

**Einfluss von *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)-infizierten
Antigen-präsentierenden Zellen auf die Stimulation
von T-Zellen im murinen System**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Beate Schmitter
aus Köln

beim Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg

Hamburg, Mai 2003

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: 09. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die angeborene Immunität	1
1.1.2 Die adaptive Immunität	2
1.1.3 Molekulare Grundlagen der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten	3
1.2 Das Protozoon <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.2.1 Entwicklungszyklus von <i>T. cruzi</i>	8
1.2.2 Epidemiologie	10
1.2.3 Krankheitsbild	11
1.2.4 Diagnostik	13
1.2.5 Therapie	13
1.2.6 Bekämpfung und Prophylaxe	14
1.2.7 Immunologie der <i>T. cruzi</i> -Infektion	15
1.2.8 Parasiten-spezifische Immunität <i>versus</i> Autoimmunität	17
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
 2 Material & Methoden	 20
2.1 Material	20
2.1.1 Lebende Organismen und Zell-Linien	20
2.1.2 Peptide	21
2.1.3 Antiseren und Antikörper	22
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	25
2.1.6 Geräte und Hilfsmittel	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellpräparation und Zellkultur	28
2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	28
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.2.1.3 Zellzählung	29
2.2.1.4 Präparation von Milzzellen	30
2.2.1.5 Präparation von peritonealen Exsudat-Zellen (PEC)	30
2.2.1.6 Generierung von Knochenmarks-Makrophagen	30

2.2.1.7 Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (bmDC)	31
2.2.1.8 Präparation von T-Zellen über Nylonwolle.....	31
2.2.1.9 Negative Selektion von CD4 - und CD8 -Lymphozyten.....	32
2.2.1.10 Positive Selektion von CD90 -Lymphozyten	33
2.2.1.11 Depletion von CD11b-positiven Zellen.....	33
2.2.1.12 Bestimmung der Zellproliferation (Proliferationstest)	33
2.2.2 Arbeiten mit <i>T. cruzi</i>	34
2.2.2.1 Kultivierung von <i>T. cruzi</i> in Gewebe (<i>in vitro</i> -Kultivierung)	34
2.2.2.2 Kultivierung von <i>T. cruzi</i> in Mäusen (<i>in vivo</i> -Kultivierung zur Stammerhaltung)	35
2.2.2.3 Bestimmung der Parasitämie im Blut bei <i>T. cruzi</i> -Infektion.....	35
2.2.2.4 Infektion von Mäusen mit <i>T. cruzi</i> (<i>in vivo</i> -Infektion).....	36
2.2.2.5 <i>In vitro</i> -Infektion von Zellen mit <i>T. cruzi</i>	36
2.2.3 <i>In vitro</i> -Stimulation von Immunzellen	37
2.2.3.1 T-Zell-Assay	37
2.2.3.2 Stimulation des T-Zell-Assays mit anti-CD3	38
2.2.3.3 T-Zell-Assay in Gegenwart blockierender Agenzien.....	38
2.2.3.4 Blockade des Kontaktes infizierter APC mit T-Zellen durch Gewebekultur-Einsätze (Transwell-Experimente)	39
2.2.3.5 Restimulation von T-Zellen nach Stimulation durch infizierte bzw. nicht-infizierte APC (Transfer-Experimente)	39
2.2.3.6 Sialidase-Behandlung von T-Zellen	40
2.2.3.7 Fixierung von APC mit Paraformaldehyd	40
2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen.....	41
2.2.4.1 Cytospin (Immunfärbung von Cytozentrifugationen)	41
2.2.4.2 Immunfärbung adhärent wachsender Zellen	42
2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS).....	42
2.2.6 Enzym-gekoppelter Immunsorbent-Assay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , ELISA).....	43
2.2.7 Stickstoffmonoxid (NO)-Bestimmung nach Griess	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Etablierung eines Systems zur Stimulation von T-Zellen durch <i>T. cruzi</i> -infizierte APC	46
3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse <i>T. cruzi</i> -infizierter Zellen.....	48

3.1.2 Charakterisierung Antigen-präsentierender und kostimulatorischer Oberflächenmoleküle auf infizierten APC	49
3.1.3 Einfluss einer <i>T. cruzi</i> -Infektion der APC auf die Aktivierung von T-Zellen	52
3.1.4 Einfluss der Antigen-Konzentration auf die Stimulation naiver T-Zellen durch infizierte APC	54
3.1.5 Einfluss <i>in vitro</i> -infizierter APC auf die Stimulation naiver T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen	55
3.1.6 Einfluss der Dauer der <i>in vitro</i> -Infektion von APC auf die Stimulation naiver T-Zellen	58
3.1.7 Einfluss von APC aus <i>in vivo</i> -infizierten Mäusen auf die Stimulation naiver T-Zellen	59
3.1.8 Stimulation von Milzzellen aus infizierten DO11.10-TCR-transgenen Mäusen	61
3.1.9 Kinetik der <i>in vivo</i> -Infektion von DO11.10-TCR-transgenen Mäusen	63
3.2 Bedeutung löslicher Faktoren für den Einfluss der Infektion auf die Stimulation naiver T-Zellen	64
3.2.1 Blockade von IFN- γ , NO, IL-12 und TGF- β	64
3.2.2 Untersuchung der Wirkung von infizierten PEC aus IL-12-defizienten Mäusen auf die Stimulation naiver T-Zellen	66
3.2.3 Analyse anti-inflammatorischer Zytokine in infizierten Zellkulturen	67
3.2.4 Untersuchung der Wirkung von Überständen infizierter PEC auf die Stimulation naiver T-Zellen	68
3.2.5 Blockade des direkten Zellkontaktes infizierter APC mit T-Zellen	70
3.3 Vergleich verschiedener Methoden der Isolierung von T-Zellen aus der Milz	72
3.4 Bedeutung von CTLA-4 und Kostimulation für die Immunsuppression durch Infektion von APC	75
3.5 Restimulation von T-Zellen nach vorhergehender Stimulation durch infizierte APC	78
3.6 Vergleich polyklonaler und Antigen-spezifischer Stimulation von T-Zellen nach Infektion	81
3.7 Analyse der Interaktion der <i>T. cruzi</i> -trans-Sialidase mit CD43 auf T-Zellen	82
3.8 CD8 ⁺ T-Zellen zeigen bei Stimulation durch infizierte PEC vergleichbare Reaktionen wie CD4 ⁺ T-Zellen	85

3.9 Wechselwirkungen über TLR-2 spielen keine Rolle für die IL-2-Suppression nach der Infektion	87
3.10 Die Immunsuppression wird auch bei nicht-passendem MHC-Haplotyp vermittelt.....	89
3.11 Untersuchung des Einflusses infizierter Fibroblasten auf die Stimulation von T-Zellen	92
3.11.1 Einfluss infizierter MHC-II-transfizierter Fibroblasten auf die Stimulation von naiven T-Zellen	92
3.11.2 Einfluss von fixierten infizierten Zellen auf die IL-2-Produktion	94
3.11.3 Einfluss infizierter Fibroblasten ohne MHC auf die IL-2-Suppression	95
 4 Diskussion	97
4.1 Analyse der stimulatorischen Fähigkeiten von APC nach Infektion	98
4.2 Effektor-Zytokine.....	101
4.3 Anti-inflammatorische Zytokine.....	106
4.4 Kontakt-abhängige Mechanismen.....	108
4.5 Ausblick	114
 5 Zusammenfassung.....	115
 6 Literaturverzeichnis.....	117

Abkürzungsverzeichnis

ad	auf	GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Ag	Antigen	GPI	Glykosylphosphatidylinositol
AK	Antikörper	h	Stunde(n)
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)	HRPO	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	IFN	Interferon
AS	Aminosäure(n)	Ig	Immunglobulin
ATCC	American Type Culture Collection	IL	Interleukin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	iNOS	induzierbare NO-Synthase
CD	Nomenklatur für Oberflächen-antigene (<i>cluster of differentiation</i>)	i.p.	intraperitoneal
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ radioaktive Zerfälle pro Sekunde)	kDa	Kilodalton
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)	ko	Knockout
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten	l	Liter
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4	LPS	Lipopolysaccharid
DAPI	4',6-Diamino-2-phenyl-indol-Dihydrochlorid	μ	mikro (10^{-6})
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)	M	molar
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	m	milli (10^{-3})
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunsorbent-Assay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	mAK	monoklonale(r) Antikörper
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)	MHC	Haupthistokompatibilitäts-komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
EtOH	Ethanol	min	Minute(n)
Fab	Antigen-bindendes Fragment (<i>Fragment antigen binding</i>)	MOI	Infektionsrate (<i>multiplicity of infection</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)	M ϕ	Makrophagen
Fc	Antikörperfragment, das aus dem Verdau von IgG mit Papain hervorgeht (<i>Fragment crystallisable</i>)	NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle (<i>natural killer cell</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)	NO	Stickstoffmonoxid
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat	OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
g	Gramm	OT	Ovalbumin-transgen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung	Ova	Ovalbumin
		OVAp	Ovalbumin-Peptid
		p	piko (10^{-12})
		p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
		PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz-lösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
		PE	Phycoerythrin
		PEC	Peritoneale Exsudat-Zelle(n)
		PFA	Paraformaldehyd
		pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
		r	rekombinant

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)	TNF	Tumornekrosefaktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
RT	Raumtemperatur	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin- Isothiozyanat
sec	Sekunde(n)	Triton X-100	Alkylphenylpolyethylen- glykol (TX 100)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)	U	Einheit (<i>unit</i>)
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor β 1 (<i>transforming growth factor β1</i>)	ü.N.	über Nacht
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle	Upm	Umdrehungen pro Minute
TLR	Toll-ähnlicher o. Toll- Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)	UV	Ultraviolett
TMB	Tetramethylbenzidin	Vol.	Volumenanteil
		v/v	Volumen/Volumen
		w	Gewicht (<i>weight</i>)
		WT	Wildtyp
		w/v	Gewicht/Volumen

Tab. I: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben- Abkürzung	Ein-Buchstaben- Abkürzung
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Fleischer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Professor Bretting möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachter zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Jacobs für die ausgezeichnete und konstruktive wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Und zu guter Letzt den Mitgliedern der Abteilung, die mich mit vielen praktischen Tipps und Anregungen während der Arbeit unterstützt haben, ein herzliches Dankeschön.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Ein Organismus ist in seiner Umwelt fortwährend dem Kontakt mit Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Daher ist für die Erhaltung der biologischen Integrität des Individuums und zur Gewährleistung seines Überlebens ein funktionstüchtiges und vielschichtiges Abwehrsystem notwendig, das Krankheitserreger, körperfremde Stoffe und auch entartete körpereigene Zellen sofort als „gefährlich“ oder „fremd“ erkennt und bekämpft (Übersicht bei Janeway *et al.*, 2002; Janeway Jr., 1992).

Das Immunsystem höherer Vertebraten ist äußerst komplex aufgebaut. Es besteht aus einem System von ineinander greifenden Mechanismen, das sich aus Abwehrzellen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten), aus löslichen Komponenten und aus den lymphatischen Organen und Geweben zusammensetzt. Dabei dienen die sog. primären lymphatischen Organe, zu denen Knochenmark und Thymus zählen, der Entstehung, Entwicklung und Reifung von Immunzellen. Die sekundären lymphatischen Organe sind diejenigen Gewebe, in denen die Immunzellen aktiviert werden. Dazu gehören Lymphknoten, Mandeln, Milz und lymphatische Gewebe auf Schleimhäuten wie z.B. die Peyerschen Plaques (Peyer-Platten) im Darm (Übersicht bei Janeway *et al.*, 2002).

Schon das Eindringen eines Erregers wird dadurch erschwert, dass der Organismus über ausgeklügelte unspezifische Schutzbarrieren verfügt. Dazu zählen physikalische Barrieren wie die Epithelien und Endothelien der Haut- und Schleimhäute, biochemische Abwehrmechanismen durch Enzyme, z.B. Proteasen oder Lysozym, und chemische Mechanismen wie die bakterizide und fungizide Wirkung von Schleimen u. a. Sekreten. Trotz der genannten Schutzbarrieren kann es Fremdstoffen gelingen, in den Körper einzudringen. Dann werden die Mechanismen der unspezifischen und spezifischen Abwehr aktiviert, die eng miteinander verzahnt sind.

