bild der Aktivierung ergibt: Es wurde beschrieben, dass APZ durch *T. cruzi* zur Freisetzung von IL-12 stimuliert werden (Frosch et al., 1996). Dieses IL-12 ist obligat erforderlich, um NK-Zellen zu aktivieren. Gleiches konnte in einer Malaria-Infektion gezeigt werden. Dort kommt es zu kontakt-abhängigen Aktivitäten zwischen infizierten Erythrozyten und NK-Zellen, die allerdings nur in Anwesenheit von IL-12 zustande kam (Artavanis-Tsakonas et al., 2003)

Es wurde ebenfalls schon erwähnt, dass IL-12 nicht nur eine IFN- γ -Antwort in NK-Zellen hervorrufen kann, sondern auch deren Zytotoxizität induziert. Eine Freisetzung von IL-12 erfolgt sehr schnell nach der Infektion. Schon wenige Stunden nach Kontakt mit *T. cruzi* ist eine nachweisbare Menge an IL-12 in einer *in vitro*-Kultur vorhanden (Une et al., 2000). In der Regel liegen schon lange vorher physiologisch wirksame, aber nicht detektierbare Mengen des jeweiligen Zytokins in der Kultur vor, sodass auch in der kurzen Inkubationszeit von vier Stunden sowohl eine Aktivierung als auch eine ausgeprägte Reaktion der NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* erfolgen konnte.

4.4.3 Die Perforin-unabhängige zytotoxische Aktivität

Die Aktivität der NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* verursachte eine Störung der Membranfunktionalität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Test-System etabliert, dass auf einer Fluoreszenz-Markierung lebender Zellen beruht. Die Verwendung des CMFDA erwies sich aufgrund der ausgeprägten Hydrophilizität als sehr vorteilhaft, da somit Wechselwirkungen mit Zellkompartimenten oder der Zellmembran ausgeschlossen wurden. Dadurch konnte der Verlust der Fluoreszenz mit einer Durchlässigkeit der Membran korreliert werden.

NK-Zellen üben nach Aktivierung eine sehr starke Zytotoxizität aus, die hauptsächlich durch Freisetzung lytischer Moleküle in den zytotoxischen Granula verursacht wird. Durch die Vorinkubation der NK-Zellen mit Strontiumchlorid, kann eine vorzeitige Degranulierung ausgelöst werden (Quan et al., 1982; Neighbour et al., 1982). Dadurch wird NK-Zellen die Möglichkeit genommen, direkt auf die Membranfunktionaliät einzuwirken. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Aktivität der NK-Zellen gegen die Trypanosomen von diesen lytischen Granula abhängt. Die Aktivität nahm durch die Strontiumbehandlung drastisch ab.

Perforin ist ein wesentlicher Bestandteil der lytischen Granula. In den Granula liegt es als inaktive Form vor, kommt es zu einer Ausschüttung der Granula, polymerisieren die Perforin-Moleküle zu einem an der Außenseite hydrophoben Hohlzylinder mit einem Durchmesser von rund 16 nm und einer hydrophilen Innenseite (zusammengefaßt in Janeway et al., 2002). Der gebildete Zylinder kann in die Membran eindringen und damit eine Pore bilden, durch die Wasser und Salze schnell in die Zelle eindringen können. Zudem werden mit der Ausschüttung der lytischen Granula auch Granzyme frei, der zweiten wichtigen Komponente der Granula. Die Granzyme gehören wie die Verdauungsenzme Trypsin und Chymotrypsin zu den Serinproteasen. Dringen sie durch die von Perforin gebildeten Poren in die Zelle ein, wird ein induzierter Zelltod (Apoptose) ausgelöst (Shinbori et al., 2004).

Es liegt deshalb nah, die Beteiligung von Perforin an der zytotoxischen Aktivität gegen *T. cruzi* zu untersuchen. In der Literatur wurde allerdings eine Resistenz von Trypomastigoten gegenüber Perforin beschriebenen. In den durchgeführten Experimenten wurde rekombinantes Perforin zu extrazellulären *T. cruzi* gegeben (Nickell & Sharma, 2000; Cunha Bisaggio et al., 1997). Dadurch wurden jedoch bei weitem nicht die Konzentrationen erreicht, die lokal in dem synaptischen Spalt zwischen NK-Zelle und gebundenem Trypanosom vorherrschen, wodurch die Wirksamkeit des Perforins stark beeinträchtigt wird. Die Erkenntnisse dieser Untersuchung lassen deshalb keine sicheren Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Lyse mittels Perforin zu.