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die unspezifische angeborene Immunität, die dabei zuerst aktiv wird, ist nicht auf bestimmte Krankheitserreger ausgerichtet. Der unspezifischen Abwehr von Fremd-

stoffen (Bakterien, Viren, anorganischen Partikeln usw.) und u. U. auch dem Abbau von körpereigenen Stoffen, z.B. von Erythrozytentrümmern u. ä., dienen bestimmte gelöste Stoffe wie Proteine (z.B. Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine), Zytokine wie die Interferone sowie aggressive Verbindungen (z.B. O₂-Radikale). Überdies sind an den unspezifischen Abwehrvorgängen „Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen) und Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile), beteiligt. Des weiteren Zellen, die durch Phagozytose körperfremde Substanzen unschädlich machen (Phagozyten, Fresszellen), also Monozyten/Makrophagen und die neutrophilen Granulozyten. Die Phagozyten besitzen z.B. Rezeptoren für Kohlenhydrate wie Mannose, welche normalerweise nicht auf Zellen von Vertebraten vorkommt, und können dadurch zwischen körpereigen und körperfremd unterscheiden (Fraser *et al.*, 1998). Auf diese Weise sind sie gegen eine ganze Reihe von Bakterien wirksam. Doch haben andere Erreger im Laufe der Evolution „gelernt“, sich gegen die Phagozyten zu „wehren“. Bestimmte Erreger sind z.B. in der Lage, die Phagolysosomenbildung zu unterdrücken (Mykobakterien), die Phagozytose überhaupt zu verhindern oder aber, einmal phagozytiert, den Granulozyten abzutöten (z.B. Streptokokken und Staphylokokken). Gegen solche Erreger und gegen die meisten Viren ist das spezifische Immunabwehrsystem wirksam.

1.1.2 Die adaptive Immunität

Die spezifische erworbene (adaptive) Immunität beruht vornehmlich auf der Aktivität von zwei Klassen spezialisierter Zellen, den Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten, beziehungsweise auf den von ihnen abgeleiteten Effektormolekülen und Effektorzellen. Beide Lymphozyten-Klassen werden aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet (Abramson *et al.*, 1977; Lemischka *et al.*, 1986). Als Vorläuferzellen wandert kontinuierlich ein Teil von ihnen aus dem Knochenmark in den Thymus, wo die T-Lymphozyten ihre Spezifität (Immunkompetenz) erwerben (Kruisbeek, 1999). Dies geschieht nach neueren Erkenntnissen ein Leben lang (Jamieson *et al.*, 1999). Der andere Teil der Lymphozyten reift direkt im Knochenmark (*bone marrow*) zu den B-Lymphozyten aus (Rosenberg und Kincade, 1994). Vom Knochenmark und vom Thymus gelangen die Immunzellen in die Blut- und die Lymphbahnen, wo ein geringer Prozentsatz von ihnen zirkuliert. Der überwiegende Anteil der naiven Lymphozyten sammelt sich in den lymphatischen Organen, wo durch komplexe Wechselwirkungen mit verschiedenen Zellen die Ausbildung von spezifischen Immunreaktionen erfolgt (Übersicht bei Janeway *et al.*, 2002).

1.1.3 Molekulare Grundlagen der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten

Die B- und T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (B-Zell-Rezeptor, BCR bzw. T-Zell-Rezeptor, TCR), mit deren Hilfe sie definierte Strukturen, die sog. Antigene, erkennen und Immunreaktionen einleiten können. Die Fähigkeit der B- und T-Zellen, auf diverse unbekannte Antigene zu reagieren, liegt in der Vielfalt dieser Rezeptoren (nach Schätzungen ungefähr 10^{15} verschiedene) begründet. Ihre Diversität entsteht während der Entwicklung, bei der Genabschnitte durch einzigartige Rekombinationsprozesse so miteinander verknüpft (rearrangiert) und mutiert werden, dass jede B- bzw. T-Zelle einen einzigartigen Rezeptor trägt (Tonegawa, 1983).

B-Zellen besitzen membranständige Immunglobulin-Moleküle als Antigen-Rezeptoren und differenzieren nach Erkennen des passenden Antigens mit T-Zell-Hilfe zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen und B-Gedächtniszellen aus. Diese können bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen für eine schnellere Immunreaktion sorgen. Dabei werden die Antigene von den Immunglobulinen oder Antikörpern in ihrer nativen Form gebunden (Übersicht bei Poljak, 1991). Immunglobuline können Erreger nicht direkt vernichten, sondern markieren sie als Angriffsziel für andere Abwehrsysteme wie das Komplementsystem (Opsonisierung). Neben dem Antigen-Kontakt benötigen B-Zellen für ihre Aktivierung eine zusätzliche Unterstützung durch Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen (DeFranco, 1987).

Anders als Immunglobuline werden die T-Zell-Rezeptoren ausschließlich als Transmembran-Moleküle produziert und erkennen Antigene nur in prozessierter Form, wenn sie als Peptide in einem Komplex mit Haupthistokompatibilitäts-Molekülen (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden (Babbitt *et al.*, 1985). Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet und beschränkt die Aktivierung von T-Zellen auf die Erkennung von Zell-gebundenem Antigen. Der TCR besteht aus einem α/β - oder bei einer kleinen Subpopulation der T-Zellen aus einem γ/δ -Heterodimer und ist eng mit weiteren akzessorischen Membranproteinen assoziiert. Zu letzteren gehört der CD3-Komplex, der für die Signaltransduktion durch den TCR verantwortlich ist (Übersicht bei Weiss und Littman, 1994). Ferner zählen die akzessorischen Korezeptoren CD4 und CD8, die die MHC-Moleküle auf der APC binden, zum TCR-Komplex. Der Korezeptor CD4 interagiert mit Molekülen der MHC-Klasse II (Cammara *et al.*, 1992), der Korezeptor CD8 dagegen mit Molekülen der MHC-Klasse I (Gao *et al.*, 1997).

Anhand der Expression der genannten Korezeptoren werden T-Lymphozyten in CD4-positive ($CD4^+$) T-Helfer-Zellen (T_H) und CD8-positive ($CD8^+$) zytotoxische T-Zellen (CTL) unterteilt.

Die Hauptaufgabe der $CD8^+$ T-Zellen besteht darin, infizierte oder maligne entartete Körperzellen abzutöten, indem sie verschiedene Effektormechanismen einsetzen. Sie exprimieren zum einen den Fas-Liganden, der bei Fas-tragenden Zellen Apoptose induzieren kann, zum anderen können sie zielgerichtet zytotoxische Granula ausschütten, die Perforin und Proteasen enthalten (Übersicht bei Squier und Cohen, 1994). Darüber hinaus vermögen CTL Zytokine wie Interferon- γ ($IFN-\gamma$) freizusetzen, das u.a. zur Aktivierung von Makrophagen beiträgt. Außerdem kann es die Replikation von Viren blockieren und sogar deren Eliminierung aus infizierten Zellen bewirken, ohne dass die Zellen dabei getötet werden (Übersicht bei Harty *et al.*, 2000). Die Aktivierung der CTL erfolgt durch Zellen, auf deren Oberfläche ihr TCR sein spezifisches Antigen im Komplex mit MHC-Klasse I-Molekülen erkennt. Zur Präsentation von Peptid-Antigenen durch MHC-I-Moleküle sind fast alle kernhaltigen Körperzellen in der Lage. Die präsentierten Peptide besitzen eine Länge von nur 8 bis 10 Aminosäuren (AS) und stammen aus dem proteolytischen Abbau von Proteinen im Zytosol (Übersicht bei Harding und Unanue, 1990; Rammensee, 1995).

$CD4^+$ T-Zellen dagegen werden durch Antigen-Peptide aktiviert, die mit MHC-Molekülen der Klasse II assoziiert sind. Diese werden beinahe ausschließlich auf sog. professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert, zu denen die Monozyten/Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen gehören (Übersicht bei Chesnut und Grey, 1985). Auf MHC-Klasse II werden Peptide präsentiert, die 12 bis 24 AS lang sind und von vesikulären oder extrazellulären Antigenen stammen, die durch Phagozytose von den APC aufgenommen und dann prozessiert wurden (Rammensee, 1995). Die Hauptaufgabe der $CD4^+$ T-Zellen besteht in der Unterstützung und Kontrolle anderer Zellen des Immunsystems. Daher werden sie auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Sie üben ihre Funktion sowohl durch direkten Zell-Zell-Kontakt (Übersicht bei Grewal und Flavell, 1998) als auch über die Freisetzung löslicher Mediatoren - Zytokine - (Übersicht bei Paul und Seder, 1994) aus.

Anhand ihres Zytokinprofils wurden $CD4^+$ T-Zellen ursprünglich in zwei Haupt-Typen unterteilt (Mosmann und Sad, 1996). Von diesen beiden sezernieren die Typ 1-Helfer-T-Zellen (T_H1) Interleukin-2 und inflammatorische Zytokine wie $IFN-\gamma$, wodurch sie v. a. zur Aktivierung von Makrophagen beitragen (zellvermittelte Immunität), während die Typ 2-Helfer-T-Zellen (T_H2) durch Produktion von Interleukin-4, -5 und -10 eine Aktivierung von B-Zellen und damit die Antikörperproduktion (humorale Immunantwort) fördern (Übersicht bei Moser und Murphy, 2000). Inzwischen wurde eine weitere

Unterklasse von T-Zellen beschrieben, die immunsuppressive Funktionen ausübt und andere Zytokinprofile als die genannten T_H1 - und T_H2 -Zellen aufweist. Diese Zellen werden als regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bezeichnet und wiederum in mehrere Gruppen unterteilt (McGuirk und Mills, 2002): Typ 1- T_{reg} -Zellen ($Tr1$) sezernieren große Mengen an IL-10 und geringe bis moderate Mengen an TGF- β (Groux *et al.*, 1997; Doetze *et al.*, 2000; McGuirk *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2002); Typ 3-T-Zellen (T_H3) produzieren vor allem TGF- β (Chen *et al.*, 1994; Fukaura *et al.*, 1996), und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen inhibieren Immunantworten durch Zell-Zell-Kontakt (Shevach *et al.*, 2000). Auch $CD8^+ T_{reg}$ -Zellen wurden jüngst identifiziert. Diese sezernieren entweder IL-10 oder TGF- β (Garba *et al.*, 2002; Gilliet und Liu, 2002).

Die durch Antigenkontakt vermittelten Signale alleine aktivieren naive T-Lymphozyten - ebenso wie B-Lymphozyten - nicht. Stattdessen führen solche isolierten Signale zur Eliminierung der Zelle durch Apoptose oder aber zu Anergie, einem Zustand, in dem sich die T-Zelle auch bei optimaler Stimulation durch ihr spezifisches Antigen nicht mehr aktivieren lässt (Schwartz, 1990). Zur vollständigen Aktivierung naiver T-Lymphozyten werden zwei Signale benötigt (Übersicht Croft und Dubey, 1997). Die Bindung des TCR und seines jeweiligen Korezeptors CD4 oder CD8 an den MHC-Peptid-Komplex löst eine partielle Aktivierung aus, die zur Zellvergrößerung sowie einer verstärkten Expression von CD69, CD44 und der IL-2-Rezeptor alpha-Kette führt (Sagerstrom *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1994). Erst eine Kostimulation durch die APC ermöglicht eine volle Aktivierung der T-Zelle, die sodann IL-2 sezerniert, proliferiert und zu einer Effektorzelle differenziert. Das am besten untersuchte kostimulatorische Signal ist die Interaktion von CD28 mit Mitgliedern der B7-Familie, die der Immunglobulin-Superfamilie angehören (June *et al.*, 1994). Dazu zählen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die sich auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten sowie aktivierten professionellen APC nachweisen lassen (Hathcock *et al.*, 1994). Ihr Interaktionspartner, das CD28-Molekül, wird bei Mäusen konstitutiv auf allen, beim Menschen auf etwa 80 % der T-Zellen exprimiert (Lenschow *et al.*, 1996).