In dieser Arbeit wurden deshalb Milzzellen von Perforin-defizienten Mäuse mit CMFDAmarkierten *T. cruzi* inkubiert. Diese Milzzellen zeigten eine vergleichbare Aktivität wie normale C57BL/6-Mäuse. In der Tat konnte überhaupt kein Unterschied in der Aktivität beobachtet werden, sodass eine Beteiligung von Perforin an der Lyse von extrazellulären *T. cruzi* ausgeschlossen werden kann.

Eine Lyse der Parasiten durch zytotoxische Moleküle ist dennoch nicht ausgeschlossen. Vor kurzem konnte beschrieben werden, dass extrazelluläre T. cruzi durch NK-Lysin getötet werden können (Jacobs et al., 2003). NK-Lysin ist ein Polypeptid aus 78 Aminosäuren bestehend und gehört zur Familie der Saposine. Die Struktur wird durch fünf α-Helices mit sechs stark konservierten Cysteinen bestimmt. Die Cysteine arrangieren über Disulfid-Brücken vier Helices zu einem Rückgrat, das die Helix-3 exponiert hervortreten läßt, die eine entscheidende Rolle bei der Ausübung der Funktion von NK-Lysin übernimmt. NK-Lysin bildet keine Poren in der Membran, sondern fügt sich in die äußere Membranschicht ein, was zu einer Destabilisierung der Membran führt (Ernst et al., 2000; Miteva et al., 1999). NK-Lysin wurde als erstes in Schweinen beschrieben und besitzt große Homologien, vor allem die konservierten Cysteine betreffend, mit den porenbildenden Amöbaporen von Entamoeba histolytica, sowie den im Menschen beschriebenen Granulysinen, die ebenfalls keine Poren bilden (Clayberger & Krensky, 2003). Die Aktivität des NK-Lysins oder einem murinen Homologon ist aber reine Spekulation, weil ein entsprechendes Homolog in der Maus nicht gefunden werden konnte. Bisher wurde versucht, mit NK-Lysin-spezifischen Antikörpern und einem mRNA-Nachweis das Auftreten von einem solchen Molekül in der Maus nachzuweisen; ohne Erfolg. Die Tatsache jedoch, dass homologe, verwandte zytotoxische Moleküle in Amöben, Schweinen und sogar im Menschen vorhanden sind, läßt die Existenz eines äquivalenten Moleküls in der Maus vermuten.

5. Zusammenfassung

Trypanosoma cruzi, der Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit, ist ein einzelliger Parasit. Zu seiner Verbreitung nutzt er blutsaugende Raubwanzen, die *T. cruzi* durch ihre Fäzes auf den Menschen übertragen. Im Säugetierwirt befallen die Parasiten nahezu alle Organe, besonders ausgeprägte Schäden entstehen jedoch im Herzen und dem Gastro-Intestinal-Trakt. Die Vermehrung von *T. cruzi* im Säuger findet ausschließlich intrazellulär statt, während die Verbreitung im Körper durch extrazelluläre Trypomastigote über den Blutstrom erfolgt. Durch das geteilte Auftreten im Organismus wird sowohl eine zellvermittelte als auch eine humorale Immunantwort zur erfolgreichen Abwehr der Trypanosomen benötigt.

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind Bestandteil der angeborenen Immunität und werden sehr schnell nach einer Infektion von *T. cruzi* aktiviert. Die Aktivierung erfolgt vorrangig über die Freisetzung von Interleukin (IL)-12, das von infizierten Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird. Aktivierte NK-Zellen reagieren in unterschiedlicher Weise auf Infektionen durch verschiedene Pathogene. Zum einen können sie durch eine Freisetzung von Interferon (IFN)- γ in Makrophagen und andere Zellen antimikrobielle Prozesse induzieren und zum anderen üben sie eine direkte Zytotoxizität gegen die infizierten Zellen aus. Vor allem aber werden körperfremde Zellen von NK-Zellen erkannt und zerstört. So konnten direkte Interaktionen mit verschiedenen Parasiten beschrieben werden. In einer *T. cruzi*-Infektion führen diese Interaktionen zu einer Immobilität der Parasiten.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aktivität von NK-Zellen gegen extrazelluläre *T. cruzi* kontaktabhängig zu einer Lyse der Trypanosomen führt. Diese Lyse wird durch eine Ausschüttung von zytotoxischen Granula verursacht, ist allerdings unabhängig von Perforin. Welche Moleküle für die Lyse von *T. cruzi* verantwortlich sind, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Überraschenderweise ist die Erkennung der extrazellulären *T. cruzi* durch NK-Zellen nicht gleichzeitig mit deren Aktivierung verknüpft. Im Gegenteil scheinen nur aktivierte NK-Zellen in der Lage zu sein, entweder die Parasiten zu erkennen oder nach erfolgter Erkennung, die Lyse der Trypanosomen einzuleiten. Diese Aktivierung ist IL-12-abhängig, das nicht nur eine Zytokin-Freisetzung in NK-Zellen induziert, sondern auch die Zytotoxizität steigern kann.