Auch Negativregulatoren haben Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung. Beispielsweise ist ein weiterer Ligand von B7.1 und B7.2 das CTLA-4, dessen Expression durch den aktivierten TCR induziert werden kann und das im Vergleich mit CD28 eine höhere Affinität zu den B7-Proteinen besitzt. Es fungiert als Antagonist von CD28 und kann die T-Zell-Aktivierung beenden (Waterhouse *et al.*, 1996; Bluestone, 1997). Die Balance kostimulatorischer und inhibitorischer Signale soll gewährleisten, dass eine unangemessene oder fehlgeleitete T-Zell-Aktivierung vermieden wird.

Zytokine spielen eine zentrale Rolle bei der Beeinflussung der Richtung der Immunantwort, die für einen optimalen Schutz gegen das jeweilige infektiöse Agens notwendig ist. Die Freisetzung von IL-12 durch APC beispielsweise stimuliert die Produktion von IFN- γ durch T_H1-Zellen. Dieses Zytokin wiederum aktiviert effizient Makrophagen und ermöglicht es ihnen, intrazelluläre Organismen, z.B. Parasiten wie Trypanosomen, Leishmanien oder Plasmodien, abzutöten (Frosch *et al.*, 1996; Marovich *et al.*, 2000). Die Abwesenheit von IL-12 dagegen erlaubt T_H2-Antworten.

Viele Immunantworten - wie z.B. die Generierung Antikörper-produzierender B-Zellen, die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und die Expansion oder Aktivierung von NK-Zellen oder T_H-Zellen - sind direkt oder indirekt abhängig von IL-2 (Smith, 1984; Choromanski und Kuhn, 1987). Vor allem für die Proliferation Antigen-stimulierter T-Zellen ist IL-2 ein essentieller Wachstumsfaktor. Das lässt eine Korrelation zwischen klonaler Expansion und IL-2-Produktion vermuten. Diese Vermutung wird gestützt durch Experimente mit T-Zellen aus IL-2-defizienten Mäusen, die *in vitro* auf eine optimale TCR-Stimulation hin bedeutend weniger gut proliferieren als T-Zellen normaler Mäuse (Schorle *et al.*, 1991). IL-2 scheint daher eine Schlüsselrolle bei der Regulierung zellulärer Immunantworten zu spielen. Durch Anwesenheit von IL-1 und Mitogen oder Antigen werden T-Lymphozyten dazu stimuliert, ihren eigenen Wachstumsfaktor, das IL-2, auszuschütten sowie dessen Oberflächenrezeptor, also den IL-2-Rezeptor, herzustellen. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor löst das Signal zur Teilung aus und induziert damit die Proliferation der T-Zelle. Mit Hilfe dieses autokrinen Mechanismus kann die stimulierte T-Zelle nun auch in der Abwesenheit des ursprünglichen Stimulus weiter proliferieren.

Pathogene können das Zytokinprofil von Immunantworten beeinflussen. Viele intrazelluläre Erreger, wie z.B. Viren, Leishmanien, Mykobakterien oder Trypanosomen, stimulieren die infizierten APC zur Freisetzung von IL-12 und begünstigen auf diese Weise T_H1-Antworten (Cella *et al.*, 2000; Marovich *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 1997; Frosch *et al.*, 1996). Manche Würmer dagegen reduzieren die IL-12-Produktion mit Hilfe inhibitorischer Faktoren, so dass die Entstehung von T_H2-Antworten gefördert wird (Velupillai und Harn, 1994; Meyer *et al.*, 1996).

1.2 Das Protozoon *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi wurde vom Entdecker Carlos Chagas nach dem Direktor des Institutes Oswaldo Cruz benannt. Es handelt sich bei *T. cruzi* um Einzeller (Protozoa), die innerhalb der Gruppe der Geißeltiere (Flagellata) zur Ordnung der Kinetoplastida gehören. Diese sind durch den Besitz eines speziellen Zellorganells, des sog. Kinetoplasten, charakterisiert. Der Kinetoplast ist ein DNA-haltiger Abschnitt des lang gestreckten Mitochondriums, der stets nahe am Ursprung der Geißel liegt.

T. cruzi gehört zur Familie der Trypanosomatidae, deren besonderes Merkmal ein Gestaltwandel im Verlauf ihres Entwicklungszyklus ist. Dabei folgen unterschiedlich strukturierte Stadien mit verschiedenem Geißelansatz aufeinander (Polymorphismus), die nach dem jeweiligen Ansatz der Begeißelung als amastigot, epimastigot, promastigot bzw. trypomastigot bezeichnet werden. Alle Stadien besitzen nur eine Geißel, allerdings von unterschiedlicher Länge. Bei den sog. amastigoten Formen ragt die Geißel nicht über die Zelloberfläche hinaus, ist aber prinzipiell vorhanden, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen. Die Geißel, die stets in einer mehr oder minder langen Geißeltasche beginnt und die mit einem typischen Basalapparat im Plasma verankert ist, dient dem Parasiten nicht nur zur Fortbewegung, sondern auch zur Verankerung im wirbellosen Wirt. Alle Stadien von *T. cruzi* werden von einer einfachen Zellmembran begrenzt, unter der spiralig angeordnete Mikrotubuli ein stabiles Zytoskelett bilden. Die Vermehrung der Trypanosomen erfolgt stets durch Längsteilung, wobei der Basalapparat und der Kinetoplast vor der Kernteilung verdoppelt werden (Übersicht bei Mehlhorn und Piekarski, 2002).

Die Verbreitung von *T. cruzi* erfordert aktive Überträger (Vektoren), in denen eine ganz bestimmte zyklische Entwicklung ablaufen muss (obligater Entwicklungsgang). Der Parasit wird durch blutsaugende Wanzen der Familie der Reduviidae (Raubwanzen) übertragen. Er konnte in 53 von insgesamt 92 Arten dieser Insekten nachgewiesen werden (Lang und Löscher, 2000). Dabei sind vor allem die an menschliche Behausungen adaptierten Spezies von Bedeutung, unter denen die Gattungen *Triatoma* (speziell die Art *Triatoma infestans*) und *Rhodnius* (Art *Rhodnius prolixus*) geographisch am weitesten verbreitet sind (Dias *et al.*, 2002). Die etwa 3 cm großen Raubwanzen können lebenslang (d.h. maximal 2 Jahre) die Erreger der Chagas-Krankheit übertragen. Da hungrige Wanzen sogar vollgesogene Artgenossen anstechen und aussaugen, kann auf diese Weise innerhalb der Wanzenpopulation selbst eine Ausbreitung der Chagas-Erreger erfolgen. Die Raubwanzen, die sich an die Umgebung des Menschen angepasst haben, sind überwiegend nachtaktiv und verstecken sich tagsüber in den Ritzen einfach konstruierter Wohnräume. Zur Nahrungsaufnahme suchen sowohl die männlichen als

auch die weiblichen Insekten schlafende Menschen auf, die sie vorwiegend in der Nähe des Mundes oder der Augen stechen, um ihre Blutmahlzeit zu sich zu nehmen. Dabei setzen sie sofort neben der Stichstelle Kot ab, welcher die humanpathogenen Parasiten enthält. Der Stich an sich ist schmerzlos, allerdings beginnt die betroffene Region anschließend zu jucken, was zum Einreiben der *T. cruzi*-haltigen Fäzes in die Stichwunde und damit zur Infektion führt. Auch über intakte Schleimhäute können die Parasiten in die Blutbahn des menschlichen Wirtes gelangen (Meyer, 2001).

1.2.1 Entwicklungszyklus von *T. cruzi*

Der Entwicklungszyklus von *T. cruzi* wurde in seinen Grundzügen vor nahezu einem Jahrhundert aufgeklärt (Chagas, 1909). Er erstreckt sich über zwei Wirtstypen, Wirbeltier und Insektenvektor, wodurch es sich bei diesem Parasiten um eine sog. heteroxene Art handelt. In Abbildung 1.1 ist er schematisch dargestellt.

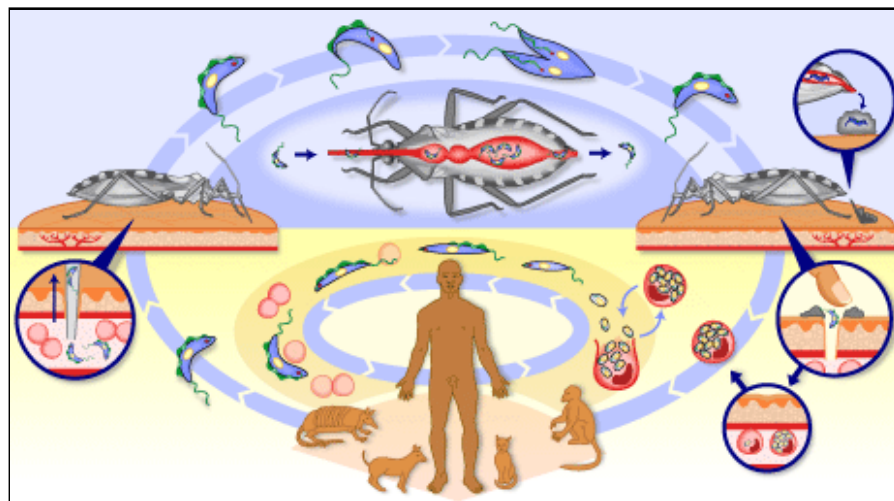


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. cruzi*.

Detaillierte Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Quelle: TDR/Wellcome Trust (WHO, 2003a).

Innerhalb der ersten Tage nach Einbringen der infektiösen Formen von *T. cruzi* (den metazyklischen Trypomastigoten) in die Blutbahn des Menschen oder eines anderen Säugetier-Wirtes, werden die Trypanosomen in den regionalen Lymphknoten von Zellen des retikuloendothelialen Systems (v. a. Makrophagen) phagozytiert. Im Blut besitzt diese Form des Parasiten eine C- oder S-förmige Gestalt der Länge von 15-20 µm. Die metazyklischen Trypomastigoten sind auch dazu in der Lage, aus der Blutbahn heraus aktiv in Gewebszellen einzudringen, wobei sie zwar Muskel- und Nerven-

zellen bevorzugen, eigentlich aber alle kernhaltigen Körperzellen befallen können (Burleigh und Woolsey, 2002). Dabei werden die Wirtszellen über spezifische Rezeptoren erkannt (Ruiz *et al.*, 1993; Schenkman *et al.*, 1993). So heften sich die Parasiten bei der aktiven Invasion einer Wirtszelle erst einmal mit Hilfe entsprechender Liganden an die Sialinsäure (z.B. Neuraminsäure) und Lektine der Wirtszellmembran an (Ming *et al.*, 1993). Alsdann lösen Enzyme der Trypanosomen (*trans*-Sialidase, Penetrine) in der Wirtszelle Signalwege aus, die zu einer zielgerichteten Rekrutierung sowie Fusion von Wirtszell-Lysosomen mit der Plasmamembran und damit zur Generierung einer sog. parasitophoren Vakuole führen (Rodriguez *et al.*, 1999). In dem sauren Milieu der Vakuole sezerniert *T. cruzi* Poren-formende Moleküle, die die Lyse der Vakuolenwand bewirken, und so die Freisetzung der Parasiten ins Zytosol ermöglichen (Andrews und Whitlow, 1989; Andrews, 1993). Im Zytoplasma der Wirtszelle entwickeln sich die Trypanosomen zu 3-5 µm großen ovalen amastigoten Formen (Tyler und Engman, 2001), den Stadien, über die sie sich im Säuger-Organismus ausschließlich vermehren. Die Amastigoten vervielfältigen sich durch Zweiteilung so stark, dass zystenartige „Nester“ entstehen, weshalb die befallenen Wirtszellen auch als Pseudozysten bezeichnet werden (Dvorak und Howe, 1976; Andrews, 1993). Diese enthalten zuletzt bis zu 500 Parasiten (Piekarski, 1987). Mit dem Aufreißen der Pseudozyste erfolgt schließlich via epi- und promastigoter Zwischen-Stadien die Transformation zu den trypomastigoten Formen (Kollien und Schaub, 2000), die wiederum in die Blutbahn gelangen und sich in einem kontinuierlichen Wechsel von Gewebs- und Blutformen replizieren, so dass sich die Parasiten im gesamten Organismus ausbreiten. Ein Durchgang des intrazellulären Replikationszyklus dauert 3-5 Tage (Burleigh und Woolsey, 2002). Die Blutstadien besitzen außen auf der Zellmembran eine etwa 10-15 nm dicke Schicht, die als „surface coat“ bzw. Glykokalyx bezeichnet wird und Schutz vor Antikörpern und Komplement des Wirtes bietet.

Werden die im Blut zirkulierenden trypomastigoten (und bis zu 10 % amastigoten) Formen bei der Blutmahlzeit von einer Raubwanze aufgenommen (Andrews *et al.*, 1987; Ley *et al.*, 1988), dann durchlaufen sie den Vektorzyklus. Sie wandeln sich im Mitteldarm der Wanze via amastigoter Form (die in diesem Zusammenhang manchmal als sphaeromastigote Form bezeichnet wird [Tyler und Engman, 2001]) zur epimastigoten Form um und vermehren sich intensiv durch Längsteilungen. Da Amastigote, Sphaeromastigote und Epimastigote proliferativ sind, erscheint der Übergang von einer dieser Formen zur anderen kontinuierlich (Tyler and Engman, 2001). Im Rektum der Wanze heften sich die teilungsaktiven epimastigoten Formen über hydrophobe Wechselwirkungen an der Rektumwand fest (Schmidt *et al.*, 1998) und differenzieren

zu nicht-replikativen infektiösen trypomastigoten Formen (Bonaldo *et al.*, 1988; Kleffmann *et al.*, 1998). Diese metazyklischen, d.h. übertragungsbereiten, trypomastigoten Formen können während einer Blutmahlzeit des Insekts mit den Ausscheidungen auf die Haut eines neuen Wirtes gelangen, womit sich der Zyklus schließt.

Auf die Überträger aus dem Insektenreich wirkt *T. cruzi* kaum oder gar nicht schädigend, so dass selbst bei starkem Befall eine ungehemmte Erreger-Verbreitung infolge ungestörter Flugleistung des Insekts erfolgen kann.

1.2.2 Epidemiologie

Die durch *T. cruzi* verursachte Chagas-Krankheit kommt endemisch in 21 Ländern Zentral- und Südamerikas vor, weshalb die Erreger auch als „amerikanische Trypanosomen“ und die Krankheit als „amerikanische Trypanosomiasis“ bezeichnet wird. Sie bedroht etwa 120 Millionen Menschen, d.h. zirka 25 % der lateinamerikanischen Bevölkerung, und stellt damit eine der größten Tropenparasitosen dar. Nach Schätzungen sind 16-18 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert. Davon leiden 2-3 Millionen bekanntermaßen unter chronischen Komplikationen, weitere Millionen werden ebensolche in den nächsten Jahren entwickeln. Es werden jährlich 300.000 neue Krankheitsfälle gemeldet und im Jahr 2002 wurden 13.000 Todesfälle offiziell verzeichnet (Weltgesundheitsbericht, 2002). Schätzungen, die auf Ergebnissen einiger langjähriger Studien beruhen, gehen davon aus, dass jährlich sogar 45.000 Menschen an den Komplikationen der Chagas-Krankheit versterben (Knobloch, 1996).

Aufgrund des Verbreitungsgebietes der übertragenden Raubwanzen kam die Chagas-Krankheit ursprünglich fast ausschließlich in ländlichen Gebieten vor. Dabei ist das Infektionsrisiko abhängig vom sozialen und wirtschaftlichen Umfeld, denn die Vektoren finden v. a. in den Strohänden von Slumsiedlungen in ländlichen Gegenden und ungeplanten Stadtansammlungen geeignete Lebensbedingungen. Seit einigen Jahrzehnten (den 70er Jahren) tragen die ländlich-urbanen Wanderbewegungen in Lateinamerika zur Ausbreitung der Erkrankung in nichtendemische Gebiete bei, primär über nicht-überprüfte Bluttransfusionen. Nicht selten wird in den USA bei Immigranten aus Lateinamerika eine Chagas-Krankheit nachgewiesen (Hagar und Rahimtoola, 1991; Kirchhoff, 1993).

Als Reservoir für die Erreger der Chagas-Krankheit kommen zahlreiche Haus- und Wildtiere in Frage, die den Raubwanzen als Blutspender dienen und die selbst nicht erkranken. *T. cruzi* hält sich mit Hilfe von Hunden, Katzen, Ratten, Gürtel- und Faul-

tieren sowie Fledermäusen u. a. Tieren in ländlichen wie auch in urbanisierten Regionen auf (Herrera und Urdaneta-Morales, 1992; Gurtler *et al.*, 1993).

Eines der wichtigsten Erreger-Reservoirs ist jedoch der infizierte Mensch. Denn neben der Übertragung durch Raubwanzen ist der zweitwichtigste Übertragungsweg der über Transfusionen mit Blut infizierter Personen (Nickerson *et al.*, 1989; Knecher *et al.*, 1994). Dabei ist nicht ungewöhnlich, dass 10-20 % der Bluttransfusionen in Endemiegebieten kontaminiert sind. Zwischen 1960 und 1989 waren in Blutbanken in Santa Cruz (Brasilien) sogar 53 % der Blutproben mit *T. cruzi* infiziert - bedeutend mehr als mit Hepatitis oder HIV (WHO, 2003b). Des Weiteren können auch kongenitale bzw. konnatale Übertragungen von infizierten Müttern auf den Fötus auftreten, wobei die Letalität der Infektion in diesen Fällen sehr hoch ist (Gurtler *et al.*, 2003). Außerdem sind Infektionen über die Muttermilch oder Organtransplantationen bekannt (Figueiredo *et al.*, 1990).

1.2.3 Krankheitsbild

Die in Südamerika von *T. cruzi* übertragene Krankheit wurde nach ihrem Entdecker, dem brasilianischen Arzt Dr. Carlos Chagas (1879-1934), als Chagas-Krankheit bezeichnet. Dieser beschrieb die Krankheit erstmalig im Jahre 1909 (Chagas, 1909). Außerdem beschrieb er den Lebenszyklus des Parasiten, identifizierte die Insekten, die die Parasiten übertragen, und einige Kleinsäuger, die als Reservoirwirte fungieren.

Bei der Infektion des Menschen mit *T. cruzi* werden eine akute, eine intermediäre und eine chronische Phase der Erkrankung unterschieden. Die jeweilige Erregervirulenz und die Wirtsreaktion bestimmen unterschiedliche Verläufe der Krankheit (Knobloch, 1996). Die Infektion erfolgt meist in der frühen Kindheit, in der es auch zu schweren Verläufen mit Todesfolge kommen kann.

Bei der Inokulation der Trypanosomen kann an der Wanzenstichstelle eine starke akute Entzündungsreaktion mit Bildung eines Hautknotens, eines sog. Chagoms, hervorgerufen werden. Das Chagom enthält trypomastigote Erregerformen und erreicht nach wenigen Tagen seine maximale Größe, bildet sich allerdings auch ohne Behandlung nach einigen Wochen spontan zurück. Da die Wanzen vorwiegend im Gesicht, in der Nähe des Mundes oder der Augen stechen, kommt es häufig (bei bis zu 50 % der Fälle lt. Lang und Löscher, 2000) zu einer einseitigen Rötung und Schwellung von Wange, Augenlid und Bindehaut des betroffenen Auges (Romaña-Zeichen, Abb. 1.2).



Abb. 1.2: Romaña-Zeichen bei einem jungen Mädchen.

Akute Chagas-Krankheit bei einem jungen Mädchen mit dem Romaña-Zeichen am Auge.

Quelle: WHO, 2003c.

Eine beginnende Chagas-Krankheit wird oft nicht bemerkt, weil die etwa ein bis vier Wochen nach der Infektion einsetzende akute Phase völlig asymptomatisch verlaufen kann. Zudem sind die Symptome uncharakteristisch bzw. vielgestaltig und werden daher oftmals fehlgedeutet, so dass in weniger als 10 % der Fälle die Diagnose der Trypanosomen-Infektion gestellt wird. Charakteristisch für die akute Chagas-Krankheit ist ein kurzer Krankheitsverlauf mit einer hämatogenen Verbreitung des Parasiten, die zur Invasion verschiedener Gewebe und Organsysteme führt sowie zu Fieber und Entzündungen in den Geweben, in denen sich die Trypanosomen aufhalten. Vor allem bei Kindern treten vereinzelt Myokarditis oder Meningoenzephalitis auf, die bereits in der akuten Krankheitsphase den Tod zur Folge haben können. Abgesehen von den letztgenannten Fällen ist es so, dass sich alle Symptome innerhalb von einigen Wochen bis Monaten verlieren.

Die sich anschließende sog. intermediäre (Latenz-) Phase der Chagas-Krankheit verläuft klinisch völlig symptomlos und kann 10 bis 20 Jahre oder länger andauern. Während zwei Drittel der Infizierten lebenslang in dieser Phase verbleiben, ohne äußerlich jemals wieder nennenswerte Krankheitszeichen aufzuweisen (indeterminierte Form), treten beim letzten Drittel nach vielen Jahren Symptome auf, die die chronische Phase der Krankheit charakterisieren. Diese Symptome sind die Folgen der Organläsionen, die schließlich als Chagasleiden manifest werden (Kirchhoff und Neva, 1985). Dabei wird überwiegend vorgefunden, dass eine zunehmende Zerstörung des Herzmuskels und des Reizleitungssystems (Junqueira Jr. *et al.*, 1992) zu Herzveränderungen führt, die einer chronischen Myokarditis entsprechen (Chagas-Kardiomyopathie). Diese werden vermutlich sowohl durch die zellzerstörende Wirkung der Trypanosomen selbst als auch durch zellvermittelte Autoimmunreaktionen hervorgerufen und führen häufig zu einer Vergrößerung des Herzens. Nicht selten tritt bei den Betroffenen ein plötzlicher Herztod ein (Maguire *et al.*, 1987), der ohne Autopsie als akuter Herzinfarkt missdeutet wird. Diese Herzbeteiligung stellt die Haupttodesursache der Chagas-Krankheit dar.

Neben dem Herz-Kreislaufsystem ist in der chronischen Phase der Chagas-Krankheit vor allem der Gastrointestinaltrakt betroffen. Hier führt die Zerstörung von Nervenzel-

len (Ganglienzellen des Meißnerschen u. Auerbachschen Plexus) zu einem Tonus- und Motilitätsverlust mit einer enormen Erweiterung der Organe. Sie entwickeln sich zu sog. Megaorganen wie Megaösophagus und Megakolon. Auch diese Infektionsfolgen können letztendlich zum Tod führen (Tanowitz *et al.*, 1992).

1.2.4 Diagnostik

Die Diagnose einer akuten Krankheit mit *T. cruzi* ist in der Regel durch den direkten Nachweis von Parasiten im peripheren Blut des Patienten mittels Ausstrich oder mit Hilfe des sog. „Dicken Tropfens“ möglich. In der chronischen Phase der Chagas-Krankheit ist der Direktnachweis des Erregers schwieriger, weil aufgrund seiner intrazellulären Vermehrung nur noch sehr wenige zirkulierende Trypomastigoten im Blut des Infizierten vorkommen. In diesem Fall ist auch heutzutage noch die 1914 von Brumpt entwickelte *Xenodiagnose* eine sehr gute Nachweismethode. Dabei werden in Laboratorien gezüchtete, parasitenfreie Raubwanzen zur Blutmahlzeit auf der Haut des Patienten fixiert und ein bis zwei Monate danach auf Parasiten im Darm hin untersucht. Alternativen zu dieser Nachweismethode stellen der Antigennachweis und die PCR dar. Im chronischen Stadium lassen sich mit Hilfe von ELISA oder Immunfluoreszenz bei über 95 % der Patienten IgG-Antikörper detektieren, während im akuten Stadium IgM-Antikörper nachweisbar sind. Es kann sogar die nach der akuten Phase keine weiteren Schäden verursachende indeterminierte Form der Chagas-Krankheit anhand der idiotypischen Serumantikörper von den schweren chronischen Verlaufsformen unterschieden werden, bei denen andere Antikörperqualitäten gebildet werden, die möglicherweise an der Pathogenese beteiligt sind (Reis *et al.*, 1993a). Die empfindlichste Nachweismethode scheint die Amplifikation mittels PCR und anschließende Detektion Parasitenspezifischer DNA zu sein, die auch bei der Aufarbeitung von Gewebeproben gut einsetzbar ist (Avila *et al.*, 1991; Diaz *et al.*, 1992; Kirchhoff *et al.*, 1996).