Die Bedeutung der direkten Lyse von extrazellulären *T. cruzi* durch NK-Zellen konnte durch eine Depletion der NK-Zellen *in vivo* bestätigt werden. So nimmt die Anzahl der Trypanosomen im Blut NK-Zell-defizienter Mäuse drastisch zu, was zu einer verstärkten Suszeptibilität führt. Dagegen wird die Parasitenlast in unterschiedlichen Organe von der NK-Zell-Depletion nicht beeinflußt, sodass sich die Aktivität von NK-Zellen auf die Kontrolle der extrazellulären Trypanosomen im Blut konzentriert.

Dennoch findet eine Induktion von Prozessen zur Abwehr von intrazellulären *T. cruzi* in infizierten Zellen durch NK-Zellen statt. Die frühzeitige Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen aktiviert nicht nur Makrophagen, sondern auch Fibroblasten, die im Unterhautgewebe zahlreich vorkommen und in erheblichem Maß von *T. cruzi* infiziert werden. Die Infektion

mit *T. cruzi* löst in den Fibroblasten nur eine sehr schwache Aktivierung von antimikrobiellen Prozessen aus. Vor allem konnte keine Freisetzung von IL-12 durch die infizierten Fibroblasten nachgewiesen werden. Trotzdem induziert die Inkubation der Fibroblasten mit NK-Zellen eine Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS), wodurch die Parasitenlast in diesen Zellen drastisch abnimmt. Interessanterweise sind die infizierten Fibroblasten in der Lage die NK-Zellen zu aktivieren. Vermutlich erfolgt diese Aktivierung über Typ-I-Interferone, deren Induktion in Fibroblasten nach Infektion mit *T. cruzi* im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Die Aktivität gegen die intrazellulären *T. cruzi* hängt jedoch auch in den Fibroblasten stark von der Produktion des NO ab. Wurde diese Synthese blockiert, blieb die Anzahl an Parasiten in den Zellen nahezu unverändert. Die Blockade von IFN- γ dagegen führte zwar zu einer erheblichen Einschränkung der Aktivität gegen *T. cruzi*, hob sie aber nicht auf, was auf IFN- γ -unabhängige Prozesse hindeutet. Eine Beteiligung von Typ-I-Interferonen ist auch in diesem Fall denkbar, da auch in den mit Fibroblasten co-kultivierten Milzzellen eine Induktion dieser Zytokine nachgewiesen werden konnte. Typ-I-Interferone besitzen sowohl aktivierendes Potential auf Lymphozyten als auch auf Makrophagen und dendritische Zellen. Auch Fibroblasten besitzen die Fähigkeit auf Typ-I-Interferone zu reagieren, wodurch weitere Hinweise der Beteiligungen von Fibroblasten an der Abwehr von intrazellulären Pathogenen vorliegen.

6. LITERATUR

- Alberati-Giani D, Malherbe P, Ricciardi-Castagnoli P, Köhler C, Denis-Donini S & Cesura AM. 1997. Differential Regulation of indolamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-γ-activated murine macrophages and microglial cells. J. Immunol. 159: 419-426.
- Albright JW, Hatcher FM & Albright JF. 1984. Interaction between murine natural killer cells and trypanosomes of different species. <u>Inf. Immun. 44: 315-319.</u>
- Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ & Silva JS. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. <u>Inf. Immun. 64</u>: 1961-1967.
- Almeida ML de & Heise N. 1993. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. <u>Biol. Res. **26**</u>: 285-312.
- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL & Griffiths G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement C9: Evidence for membrane pore-forming activity al low pH. <u>Cell 61: 1277-1287.</u>
- Andrews NW & Webster P. 1991. Phagosomal escape by intracellular pathogens. <u>Parasitol.</u> <u>Today 7: 335-339.</u>
- Antunez MI & Cardoni RL. 2000. IL-12 and IFN-γ production, and NK cells activity, in acute and chronic exoerimental *Trypanosoma cruzi* infections. <u>Immunol. Letters 71: 103-109.</u>
- Antunez MI & Cardoni RL. 2001. Early IFN-γ production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. <u>Immunol. Letters 79: 189-196.</u>
- Arantes RME, Marche HHF, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA & Silva JS. 2004. Interferon-γ induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*infected mice. <u>Am. J. Pathol. 164</u>: 1361-1368.
- Argibay PF, di Noia JM, Hildalgo A, Mocetti E, Barbich M, Lorenti AS, Bustos D, Tambutti M, hyon SH, Frasch ACC & Sánchez DO. 2002. *Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. <u>Glycobiology 12: 25-32.</u>

- Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM & Riley EM. 2003. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J. Immunol. 171: 5396-5405.
- Ascenzi P, Salvati L & Brunori M. 2001. Does myoglobin protect *Trypanosoma cruzi* from the antiparasitic effects of nitric oxide? <u>FEBS Letters **501**</u>: 103-105.
- Babich FR, Jacobson AL & Bubash S. 1965. Cross-species transfer of learning: effect of ribonucleic acid from hamsters on rat behavior. <u>Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54: 1299-1302.</u>
- Backström E, Chambers BJ, Kristensson K & Ljunggren HG. 2000. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons *in vitro*. J. Immunol. **165**: 4895-4900.
- Backström E, Chambers BJ, Ho EL, Naidenko OV, Mariotti R, Fremont DH, Yokoyama WM, Kristensson K & Ljunggren HG. 2003. Natural killer cell-mediated lysis of dorsal root ganglia neurons via RAE1/NKG2D interactions. <u>Eur. J. Immunol. 33: 92-100.</u>
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier L & Spies T. 1999. Activation of NKcells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. <u>Science 285</u>: 727-729.
- Bisaggio R da C, de Castro SL, Barbosa HS, de Almeida Brandao C & Persechini PM. 1997. *Trypanosoma cruzi*: Resistance to the proe forming protein of cytotoxic lymphocytesperforin. <u>Exp. Parasitol. 86</u>: 144-154.
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E & Dubs RW. 2004. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. <u>Eur. J. Haematol. 72: 203-212.</u>
- Bogdan C. 2000. The function of Type I interferons in antimicrobial immunity. <u>Cur. Opin.</u> <u>Immunol. 12: 419-424.</u>
- Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A & Rittig MG. 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. J. Exp. Med. **191**: 2121-2129.
- Brombacher F, Dorfmüller A, Magram J, Dai WJ, Kohler G, Wunderlin A, Palmer-Lehmann K, Gately MK & Alber G. 1999. IL-12 is dispensable for innate and adaptive immunity against low doses of *Listeria monocytogenes*. Int. Immunol. 11: 325-332.

- Brown MG, Driscoll J & Monaco JJ. 1991. Structural and serological similarity of MHClinked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. <u>Nature **353**: 355-357.</u>
- Bustin SA. 2000. Absolut quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinology **25**: 169-193.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira MES, Ferguson MAJ, Travassos LR & Gazzinelli RT. 1997. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. J. Immunol. **158**: 5890-5901.
- Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith Ja, Golenbock DT & Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J. Immunol. 167: 416-423.
- Cardillo F, Falcao RP, Rossi MA & Mengel J. 1993. An age-related γδ T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental Trypanosoma cruzi infection. <u>Eur. J. Immunol. 23</u>: 2597-2605.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG & Silva JS. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. <u>Inf.</u> <u>Immun. 64: 128-134.</u>
- Cardillo F, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Russo M, Garcia SB & Mengel J. 2002. NK1.1⁺ cells and T-cell activationin euthymic and thymectomized C57BL/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. <u>Scand. J. Immunol. 55: 96-104.</u>
- Cerwenka A & Lewis L. 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. <u>Immunological reviews 181: 158-169.</u>
- Chagas C. 1909. Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. <u>Mem. Inst. Oswaldo Cruz</u> <u>1: 159-218.</u>
- Chomczynski P & Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. <u>Anal. Biochem. 162</u>: 156-159.
- Clark RK & Kuhn RE. 1999. *Trypanosoma cruzi* does not induce apoptosis in murine fibroblasts. <u>Parasitology</u> **118**: 167-175.

Clayberger C & Krensky AM. 2003. Granulysin. Curr. Opin. Immunol. 15: 560-565.