1.2.5 Therapie

Die Chemotherapie der Chagas-Krankheit ist problematisch, denn die bisher im klinischen Einsatz befindlichen Medikamente sind toxisch und sollten zu Beginn einer Therapie nur stationär verabreicht werden. Zudem müssen sie über relativ lange Zeiträume gegeben werden, sind in einigen endemischen Ländern gar nicht erhältlich oder sehr teuer und wirken nur in der Hälfte der Fälle (TDR, 2003). Zwei Präparate werden in der Behandlung bisher eingesetzt, die hauptsächlich in der akuten Krankheitsphase

wirksam sind, da sie v. a. die Parasiten im Blut vernichten. Das eine (Nifurtimox) muss für 50-120 Tage eingenommen werden und das andere (Benznidazol) für zirka 60 Tage. Bei einigen *T. cruzi*-Stämmen konnten inzwischen Resistenzen gegen die genannten Mittel aufgezeigt werden. Eine erfolgversprechende Alternative könnte das Präparat Allopurinol sein, für das in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass es bei geringerer Nebenwirkungsrate die Parasiten ähnlich effektiv eliminiert (Gallerano *et al.*, 1990). In Tierversuchen wurde auch ein protektiver Effekt des Fungizids Ketoconazol nachgewiesen. Die Wirkung der Chemotherapeutika in der chronischen Phase ist begrenzt, da die morphologischen Schäden bereits eingetreten sind. Daher steht bei der chronischen Erkrankung eine symptomatische Behandlung im Vordergrund.

1.2.6 Bekämpfung und Prophylaxe

Eine Prävention der *T. cruzi*-Infektion durch Chemoprophylaxe oder Schutzimpfung ist bislang nicht möglich. Da *T. cruzi*-Antigene aufgrund ähnlicher Epitope des Parasiten mit menschlichen Geweben möglicherweise Autoimmunität stimulieren können (vgl. 1.2.8), werden die Aussichten auf Entwicklung einer effektiven Vakzine kontrovers beurteilt (Reed, 1998).

Bei der Bekämpfung der amerikanischen Trypanosomiasis steht die Vernichtung des Insekten-Vektors im Vordergrund (Schofield und Dias, 1999). Insektizide in Form von Sprays, Wandfarben und Dämpfe freisetzenden Räucherkanistern bekämpfen Raubwanzen in den menschlichen Behausungen wirksam, müssen allerdings wiederholt eingesetzt werden. Amerikanische Einrichtungen haben zu dem Zweck Programme zur zentral organisierten Raubwanzenvernichtung ins Leben gerufen wie die Initiative der „Southern Cone-Länder“ Argentinien, Bolivien, Brasilien, Chile, Paraguay und Uruguay (1991) und die Initiative der Anden-Länder u. der zentralamerikanischen Länder (1997). Anhand der Befallsrate von Haushalten mit Raubwanzen wird die Effektivität der Vektoren-Bekämpfung gemessen (Gurtler *et al.*, 1994). Außerdem werden systematisch Blutspenden untersucht, um die Verbreitung über Bluttransfusionen zu unterbinden. Dazu überprüfen Blutbanken ihre Proben mittels ELISA auf spezifische Antikörper (Knecher *et al.*, 1994). Bemerkenswerte Erfolge bei der Unterbrechung einer Transmission sind bereits in einigen Ländern zu verzeichnen. So wurden inzwischen Uruguay (1997) sowie Chile (1999) und ein Großteil der endemischen Staaten Brasiliens (2000) als frei von Vektor- und Transfusions-vermittelten Übertragungen der Chagas-Krankheit zertifiziert. Ein langfristiger Erfolg im Kampf gegen die amerikanische Trypanosomiasis hängt allerdings stark von der Verbesserung der Lebens- und

Wohnverhältnisse in Endemiegebieten ab, da die Vektoren in den meisten Ländern nicht strikt auf die menschlichen Unterkünfte beschränkt sind und es somit nicht möglich ist, sie völlig auszulöschen. Daher müssen die Behausungen in erster Linie unpassend für eine erneute Kolonisierung durch Wanzen aus sylvatischen Biotopen gemacht werden. Zudem bedarf die Bevölkerung in endemischen Gebieten umfassender Gesundheitsaufklärung. Die Eliminierung der Krankheit als ein großes öffentliches Gesundheitsproblem ist möglicherweise ein erreichbares Ziel, die Ausrottung aufgrund ihrer zoonotischen Natur dagegen unmöglich.

1.2.7 Immunologie der *T. cruzi*-Infektion

Die Erreger der Chagas-Krankheit können von Makrophagen phagozytiert werden oder dringen aktiv in sie ein, um sich darin zu replizieren. Dabei wird ein Teil der Trypanosomen in den Makrophagen abgetötet, wobei u.a. reaktive Stickoxide beteiligt sind (Vespa *et al.*, 1994; Aliberti *et al.*, 1999). Abbauprodukte der Trypanosomen aus den Phagolysosomen werden auf der Zelloberfläche der Makrophagen mit MHC II-Molekülen den CD4⁺ T-Zellen präsentiert, Abbauprodukte aus dem Zytoplasma mit MHC I-Molekülen den CD8⁺ T-Zellen. Auf diese Weise können die entsprechenden T-Zellen aktiviert werden. Dass T-Zellen bei der Vermittlung einer Resistenz gegen *T. cruzi* eine Schlüsselrolle spielen, wurde deutlich durch die Beobachtung, dass sich durch gereinigte T-Zellen (nicht aber B-Zellen) von immunisierten Mäusen ein Schutz auf suszeptible Wirte passiv übertragen ließ (Reed, 1980; Araujo, 1989). Dabei sind sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen wichtig (Kumar und Tarleton, 1998; Miyahira *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 1999). Die Abwesenheit einer der beiden Populationen führt zu verstärkter Suszeptibilität. Die CD8⁺ T-Zellen, die direkt infizierte Wirtszellen abtöten können, sind an der Abwehr der akuten Infektion wesentlich beteiligt (Tarleton, 1990 und 1991; dos Santos *et al.*, 1992). In der chronischen Phase der Infektion dominieren sie die zellulären Infiltrate der Chagas-Myokarditis und beteiligen sich möglicherweise an der Zytolyse und Fibrose des Myokards (Reis *et al.*, 1993b). Eine Hauptrolle bei der Bildung einer protektiven Immunität gegen die Chagas-Krankheit scheinen die IL-2- und IFN- γ -sezernierenden T_H1-Subpopulationen von T-Helfer-Zellen zu spielen (Nickell *et al.*, 1993), deren protektive Kapazität auf der IFN- γ -vermittelten Aktivierung von Makrophagen und der Hilfe für Antikörper-produzierende B-Zellen beruht.

Die Infektion mit *T. cruzi* wird anfangs von einer starken Aktivierung des Immunsystems begleitet, doch selbst wenn alle der potentiellen Immun-Effektoren des

infizierten Wirtes aktiviert werden, erfolgt eine vollständige Befreiung vom Parasiten selten oder nie (Tarleton, 2001). Das Versagen der Wirts-Immunabwehr ist wahrscheinlich auf Immun-supprimierende Aktivitäten der Trypanosomen zurückzuführen. Um über die gesamte Lebensspanne des Wirtes in dessen Geweben persistieren zu können, haben die Trypanosomen neben der Verminderung ihrer extrazellulären Exposition (durch eine Replikation innerhalb von Zellen) diverse effiziente Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen. *T. cruzi* gehört damit zu den erfolgreichsten der intrazellulären Parasiten überhaupt (Reed, 1998). Beispielsweise induziert der Parasit (wahrscheinlich u.a. aufgrund LPS-ähnlicher Substanzen) *in vivo* eine polyklonale Lymphozytenaktivierung, die alle peripheren lymphoiden Zellpopulationen betrifft (Minoprio *et al.*, 1989).

Paradoxerweise zeigen T-Zellen, die in der akuten Phase der Infektion isoliert werden, jedoch eine stark reduzierte Reaktivität gegenüber (Parasiten-) Antigenen und polyklonalen Aktivatoren (Abrahamsohn und Coffman, 1995). Diese funktionelle Defizienz scheint an der Fähigkeit des Parasiten, der Immunantwort zu entkommen und im Wirt persistieren zu können, beteiligt zu sein (Kierszenbaum, 1981). Die molekularen Grundlagen der starken Suppression der zellulären Immunantwort sind trotz zahlreicher Studien noch nicht vollständig geklärt. Es wurden verschiedenste Mechanismen vorgeschlagen, die von der Sezernierung suppressiver Mediatoren durch aktivierte Makrophagen bis hin zum programmierten Zelltod reichen, der durch TCR-CD3-Aktivierung ausgelöst wird (Abrahamsohn und Coffman, 1995; Harel-Bellan *et al.*, 1985; Lopes und DosReis, 1996). Neben einer Verwicklung suppressiver Zellpopulationen (T-Zellen, NK-Zellen oder Makrophagen) in das Phänomen der Immunsuppression bei der Chagas-Krankheit (Goni *et al.*, 2002), wurden auch einige Moleküle charakterisiert, die von *T. cruzi* selber stammen und die Synthese proinflammatorischer Zytokine sowie Chemokine durch Wirtszellen stimulieren. Darunter Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Glykoproteine von Trypomastigoten, kurz *tGPI mucins*, und DNA (Almeida und Gazzinelli, 2001; Shoda *et al.*, 2001). Des weiteren wurde gezeigt, dass von *T. cruzi* sezernierte Faktoren dazu fähig sind, unmittelbar eine Vielzahl immunologischer Funktionen zu beeinflussen. Zu diesen zählen u.a. ein „B-Zell-Aktivator-Antigen“ namens *Tc24* und ein immunsuppressives Protein mit der Bezeichnung *Tc52* (Ouaissi *et al.*, 2001). Außerdem wurden als Pathogenitätsfaktoren das *T. cruzi* -Antigen SAPA (Shed acute phase antigen) mit Neuraminidase-*trans*-Sialidase-Aktivität beschrieben, welches infolge T-Suppressor/zytotoxischer T-Zell-Aktivierung u. Sezernierung der immunregulatorischen Substanz Prostaglandin E2 die Proliferation von T-Lymphozyten hemmt (Guevara *et al.*, 2000), und das *T. cruzi* -Membranglykoprotein AGC10, welches bei Subpopulationen aktivierter

T-Lymphozyten die Biosynthese von IL-2 und IL-2-Rezeptor-Molekülen unterdrückt (Kierszenbaum *et al.*, 1999 und 2002).

1.2.8 Parasiten-spezifische Immunität *versus* Autoimmunität

Die pathologische Basis der chronischen Chagas-Krankheit, vor allem der chronischen Chagas-Kardiomyopathie, wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv diskutiert. Dass diese durch immunologische Mechanismen vermittelt wird, konnte anhand von Experimenten mit Nacktmäusen eindeutig demonstriert werden. Bei einer Infektion mit *T. cruzi* weisen diese Mäuse, die aufgrund einer als *nude* bezeichneten Mutation keine reifen T-Zellen besitzen, zwar extrem hohe Parasitenlasten im Gewebe auf, entwickeln jedoch keine Herz-Entzündungen (Soares *et al.*, 2001). Bezüglich der Spezifität der pathogenen Immunantwort in der *T. cruzi* -Infektion gibt es kontroverse Ansichten.