- Cooper MA, Fehninger TA & Caligiuri MA. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. <u>Trends Immunol. 22: 633-640.</u>
- Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, I Douarin N, Powell L, Roder J, Schnaar RL, Sgroi DC, Stamenkovic K, Schauer R, Schachner M, van den Berg TH, van der Merwe PA, Watt SM & Varki A. 1998. Siglecs : a family of sialic-acid binding lectins. <u>Glycobiology 8: v.</u>
- Crocker PR & Varki A. 2001. Siglecs in the immune system. Immunology 103: 137-145.
- Cummings KL & Tarleton RL. 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Inf. Immun. 72: 4081-4089.
- Däubener W, Posdziech V, Hadding U & MacKenzie CR. 1999. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. <u>Med. Microbiol. Immunol. 187</u>: 143-147.
- Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R & Gately MK. 1992. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. J. Immunol. 148: 3125-3132.
- Dos Santos PVA, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT & Lannes-Vieira J. 2001. Prevalence of CD8⁺ αβ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN-γinducible adhesion and chemoattractant molecules. <u>Microb. Inf. **3**</u>: 971-984.
- Ely KH, Kasper LH & Khan IA. 1999. Augmentation of the CD8+ T cell response by IFNgamma in IL-12-deficient mice during Toxoplasma gondii infection. J. Immunol. 165: 5449-3454.
- Emoto M, Miyamoto M, Namba K, Schmits R, Rooijen N van, Kita EK & Kaufmann SH. 2000. Participation of leukocyte function-associated antigen-1 and NK cells in the homing of thymic CD8⁺ NKT cells to the liver. <u>Eur. J. Immunol. **30**</u>: 3049-3056.
- Emoto M & Kaufmann SH. 2003. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. <u>Trends</u> <u>Immunol. 24: 364-369.</u>

- Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, Krensky AM, Leippe M, Bloom BR, Ganz T & Modlin RL. 2000. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. J. Immunol. 165: 7102-7108.
- Falk K, Rötzschke O & Rammensee HG. 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. <u>Nature **348**: 248-251.</u>
- Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martinez C, Gonzales D, Coleman P & Davies C. 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for andean region and beyond. Trends Parasitol. 19: 44-49.
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM & Münz C. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized by the NKp30 receptor by activated NK cells. J. Exp. Med. 195: 343-351.
- Frosch S, Krauss S & Fleischer B. 1996. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. <u>Med. Micobiol. Immunol. **185**: 189-193.</u>
- Geldhof AB, Van Ginderachter JA, Liu YQ, Noel W, Raes G & de Baetselier P. 2002. Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. <u>Blood 100</u>: 4049-4058.
- Gerlings-Petersen BT & Pondman KW. 1965. The relationship between complement, the heterogeneity of antibody and phagocytosis. <u>Bibl. Haematol. 23</u>: 829-833.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G & Trinchieri G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. <u>J.</u> <u>Exp. Med. 195: 327-333.</u>
- Golden JM & Tarleton RL. 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. <u>Exp. Parasitol. **72**: 391-402.</u>
- Gowans JL. 1966. Life-span, recirculation, and transformation of lymphocytes. <u>Int. Rev. Exp.</u> <u>Pathol. 5: 1-24.</u>
- Gräfe SEB, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C & Fleischer B. 2003. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice. <u>Microbes Inf. 5: 833-839.</u>
- Griess P. 1864. Ueber eine neue Klasse organischer Verbindungen, in denen Wasserstoff durch Stickstoff vertreten ist. Vierte Abhandlung. <u>Ann. Chem. Pharm. 137: 39-91.</u>
- Grisotto MG, D'Imperio-Lima MR, Marinho CRF, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA & Alvarez JM. Most parasite-specific CD8⁺ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T cell receptor- $\alpha\beta$ and CD8 molecules. <u>Immunol. 102</u>: <u>209-217</u>.
- Hatcher FM & Kuhn RE. 1982. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. Science **218**: 295-296.
- Herberman RB, Nunn ME, Larvin DH & Asofsky R. 1973. Effect of antibody to antigen on cell-mediated immunity induced in syngeneic mice by murine sarcoma virus. <u>J. Nat.</u> <u>Cancer Inst. 51: 1509-1512.</u>
- Herberman RB, Nunn ME & Larvin DH. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic and allogenic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer 16: 216-229.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA & 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 synthetase. Inf. Immun. 66: 1208-1215.
- Hölscher C, Atkinson RA, Arendse B, Brown N, Myburgh E, Alber G & Brombacher F. 2001. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. <u>J.</u> <u>Immunol. 167</u>: 6957-6966.
- Inaba KJP, Metlay MT, Crowley MT & Steinman RM. 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. <u>J.</u> <u>Exp. Med. 172: 631-640.</u>
- Jacobs T, Bruhn H, Gaworski I, Fleischer B & Leippe M. 2003. NK-Lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*. <u>Antimicrob. Agents</u> <u>Chemother. 47: 607-613.</u>
- Janeway CA, Travers P, Walport M & Shlomchik. 2002. <u>Immunologie. Heidelberg, Spektrum</u> <u>Akademischer Verlag GmbH.</u>
- Kamat R & Henney CS. 1975. Studies on T cell clonal expansion. I. Suppression of killer T cell production in vivo. J. Immunol. 115: 1592-1598.

- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G & Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. <u>Nature **319**: 675-678.</u>
- Kärre K. 2002. NK cells, MHC I molecules and the missing self. <u>Scand. J. Immunol. 55: 221-228.</u>
- Kierszenbaum F. 1999. Chagas disease and autoimmunity hypothesis. <u>Clin. Microbiol. Rev.</u> <u>12</u>: 210-223.
- Kiessling R, Klein E & Wigzell H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. <u>Eur. J. Immunol.</u> <u>5: 112-121.</u>
- Kleffmann T, Schmidt J & Schaub GA. 1998. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. J. Euk. Microbiol. **45**: 548-555.
- Kuhn RE & Murnane JE. 1977. *Trypanosoma cruzi*: Immune destruction of parasitized mouse fibroblasts *in vitro*. <u>Exp. Parasitol. **41**</u>: 66-73.
- Kumar S & Tarleton RL. 2001. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J. Immunol. **166**: 4596-4603.
- Lages-Silva E, Ramirez LE, Krettli AU & Brener Z. 1987. Effect of protective and nonprotective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. <u>Parasite Immunol. 9: 21-30.</u>
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. <u>Nature 227: 680-685.</u>
- Lehane MJ. 1991. Managing the blood meal. <u>Chapter 6, S. 79-110; in: Biology of blood-</u> sucking insects (Ed Lehane MJ), Harper Collins, London.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V & Andrews NW. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. **168**: 649-659.
- Lima-Martins MVC, Sanchez GA, Krettli AU & Brener Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol. 7: 367-376

- Ljunggren HG & Kärre K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2 deficient lymphoma, variants analysis of the mechanism. J. Exp. Med. **162**: 1745-1753.
- Lotzova E, Savary CA & Champlin RE. 1993. Genesis of human oncolytic Natural Killer cells from primitiv CD34⁺/CD33⁻ bone marrow progenitors. J. Immunol. 150: 5263-5269.
- Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Luliano L, Schumacher RI, Colli W & Alves MJ. 2001. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. J. Biol. Chem. 276: 19382-19389.
- Maddrell SH. 1964. Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stal. II. The normal course of diuresis and the effect of temperature. J. Exp. Biol. **41**: 163-176.
- Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, Gately MK, Louis JA & Alber G. 1996. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. <u>Eur. J.</u> <u>Immunol. 26: 1553-1559.</u>
- Mattner J, Wandersee-Steinhäuser A, Pahl A, Röllinghoff M, Majeau GR, Hochmann PS & Bogdan C. 2004. Protection against progressive Leishmaniasis by IFN-β. J. Immunol. <u>172</u>: 7574-7582.
- Mehlhorn H & Pikarski G. 1995 Grundriß der Parasitenkunde. <u>4. Auflage. Gustav Fischer</u> Verlag.
- Meuwissen HJ, Kaplan GT, Perey DY & Good RA. 1969. Role of rabbit gut-associated lymphoid tissue in cell replication. The follicular cortex as primary germinative site. <u>Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 300-304.</u>
- Meyer zum Büschenfelde C, Cramer S, Trumpfheller C, Fleischer B & Frosch S. 1997. *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-γ) production. <u>Clin. Exp. Immunol. 110: 378-385.</u>
- Michailowsky V. Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes Vieira LQ & Gazzinelli RT. 2001. Pivotal role of interleukin-12 and Interferon-γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. <u>Am. J. Pathol. **159**: 1723-1733</u>.

- Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M & Coutinho A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. <u>Scand. J.</u> <u>Immunol. 24: 661-668.</u>
- Miteva M, Andersson M, Karshikoff A & Otting G. 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. FEBS Letters **462**: 155-158.
- Montagna G, Cremona ML, Paris G, Amaya MF, Buschiazzo A, Alzari PM & Frasch ACC. 2002. The trans-sialidase from african trypanosome *Trypanosoma brucei*. <u>Eur. J.</u> <u>Biochem. 269</u>: 2941-2950.
- Mrozek E, Anderson P & Caligiuri MA. 1996. Role of Interleukin-15 in the development of human CD56⁺ Natural Killer cells from CD34⁺ hematopoetic progenitor cells. <u>Blood</u> <u>87: 2632-2640.</u>
- Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, di Santo JP, Brombacher F & Hölscher C. 2001. IL-12-independent IFN-γ production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. J. Immunol. **167**: 3346-3353.
- Myrvik QN, Racz P & Racz KT. 1979. Ultrastructural studies on bronchial-associated lymphoid tissue (BALT) and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. Adv. Exp. Med. Biol. **121B**: 145-153.
- Nabors GS & Tarleton RT. 1991. Differential control of IFN-γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. **146**: 3591-3598.
- Neighbour PA, Huberman HS & Kress Y. 1982. Human large granular lymphocytes and natural killing: ultrastructural studies of strontium-induced degranulation. <u>Eur. J.</u> <u>Immunol. 12: 588-595.</u>
- Nickell SP & Sharma D. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. <u>Exp. Parasitol. 94: 207-216.</u>
- Nossal GJ, Austin CM & Ada GL. 1965. Antigens in immunity. VII. Analysis of immunological memory. Immunology 9: 333-348.
- Nylen S, Maasho K, Söderström K, Ilg T & Akuffo H. 2003. Live Leishmania promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. <u>Clin. Exp. Immunol. 131: 457-467.</u>