Die Hypothese der Parasiten-Persistenz schlägt diesbezüglich vor, dass die pathogene, inflammatorische Antwort ausschließlich gegen *T. cruzi* -Antigene von persistierenden Parasiten gerichtet ist (Higuchi *et al.*, 1997; Tarleton, 2001). Die Autoimmunitäts-Hypothese besagt, dass es sich zumindest bei der chronischen Chagas-Kardiomyopathie um eine Autoimmunkrankheit handelt, die bei einigen Individuen durch die *T. cruzi* -Infektion ausgelöst wird (Cunha-Neto und Kalil, 1995; Leon und Engman, 2001). In erster Linie hatte die Tatsache, dass bei der chronischen Chagas-Kardiomyopathie histologisch keine oder nur sehr wenige Trypanosomen nachweisbar waren, zu der Annahme geführt, dass Autoimmunvorgänge durch Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen beteiligt sein könnten. Diese könnten dabei aufgrund einer molekularen Mimikry zwischen Parasiten- und Wirts-Antigenen entstehen. Inzwischen konnten während *T. cruzi* -Infektionen tatsächlich Antikörper gegen eine Vielzahl von Selbst-Antigenen nachgewiesen werden, so z.B. von Antigenen, die in Herz- (McCormick und Rowland, 1989; Cunha-Neto *et al.*, 1995) und Nervengeweben (Ribeiro dos Santos *et al.*, 1979; Van Voorhis und Eisen, 1989) exprimiert werden. Kreuzreagierende Antikörper zwischen ribosomalen Proteinen von *T. cruzi* und dem β -adrenergen sowie dem Muscarin-Rezeptor wurden entdeckt (Masuda *et al.*, 1998; Lopez Bergami *et al.*, 2001). Außerdem wurden autoreaktive T-Lymphozyten mit Spezifitäten für Herz- oder Nervengewebs-Antigene in an Chagas erkrankten Mäusen sowie Menschen gefunden (Rizzo *et al.*, 1989; Cunha-Neto *et al.*, 1996). Im Laufe einer *T. cruzi* -Infektion aktivierte autoreaktive T-Zellen sind hinreichend für die Induktion einer Myokarditis in nicht-infizierten Mäusen, wie der adoptive Transfer von T-Zellen aus Milzen chronisch infizierter Mäuse in nicht-infizierte Rezipienten belegen konnte (Girones *et al.*, 2001).

Schließlich verhindert die Induktion immunologischer Toleranz gegenüber Antigenen des Myokards eine experimentelle chronische Chagas-Myokarditis (Pontes-de-Carvalho *et al.*, 2002), was die Hypothese eines Autoimmun-vermittelten Pathogenitäts-Mechanismus unterstützt.

Andererseits wurde inzwischen mittels verschiedenster Methoden (Immunhistochemie, Standard-PCR und *in situ*-PCR) demonstriert, dass auch bei chronischer Chagas-Krankheit Trypanosomen bzw. *T. cruzi*-Antigene in den erkrankten Geweben von Nagetieren und Menschen vorhanden sind (Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1988; Higuchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1993; Bellotti *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 1997; Vago *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1997; Palomino *et al.*, 2000), was für die Hypothese der Parasiten-Persistenz spricht. Zudem belegen Studien, dass die anti-parasitäre Chemotherapie neben der Reduktion der Parasitenlast auch die klinischen Symptome im Menschen vermindert (Viotti *et al.*, 1994; Tarleton, 2001; Cancado, 2002). Daher wird angenommen, dass für die Progredienz von Gewebeschäden bzw. eines Herzmuskel-schadens die Anwesenheit von Parasiten erforderlich ist, obwohl eine klare Assoziation zwischen dem Grad des Gewebefalls und der Intensität der inflammatorischen Antwort nicht belegt werden konnte. In einigen Maus-Modellen scheinen die Parasiten-spezifischen Immunantworten die einzige Ursache für eine Chagas-Kardiomyopathie zu sein (Tarleton *et al.*, 1997), während das in anderen Maus-Modellen (Buckner *et al.*, 1999) und dem Menschen (Mortara *et al.*, 1999) nicht der Fall zu sein scheint. Möglicherweise sind die beiden beschriebenen Hypothesen miteinander vereinbar, und sowohl Parasiten-spezifische Immunantworten als auch Autoimmun-Vorgänge spielen eine Rolle in der Pathologie der Chagas-Krankheit. Persistierende Parasiten könnten Effektorzellen aktivieren, die entweder gegen Selbstantigene oder gegen Parasiten-antigene gerichtet sind (Girones und Fresno, 2003).

Während der chronischen Phase der Chagas-Krankheit kann eine Immunsuppression die Infektion „reaktivieren“. Dies wird vor allem in Fällen einer immunsuppressiven Therapie zur Vermeidung einer Transplantat-Abstoßung (Jardim und Takayanagui, 1994; Almeida *et al.*, 1996) und bei AIDS-Patienten (Ferreira *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 1994; Sartori *et al.*, 1995) deutlich und kann als ein weiteres Indiz für eine langjährige Persistenz von *T. cruzi* im Menschen gedeutet werden.

Die meisten Erkenntnisse bezüglich Infektionen mit *T. cruzi* wurden mit Hilfe von Experimenten an Mäusen gewonnen. Das Maus-Modell ist sehr geeignet, weil für die Untersuchung der Chagas-Krankheit Mäuse mit denselben Parasiten infiziert werden können, die auch die humane Erkrankung hervorrufen. Zudem tritt auch bei Mäusen

eine akute Phase mit hoher Parasitämie im Blut sowie eine chronische Phase der Infektion auf (Reed, 1998). Dabei ist die Ausprägung der Krankheit sowohl von dem verwendeten Trypanosomen- als auch Mausstamm abhängig (Andrade *et al.*, 1985). Suszeptible BALB/c-Mäuse beispielsweise entwickeln bei Infektion mit dem Tulahuén-Stamm von *T. cruzi* eine extrem hohe Parasitämie in der akuten Phase, die z. T. schon vor Eintritt in die chronische Phase zum Tod führt (Tanowitz *et al.*, 1981; Andrade *et al.*, 1985).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Während der Infektion mit *T. cruzi* kommt es sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen zu einer Immunsuppression, die eine Bekämpfung des Parasiten und anderer, in den Körper eindringender Pathogene beeinträchtigt. Diese Immunsuppression ist dadurch gekennzeichnet, dass Immunantworten gegen Mitogene sowie Parasiten-spezifische und Parasiten-unspezifische Antigene unterdrückt werden (Kierszenbaum, 1982; Cetron *et al.*, 1993). Sie wird für die Disseminierung und Persistenz des Parasiten im infizierten Wirt, die zur Pathologie der chronischen Chagas-Krankheit führen kann, verantwortlich gemacht (Goni *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Immunantwort gegen intrazelluläre Trypanosomen untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob sich ruhende T-Zellen von *T. cruzi*-infizierten Antigen-präsentierenden Zellen stimulieren lassen, und auf welche Weise eine Infektion die nachfolgende T-Zell-Antwort beeinflusst. Im Falle einer beeinträchtigten T-Zell-Antwort sollte untersucht werden, welche Mechanismen an der Vermittlung suppressiver Effekte beteiligt sein könnten. Zu diesem Zweck sollten die in anderen Infektionsmodellen beschriebenen immunsuppressiven Mechanismen untersucht werden.

Zunächst sollte ein *in vitro*-System entwickelt werden, um die Einflüsse einer *T. cruzi*-Infektion auf die nachfolgende Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen. In diesem sollten Makrophagen nach Infektion als Antigen-präsentierende Zellen für die Stimulation von T-Zellen, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor mit definierter Spezifität für Ovalbumin-Peptide tragen, eingesetzt werden. Dabei sollte dann die Antigen-spezifische Stimulation der Zellen näher betrachtet werden. Es sollte untersucht werden, ob die beteiligten Immunzellen die Sekretionsmuster von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ändern. Im Vordergrund sollte schließlich die Charakterisierung der molekularen Mechanismen stehen, die zu einer veränderten Interaktion zwischen infizierten APC und den durch sie stimulierten T-Zellen führen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lebende Organismen und Zell-Linien

Tab. 2.1: Mausstämme

Die verwendeten Mäuse wurden im hauseigenen Tierstall gezüchtet. Sie wurden im Alter von 6-10 Wochen für Experimente eingesetzt.

Maus-Stamm	MHC-Haplotyp, Eigenschaften	Referenz, Herkunft
BALB/c	H-2 ^d	BNI, Hamburg
C57BL/6	H-2 ^b	BNI, Hamburg
BALB/c IL-12 p40 ^{-/-}	H-2 ^d ; Mäuse, die defizient für die Produktion von IL-12 p40 sind	BNI, Hamburg; Magram <i>et al.</i> (1996)
C57BL/6 TLR-2 ^{-/-}	H-2 ^b ; Mäuse, die defizient für die Expression des Toll-Rezeptors TLR-2 sind	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Hölscher, Borstel; Takeuchi <i>et al.</i> (1999)
DO11.10	H-2 ^d ; T-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse, deren TCR einen Komplex aus I-A ^d und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden 17er-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ erkennt	BNI, Hamburg; ursprünglich zur Verfügung gestellt von D. Loh, USA; Hosken <i>et al.</i> (1995)
OT-1	H-2 ^b ; T-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse, deren TCR einen Komplex aus H2-K ^b und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden 8er-Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ erkennt	BNI, Hamburg; ursprünglich zur Verfügung gestellt von P. Knolle, Heidelberg; Hogquist <i>et al.</i> (1994)

Tab. 2.2: Trypanosomen

Die Parasiten wurden am BNI kultiviert und zur Aufrechterhaltung der Virulenz in männlichen BALB/c-Mäusen passagiert.

Stamm	Beschreibung, Herkunft
<i>Trypanosoma cruzi</i> Tulahuén	pathogener Stamm von <i>Trypanosoma cruzi</i> ; Weltgesundheitsorganisations-Referenz-Stamm M/HOM/CH/00/Tulahuén C2; ursprünglich zur Verfügung gestellt von H. Mossmann, Freiburg

Tab. 2.3: Zell-Linien

Die Zell-Linien waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden ursprünglich über die ATCC bezogen.

Zell-Linie	Beschreibung, Herkunft
DO11.10	murines T-Zell-Hybridom, dessen TCR einen Komplex aus I-A ^d und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden 17er-Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ erkennt; Kappler <i>et al.</i> (1981)
86HG39	humane Glioblastom-Zell-Linie; Bilzer <i>et al.</i> (1991)
L929	murine Fibroblasten-Zell-Linie; Sanford <i>et al.</i> (1948)
RT2.3 HD6	I-A ^d transfizierte murine Fibroblasten-Zell-Linie; Lechler <i>et al.</i> (1985)

2.1.2 Peptide

Tab. 2.4: Peptide

Alle Peptide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt und HPLC-gereinigt bezogen.

Bezeichnung	AS-Sequenz	Protein	Präsentation in
OVAp	ISQAVHAAHAEINEAGR	OVA ₃₂₃₋₃₃₉	H2-A ^d
OVAp	SIINFEKL	OVA ₂₅₇₋₂₆₄	H2-K ^b

2.1.3 Antiseren und Antikörper

Tab. 2.5: Antikörper für ELISA

Bezeichnung (Klon)	Referenz, Herkunft
Ratte anti-Maus IFN- γ (R4-6A2)	PharMingen, BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus IFN- γ (XMG1.2)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-2 (JES6-1A12)	PharMingen, BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus IL-2 (JES6-5H4)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-10 (JES5-2A5)	PharMingen, BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus IL-10 (SXC-1)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70 (C15.6)	PharMingen, BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70 (C17.8)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus TGF- β 1 (A75-2.1)	PharMingen, BD, Hamburg
Biotin Ratte anti-Maus TGF- β 1 (A75-3.1)	PharMingen, BD, Hamburg

Tab. 2.6: Antikörper und Fusionsproteine für Blockade-Experimente

Die Antikörper für *in vitro*-Blockaden wurden entweder am Institut als Überstände von Hybridoma-Zellen gewonnen oder in *NA/LE* (No Azide, Low Endotoxin)-Qualität bezogen, d.h. ohne Azid, um die Zellen in Kultur nicht zu schädigen.