- Ortaldo JR & Young HA. 2003. Expression of INF-γ upon triggering of activating Ly49D NK receptors in vitro and *in vivo*: Costimulation with IL-12 or IL-18 overrides inhibitory receptors. J. Immunol. **170**: 1763-1769.
- Ouellette AJ. 1999. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. <u>Am. J. Physiol. 277: 257-61.</u>
- Petranyi GG, Banczur M, Onody C & Holland SR. 1974. HL-A 3,7 and lymphocyte cytotoxic activity. Lancet April 20: 736.
- Piccioli D, Sbrana S, Melandri E & Valiante NM. 2002. Contact-dependent stimulation of dendritic cells by natural killer cells. J. Exp. Med. 195: 335-341.
- Pierce NF. 1980. Suppression of the intestinal immune response to cholera toxin by specific serum antibody. Inf. Immun. **30**: 62-68.
- Pierce NF & Koster FT. 1980. Priming and suppression of the intestinal immune response to cholera toxoid/toxin by parenteral toxoid in rats. J. Immunol. **124**: 307-311.
- Podolsky DK. 1999. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defence. <u>Am. J. Physiol. **277**: 495-499.</u>
- Quan PC, Ishizaka T & Bloom BR. 1982. Studies on the mechanism of NK cell lysis. J. Immunol. 128: 1786-1791.
- Quintans J & Lefkovits I. 1974. Clonal expansion of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes. J. Immunol. **113**: 1373-1376.
- Racz P, Tenner-Racz K, Myrvik QN & Fainter LK. 1977. Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoephitelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. J. Reticuloendothel Soc. 22: 59-83.
- Radoux D, Kinet-Denoel C, Heinen E, Moeremans M, de Mey J & Simar LJ. 1985. Retention of immune complexes by Fc receptors on mouse follicular dendritic cells. <u>Scand. J.</u> <u>Immunol. 21: 345-353.</u>
- Rajagopalan S, Fu, J & Long EO. 2001. Cutting Edge: Induction of IFN-γ production but nor cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. J. Immunol. 167: 1877-1881.

- Ramos C, Schädtler-Siwon I & Ortiz-Ortiz L. 1979. Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J. Immunol. **122**: 1243-1247.
- Reed SG. 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation and prevents acute disease, immune supression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. J. Immunol. **140**: 4342-4347.
- Reis e Sousa C, Stahl PD & Austyn JM. 1993. Phagocytosis of antigens by langerhans cells in vitro. J. Exp. Med. **178**: 509-519.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG & McCurley TL. 1993. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in the hearts of patients with chronic Chagas' disease. <u>Am. J.</u> <u>Trop. Med. Hyg. 49: 192-200.</u>
- Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A & Andrews NW. 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. J. Cell <u>Biol. 134</u>: 349-362.
- Rottenberg ME, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL & Örn A. 1988. Role of T helper/inducer cells as well as Natural Killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. <u>Scand. J. Immunol. 28</u>: 573-582.
- Rottenberg ME, Castanos-Velez E, de Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P & Örn A. 1996. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. <u>Eur. J. Immunol. 26:</u> 3203-3213.
- Rötzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G & Rammensee HG. (1990a). Isolation and analysis of natural processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. <u>Nature 348: 252-254.</u>
- Rötzschke O, Falk K, Wallny HJ, Faath S & Rammensee HG. (1990b). Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. <u>Science</u> <u>249</u>: 283-287.
- Routes JM, Ryan JC, Ryan S & Nakamura M. 2001. MHC class I molecules on adenovirus E1A-expressing tumor cells inhibit NK cell killing but not NK cell-mediated tumor rejection. <u>Int. Immunol. 13</u>: 1301-1307.