Bezeichnung (Klon)	Referenz, Herkunft
Ratte anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor; 2.4G2)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus CD43 (S7)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus CD86 (B7-2; GL1)	PharMingen, BD, Hamburg
Hamster anti-Maus CTLA-4 (UC10-4F10-Überstand)	BNI, Hamburg
Fab-Fragment von anti-Maus CTLA-4	BNI, Hamburg
Ratte anti-Maus IFN- γ (XMG1.2-Überstand)	BNI, Hamburg
Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70 (C15.6)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus TGF- β 1 (A75-2.1)	PharMingen, BD, Hamburg
Kontroll-Hamster IgG1, κ (A19-3)	PharMingen, BD, Hamburg
Kontroll-Ratte IgG1 (R3-34)	PharMingen, BD, Hamburg
CTLA-4 Ig (Fusionsmolekül aus dem extrazellulären Anteil des humanen CTLA-4 und dem Fc-Teil eines humanen IgG-Antikörpers)	BNI, Hamburg
CD83-Ig (Fusionsmolekül aus dem extrazellulären Anteil des murinen CD83-Moleküls und dem Fc-Teil eines humanen IgG-Antikörpers)	BNI, Hamburg

Tab. 2.7: Antikörper für Immunfluoreszenzen und FACS-Analysen

Bezeichnung (Klon)	Referenz, Herkunft
anti- <i>T. cruzi</i> -Kaninchenserum	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Medizinischen Zentraldiagnostik des BNI, Hamburg
Ratte anti-Maus CD4-FITC (CT-CD4, RM4-5)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD4-PE (CT-CD4, RM4-5)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD8-FITC (CT-CD8a)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD8-PE (CT-CD8a)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD11b-FITC (M1/70.15)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD11b-PE (M1/70.15)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Hamster anti-Maus CD11c-PE (HL3)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus CD25-PE (PC61 5.3)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Maus anti-Maus CD32/16 Fc gamma II/III (Ly-17.1, 17.2)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD45R (B220)-PE (RA3-6B2)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Ratte anti-Maus CD80 (B7-1; 1G10)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus CD86 (B7-2; GL1)	PharMingen, BD, Hamburg
Maus anti-Maus DO11-10 TCR-FITC (KJ1-26)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Maus anti-Maus DO11-10 TCR-PE (KJ1-26)	CALTAG, Burlingame, CA, USA
Maus anti-Maus H-2K ^d -FITC (SF1-1.1)	PharMingen, BD, Hamburg
Maus anti-Maus H-2K ^b -FITC (AF6-88.5)	PharMingen, BD, Hamburg
Ratte anti-Maus MHC II I-A ^{b/d/q} / I-E ^{d/k} (M5/114.15.2-Überstand)	BNI, Hamburg
Maus anti-Maus I-E ^k -FITC (14-4-4S)	PharMingen, BD, Hamburg
Maus anti-Maus Vβ 5.1, 5.2 TCR-FITC (MR9-4)	PharMingen, BD, Hamburg
Maus anti-Kaninchen IgG-TRITC	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
Ziege anti-Ratte IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgG-PE	Dianova, Hamburg

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Verwendete Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen, sofern dies nicht anders vermerkt ist.

Tab. 2.8: Reagenzien mit Bezugsquelle

Die Bezugsquellen hier nicht aufgeführter spezieller Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden vermerkt.

Reagens	Hersteller	Reagens	Hersteller
Anti-Fade-Lösung	BiomedDia, Zweibrücken	murines IL-10 (rekombinant)	PharMingen, BD, Hamburg
BSA	Serva Feinbiochemika, Heidelberg	murines IL-12 (rekombinant)	PharMingen, BD, Hamburg
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	murines IFN- γ (rekombinant)	PharMingen, BD, Hamburg
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	murines TGF- β 1 (rekombinant)	PharMingen, BD, Hamburg
Cohn-II (humane gamma-Globuline)	Sigma, Deisenhofen	Nylonwolle	Biotest, Dreieich
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Pferdeserum	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, St. Louis, USA	Pristane (2,6,10,14- Tetramethylpentadecan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich	RPMI 1640 ohne L- Glutamin	PAA, Linz, Österreich
³ H-Thymidin [1 mCi/ml]	Amersham, Buckinghamshire, UK	Szintillationsflüssigkeit für β -Counter	Roth, Karlsruhe
Iscove's Medium	PAA, Linz, Österreich	Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laufmittel für FACS	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA	Trypanblau	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
L-Glutamin (100x)	PAA, Linz, Österreich	Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Paisley, UK
murines GM-CSF (rekombinant)	Biomol, Hamburg	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
murines IL-2 (rekombinant)	PharMingen, BD, Hamburg	Wachsstift	DAKO, Glostrup, Dänemark

2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min), während hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert wurden (Porengröße 0,2 µm).

Fötales Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 30 min auf 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Beschichtungs-Puffer für ELISA	Lösung I	10 mM Na ₂ CO ₃
	Lösung II	20 mM NaHCO ₃
	Zu 70 ml Lösung I wird soviel Lösung II gegeben, bis pH 9,6 erreicht ist	
Cohn-II-Stammlösung	10 mg/ml in 1 x PBS	
Einfriermedium	FCS	50 % (v/v)
	RPMI 10 % FCS	40 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
Erythrozyten-Lysis-Puffer	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)	10 % (v/v)
	0,158 M Ammoniumchloridlösung	90 % (v/v)
FACS-Puffer	FCS	25 ml (Endkonz. 2,5 % [v/v])
	NaN ₃	1 g (Endkonz. 0,1 % [w/v])
	ad 1 l 1 x PBS	
Grieß I	Sulfonamid	0,5 g (Endkonz. 1 % [w/v])
	H ₃ PO ₄	1,25 ml (Endkonz. 2,5 % [v/v])
	ad 50 ml H ₂ O dest.	
Grieß II	Naphtylethylendiamin-Dihydrochlorid	0,05 g (Endkonz. 0,1 % [w/v])
	H ₃ PO ₄	1,25 ml (Endkonz. 2,5 % [v/v])
	ad 50 ml H ₂ O dest.	
Knochenmarks-Mφ-Medium	Iscove's Medium	500 ml
	L929-Überstand	150 ml
	FCS	50 ml
	Pferdeserum	25 ml
Komplettes RPMI-Medium	RPMI 1640	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamin 200 mM	5 ml
	Gentamycin [10 mg/ml]	2,5 ml

MACS-Puffer	BSA EDTA in 1 x PBS	0,5 % (w/v) 2 mM
PBS (20 x)	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O NaCl ad 1 l H ₂ O dest. ergibt für 1 x PBS dann pH 7,2	32 g 5,3 g 164 g
PBS-Tween für ELISA	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1 x PBS	
Stopp-Puffer für ELISA	2 M H ₂ SO ₄	
Substrat-Puffer für ELISA	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O NaOH konz. ad 1 l H ₂ O dest.	13,8 g (Endkonz. 100 mM) bis pH 5,5
Substratlösung für ELISA	TMB-Lösung H ₂ O ₂ , 30 % in Substrat-Puffer	1:60 1:10.000
TMB-Lösung	Tetramethylbenzidin (TMB) DMSO	60 mg 10 ml
Trypanblau-Stammlösung	2 mg in 100 ml 1 x PBS	
Trypsin/EDTA	Trypsin EDTA in 1 x PBS	0,25 % (w/v) 1 mM

2.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 2.9: Geräte und Hilfsmittel mit Bezugsquelle

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
β-Szintillationszähler, 1450 MicroBeta TriLux Liquid Scintillation & Luminescence Counter“	EG & G Wallac, Turku, Finnland
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Digitalwaage	Kern & Söhne, Albstadt
ELISA-Reader „Lambda E“	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
FACS Sorter FACSCalibur	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
Filter Top-Flaschen (50 ml, 25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekultur-Einsätze (8-Loch-Streifen, 0,2 µm Anopore-Membran)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Gewebekulturflaschen (10, 30 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Heizblock „Thermomixer 5436“	Eppendorf, Hamburg
Kanülen	Braun, Melsungen
Kippschüttler „DUOMAX 2030“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Lab-Tek Chamber Slides (8-, 16-Loch, Glas)	Nunc, Roskilde, Dänemark
MACS Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS-Säulen (MACS Separation Columns MS, LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Separator (mit MiniMACS und MidiMACS Separations-Einheiten)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer „IKAMAG RCT“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten „Research pro“	Eppendorf, Hamburg
Mehrwegehahn Discifix	Braun, Melsungen
MICROLON-ELISA-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskop „Wilovert“	Hund, Wetzlar
Mischgerät (Vortexer) „MS 1 Minishaker“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Multipipetten „Research pro“	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen, beschichtet	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen, unbeschichtet	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
pH-Meter „WTW pH 537“	Labotec, Wiesbaden

Bezeichnung	Hersteller
Photomikroskop „Axioskop 2plus“ mit digitaler Kameraanlage	Carl Zeiss, Oberkochen; Kamera: Hamamatsu; Software „Openlab“, Improvision, Coventry, UK
Pipetten	Gilson Medical Electronics, Frankreich; Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich; Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe „pipetus-akku“	Hirschmann, Eberstadt
Plastikpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterile Arbeitsbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Wasserbad „Thermomix MM“	Braun, Melsungen
Wasserdeionisierungsanlage „SG Clear“	SG Wasseraufbereitung u Regenerierstation GmbH, Bremen
Zählkammer nach Neubauer (0,1 x 0,0025 mm ²)	Brandt, Melsungen
Zellerntegerät „INOTECH Zellharvester-System“	INOTECH AG, Dottikon, Schweiz
Zentrifugenröhrchen, Spitzboden (15, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
<u>Zentrifugen:</u>	
- Cytospin-Zentrifuge „Cytospin 3“	Shandon-Life Sciences International GmbH, Frankfurt
- Tisch-/Mikrozentrifuge „Centrifuge 5415 C“	Eppendorf, Hamburg
- Heraeus „Megafuge 1.0“, „Megafuge 1.0 R“, „Omnifuge 2.0 RS“	Heraeus-Sepatech, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellpräparation und Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten 5 %igen CO₂-Atmosphäre (CO₂-Brutschränke) in komplettem RPMI-Medium kultiviert. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden Zell-Linien alle 3-4 Tage mit frischem Medium verdünnt (1:5 bis 1:20).

Adhärenz wachsende Zellen wie 86HG39 wurden passagiert, nachdem sie in ein konfluentes Wachstumsstadium eingetreten waren. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes ablösen ließen. Der enzymatische Verdau wurde durch die Serumbestandteile frischen Mediums abgestoppt, und die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Medium aufgenommen, die Zellen verdünnt und auf einer größeren Oberfläche ausgesät.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt.

Labormaterialien aus Kunststoff sowie hitzeunempfindliche Lösungen wurden autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min), während hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert wurden (Porengröße 0,2 µm). Die Sterilisierung von Glasgeräten erfolgte 3 Stunden lang bei 180 °C.

Die Sedimentierung eukaryotischer Zellen wurde grundsätzlich durch Zentrifugation bei 1.200 rpm für fünf Minuten (Megafuge 1.0 R) erreicht.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung können eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden. Dafür ist der Zusatz von stark hygroskopischem Dimethylsulfoxid (DMSO) notwendig, das den Zellen Wasser entzieht und so die Bildung von Eiskristallen im Zellinnern verhindert.

Zum Einfrieren wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen pelletiert und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Sie wurden in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und zunächst langsam auf -70 °C abgekühlt, bevor sie schließlich 24 Stunden später in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, müssen sie schnell aufgetaut und sofort mit Medium gewaschen werden, damit das toxische DMSO entfernt wird.

2.2.1.3 Zellzählung

Die Zahl lebender Zellen wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlußtests bestimmt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff Trypanblau aktiv aus und sind so von toten Zellen, bei denen der Farbstoff ins Zellinnere eindringt, zu unterscheiden.

Ein Aliquot einer Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.1.4 Präparation von Milzzellen

Die Milz einer sechs bis zehn Wochen alten Maus wurde steril herauspräpariert und die Milzzellen mit Hilfe einer Spritze und 0,4 µm-Kanüle mit 5 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer herausgespült. Nach vollständiger Lyse der Erythrozyten wurde die Zellsuspension mit Medium vermischt und zur weiteren Verwendung der Zellen dreimal gewaschen.

2.2.1.5 Präparation von peritonealen Exsudat-Zellen (PEC)

Fünf Tage vor der Isolierung von PEC wurden einer sechs bis acht Wochen alten Maus 500 µl Pristane intraperitoneal injiziert, um die Einwanderung von Immunzellen - vor allem Makrophagen - in den Bauchraum (Peritoneum) des Tieres zu induzieren.

Das Peritoneum der Pristane-behandelten Maus wurde mit 20-25 ml eiskaltem Medium gespült. Die dabei gewonnenen Zellen wurden pelletiert und bei Bedarf durch hypotonische Lyse von Erythrozyten befreit (2 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer, RT, 3 min). Die Zellen wurden gewaschen, gezählt und am gleichen Tag verwendet.