- Säftel M, Fleischer B & Hörauf A. 2001. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. Inf. Immun. 69: 2252-2259.
- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr. & Erlich HA. 1988. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. <u>N. Engl. J.</u> Med. **319**: 537-541.
- Salazar-Mather TP, Lewis CA & Biron CA. 2002. Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1α delivery to the liver. J. Clin. Invest. 110: 321-330.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C & Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macormolecules in the major histocompatibility complex class II compartement: downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182: 389-400.
- Sato NN, Yamashiro-Kanashiro EH, Tanji MM, Kaneno R, Higuchi ML & Duarte AJS. 1992. CD8⁺ cells and natural cytotoxic acitvity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Inf. Immun. 60: 1024-1030.
- Schaub GA & Lösch P. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol. **65**: 174-186.
- Schenkmann S. 1999. Structure and function of *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase and sialic acid receptors. <u>Aus "Sialobiology and other novel forms of glycosylation." (eds. Inoue Y, Lee YC & Troy FA). Gakushin Publishing Co., Osaka, Japan.</u>

Schmitt FO. 1965. The physical basis of life and learning. Science 149: 931-936.

- Schönhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK & Gubler U. 1992. Cloning and expression of murine IL-12. <u>J. Immunol.</u> <u>148:</u> 3433-3440.
- Schuster JP & Schaub GA. 2000. *Trypanosoma cruzi*: skin penetration kinetics of vectorderived metacyclic trypomastigotes. Int. J. Parasitol. **30**: 1475-1479.

- Scott MT & Moyes L. 1982. ⁷⁵Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonizationby chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. <u>Clin. Exp. Immunol. 48</u>: 754-757.
- Shaw SG, Maung AA, Steptoe RJ, Thomson AW & Vujanovic NL. 1998. Expension of functional NK cells in multiple tissue compartments of mice treated with Flt3-ligand: Implications for anti-cancer and anti-viral therapy. J. Immunol. 161: 2817-2824.
- Shinbori T, Walczak H & Krammer PH. 2004. Activated T killer cells induce apoptosis in lung epithelial cells and the release of pro-inflammatory cytokine TNF-α. <u>Eur. J.</u> <u>Immunol. 34: 1762-1770.</u>
- Silva JS, Aliberti JCS, Martins GA, Souza MA, Souto JT & Padua MA. 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. <u>Braz. J. Med. Biol. Res. **31**: 111-115.</u>
- Singer DS & Maguire JE. 1990. Regulation of the expression of class I MHC genes. <u>Crit.</u> <u>Rev. Immunol. 10: 235-257.</u>
- Spellberg B & Edwards JE Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. <u>Clin.</u> <u>Infect. Dis. **32**: 76-102.</u>
- Stryker GA & Nickell SP. 1995. Trypanosoma cruzi: Exposure of murine cells to live parasites in vitro leads to enhanced surface class I MHC expression which is type I interferon-dependent. <u>Exp. Parasitol. 81: 564-573.</u>
- Tanaka K & Ichihara A. 1988. Involvement of proteasomes (multicatalytic proteinase) in ATP-dependent proteolysis in rat reticulocyte extracts. <u>FEBS Letters 236</u>: 159-162.
- Tanaka K, Yoshimura T, Kumatori A, Ichihara A, Ikai A, Nishigai M, Kameyama K & Takagi T. 1988. Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. J. Biol. Chem. 263: 16209-16217.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM & Wittner M. 1992. Chagas Disease. <u>Clin. Microbiol. Rev. 5: 400-419.</u>
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Henser LE & Andrews NW. 1992. Lysosom recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mamalian cells. <u>Cell 71</u>: 1117-1130.

- Tarleton RL. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccineinduced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 144: 717-724.
- Tarleton RL. 2001. Parasite persistence in aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 31: 550-554.
- Tarleton RL. 2003. Chagas disease: a role for autoimmunity? Trends Parasitol. 19: 447-451.
- Tarleton RL & Zhang L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? Parasitol. Today 15: 94-99.
- Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U & Nussenzweig V. 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. <u>Parasitology 110: 547-554.</u>
- 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. <u>Blood 84</u>: 4008-4027.
- Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA & Örn A. 2000. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell derived interferongamma (IFN-γ) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. <u>Clin. Exp. Immunol. 121</u>: 499-505.
- Une C, Andersson J & Örn A. 2003. Role of IFN-α/β and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. <u>Clin. Exp. Immunol. 134</u>: 195-201.
- Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothroyd JC & Burleigh BA. 2002. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. J. Biol. Chem. 277: 639-644.
- Westfall BB. 1961. Characterization of cells in tissue culture. <u>Nat. Cancer Inst. Monograph</u> <u>No. 7:147-158.</u>
- WHO (World Health Organization, 2004) Homepage: http://www.who.int.
- Zinkernagel R. 1979. Review: cellular immune responses to intracellular parasites: role of the major histocompatibility gene complex and thymus in determining immune responsivness and susceptibility to disease. <u>Parasite Immunol. 1: 91-109.</u>

Zinkernagel RM & Doherty PC. 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol. 2: 1047-1054.