Die Präparation von PEC aus einem Pristane-behandelten Tier führte zu einer Ausbeute von bis zu 1×10^7 Zellen. Diese enthalten typischerweise 90 % CD11b⁺ Zellen (Makrophagen; Daten nicht gezeigt).

Für Experimente mit PEC aus *in vivo* -Infektionen wurden die Mäuse nicht mit Pristane vorbehandelt. In diesen Fällen wurde eine Ausbeute von zirka 1×10^6 Zellen pro Maus erzielt.

2.2.1.6 Generierung von Knochenmarks-Makrophagen

Zur Präparation von Makrophagen aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia einer 6-8 Wochen alten Maus steril herauspräpariert. Die Knochenmarkszellen wurden mit Hilfe einer Spritze und 0,6 µm-Kanüle mit reinem RPMI-Medium herausgespült, pelletiert und gezählt. 0,25 bis 1×10^6 Zellen pro Milliliter wurden in Knochenmarks-Makrophagen-Medium aufgenommen und zur Kultivierung auf unbeschichtete 6-Loch-

Gewebekulturplatten (2 ml/Loch) oder Petrischalen (10 ml/Schale) verteilt. An jedem zweiten oder dritten Kulturtag wurde das Medium gewechselt. Zwischen dem 8. und 12. Tag nach der Präparation wurden die Knochenmarks-Makrophagen verwendet.

2.2.1.7 Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (bmDC)

Die Gewinnung dendritischer Zellen erfolgte nach der Methode von Lutz *et al.* (1999) aus Knochenmark-Progenitorzellen.

Dazu wurden Femur und Tibia einer sechs bis acht Wochen alten Maus steril herauspräpariert. Mit Hilfe einer Spritze und 0,6 µm-Kanüle wurden die Knochenmarkszellen mit Medium herausgespült. Von den isolierten Knochenmarkszellen wurden 2×10^6 in 10 ml Medium mit 20 ng/ml murinem GM-CSF (200 U) in unbeschichteten Petrischalen kultiviert. An Tag 3 wurden 10 ml Medium mit 20 ng/ml GM-CSF dazugegeben, an Tag 6 und 8 jeweils 10 ml des Mediums (mit 20 ng/ml GM-CSF) erneuert. Die DC wurden zwischen Tag 6 und 8 verwendet.

2.2.1.8 Präparation von T-Zellen über Nylonwolle

Für die Anreicherung von T-Zellen aus einer Milzzellsuspension mit Hilfe dieser Methode wurden die unterschiedlichen Eigenschaften von T-Zellen, B-Zellen und APC bezüglich ihrer Adhärenz ausgenutzt. Dabei wurde als Säulen-Matrix Nylonwolle eingesetzt, an der nur B-Zellen und Granulozyten adhärieren, nicht aber T-Zellen.

Für die praktische Durchführung wurde eine 10 ml-Spritze mit 1 g Nylonwolle gestopft und autoklaviert. Die autoklavierte Säule wurde mit 50 ml Medium equilibriert und für mindestens 1,5 Std. bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden Milzzellen präpariert (2.2.1.4), maximal $1,5 \times 10^8$ Zellen in 2 ml 37 °C warmen Mediums aufgenommen und schließlich auf die equilibrierte Säule gegeben. Nach Zugabe der Zellsuspension wurde die Säule mit 500 µl warmem Medium nachgespült, geschlossen und schließlich mit 3 ml warmem Medium bedeckt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die T-Zellen mit 15 ml warmen Mediums von der Säule eluiert, während B-Zellen und andere APC an der Nylonwolle haften blieben. Die Zellen wurden gezählt und sofort weiter verwendet. Die mit dieser Methode angereicherten Zellen enthielten typischerweise 60-80 % $\alpha\beta$ -TCR⁺ Zellen.

Bei einigen Präparationen wurden die Gesamtmilzzellen für ein- bis zwei Stunden in 30 ml-Gewebekulturflaschen im Brutschrank inkubiert, bevor sie auf die Nylonwolle-

Säule gegeben wurden. Während dieser Inkubation konnten dann bereits Makrophagen und ein Teil der B-Zellen an das Plastik der Gewebekulturflaschen adhären. Dadurch, dass anschließend nur die nicht-adhären Zellen entnommen und weiter über Nylonwolle-Säulen aufgereinigt wurden, konnte der Anteil an T-Zellen in der Präparation noch etwas erhöht werden

2.2.1.9 Negative Selektion von CD4- und CD8-Lymphozyten

Eine gezielte Isolierung von CD4- bzw. CD8-Lymphozyten aus Gesamtmilzzellen erfolgte mit Hilfe des *CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Cell Isolation Kit* der Firma Miltenyi Biotec durch Depletion aller anderen vorhandenen Zellpopulationen. CD4⁻ bzw. CD8⁻ Zellen wie B-Zellen, NK-Zellen, DC, Makrophagen und Granulozyten werden bei dieser Methode indirekt magnetisch markiert. Dies geschieht mit einer Mischung Biotin-konjugierter Antikörper als erstem Markierungs-Reagenz, die in einem zweiten Schritt mit an Magnetpartikel gekoppelten anti-Biotin mAK inkubiert werden. Die auf diese Weise magnetisch markierten CD4⁻ bzw. CD8⁻ Zellen werden auf einer sog. MACS-Säule in dem Magnetfeld des entsprechenden MACS-Separators zurückgehalten, während die nicht markierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen die Säule passieren. Mit dieser Methode wird eine sehr hohe Reinheit der gewünschten Zellen von bis zu 98 % erreicht.

Für die praktische Durchführung wurden Milzzellen (2.2.1.4) mit MACS-Puffer gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 40 µl Puffer pro 10⁷ Gesamtzellen aufgenommen, mit 10 µl Biotin-AK-Cocktail pro 10⁷ Gesamtzellen versetzt, durchmischt und für 10 min bei 4 °C (Kühlschrank) inkubiert. Danach wurden 30 µl Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads pro 10⁷ Gesamtzellen zugegeben, vermischt und für weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen nach Zugabe von 10 ml Puffer bei 1.200 rpm und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0 R) und das entstehende Pellet in 1 ml Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde schließlich durch einen *Pre-Separation Filter* (zur Vereinzelung der Zellen) auf eine im Magnetfeld eines MACS-Separators platzierte MACS-Säule entsprechender Bindungs-Kapazität gegeben, die zuvor mit Puffer equilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer gespült und dabei das Eluat mit den gewünschten T-Zellen aufgefangen. Die Zellen wurden gezählt und sofort weiter verwendet.

2.2.1.10 Positive Selektion von CD90-Lymphozyten

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von T-Lymphozyten aus Gesamtmilzzellen bestand in der Anreicherung von CD90⁺ Zellen mit Hilfe von Magnetpartikel-markierten Antikörpern (CD90 MicroBeads, Miltenyi Biotec). CD90 (Thy1.2) wird auf den Thymozyten, peripheren T-Zellen und einigen interepithelialen T-Zellen der meisten Mausstämme exprimiert. CD90⁺ Zellen werden bei dieser Methode direkt mit an Magnetpartikel gekoppelten anti-CD90 mAK magnetisch markiert. Die auf diese Weise markierten CD90⁺ Zellen werden auf einer sog. MACS-Säule in dem Magnetfeld des entsprechenden MACS-Separators zurückgehalten, während die nicht markierten CD90⁻ Zellen die Säule passieren. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die darin zurückgehaltenen CD90⁺ Zellen eluiert werden. Die praktische Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.11 Depletion von CD11b-positiven Zellen

Um nach einer Anreicherung von T-Zellen über Nylonwolle-Säulen die T-Zell-Fraktion noch gründlicher von Makrophagen und Monozyten zu befreien, wurden in einigen Fällen CD11b-positive Zellen depletiert. Dies geschah mit Hilfe von Magnetpartikel-markierten Antikörpern (CD11b MicroBeads, Miltenyi Biotec). CD11b (Mac-1) wird auf Makrophagen/Monozyten und in geringerem Ausmaß auf Granulozyten und NK-Zellen exprimiert. Ferner weisen Untergruppen dendritischer Zellen CD11b auf. CD11b⁺ Zellen werden - analog zu der zuvor beschriebenen Methode - direkt mit an Magnetpartikel gekoppelten anti-CD11b mAK magnetisch markiert. Die auf diese Weise markierten CD11b⁺ Zellen werden auf einer sog. MACS-Säule in dem Magnetfeld des entsprechenden MACS-Separators zurückgehalten, während die nicht markierten CD11b⁻ Zellen die Säule passieren. Die praktische Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers und die von CD11b⁺ Zellen befreiten T-Zellen konnten direkt in Experimenten eingesetzt werden.

2.2.1.12 Bestimmung der Zellproliferation (Proliferationstest)

Die Analyse der Proliferation von Zellen kann durch Messung des Einbaus von radioaktivem Thymidin erfolgen. Das Prinzip beruht hierbei darauf, dass jede wachsende und sich teilende Zelle DNA synthetisiert und den Zellen mit radioaktivem Thymidin (³H-Thymidin) ein Baustein der DNA (Nukleotid) als radioaktiv markierte

Substanz zur Verfügung gestellt wird. Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität kann dabei als Maß für die Proliferation der untersuchten Zellen herangezogen werden.

Für die praktische Durchführung wurde der Überstand von in 96-Loch-Gewebekulturplatten kultivierten Zellen bis auf ein Restvolumen von 50 µl abgenommen. Anschließend wurden 50 µl frisches Medium sowie 20 µl ^3H -Thymidin-haltiges Medium [0,01 mCi/ml] zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 0,2 µCi ^3H -Thymidin pro Ansatz ergab. Als Negativkontrollen dienten Triplikate mit 50 µl Medium, die keine Zellen enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde die Proliferation der Zellen durch Einfrieren (-20 °C) der Gewebekulturplatte gestoppt. Zur Auswertung des Thymidin-Einbaus wurden die Zellen mit Hilfe eines automatischen Zellerntegeräts geerntet, wobei sie mit Aqua dest. lysiert und durch einen Glasfaserfilter gesaugt wurden. Das Filterpapier, in dem die DNA der Zellen zurückblieb, wurde in einer Mikrowelle getrocknet und danach mit Szintillationsflüssigkeit getränkt in eine Plastikhülle eingeschweißt. Die Szintillationsflüssigkeit wandelt die nicht direkt messbare β -Strahlung in Lichtblitze um, so dass die Radioaktivität schließlich in einem β -Szintillationszähler bestimmt werden kann. Die Radioaktivität wird in Zerfällen pro Minute (counts per minute, cpm) angegeben.

2.2.2 Arbeiten mit *T. cruzi*

2.2.2.1 Kultivierung von *T. cruzi* in Gewebe (*in vitro* -Kultivierung)

Für die Vermehrung von *T. cruzi in vitro* wurden Zellen der humanen Glioblastom-Zell-Linie 86HG39 in 50 ml-Gewebekulturflaschen zu einem halbkonfluenten Zellrasen expandiert und mit trypomastigoten Blutformen aus *T. cruzi*-infizierten Mäusen beimpft. Innerhalb der nächsten Tage infizierten die Trypanosomen die 86HG39-Zellen (Sanderson *et al.*, 1980). In der folgenden intrazellulären Phase waren keine freien Trypanosomen in der Zellkultur zu erkennen, da die Parasiten im Zytosol der Zellen expandierten. Nach fünf bis zehn Tagen konnten die Parasiten, die von ihren sterbenden Wirtszellen freigesetzt wurden, mit dem Kultur-Überstand gesammelt und bei 600 rpm für fünf Minuten (Megafuge 1.0 R) zentrifugiert werden, um Wirtszellreste zu entfernen. Die Trypanosomen wurden schließlich durch Zentrifugation bei 1.600 rpm für zehn Minuten (Megafuge 1.0 R) sedimentiert und mit Medium gewaschen, bevor sie

zur Infektion einer neuen 86HG39-Kultur eingesetzt oder für Experimente verwendet wurden.

Bei der Vermehrung von Trypanosomen *in vitro* besteht jedoch die Gefahr, dass die Parasiten auf Dauer ihren Phänotyp verändern und ihre Infektiosität verlieren können. Um das zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die *in vitro* -Kultur der Parasiten regelmäßig durch Infektion mit direkt aus Stammerhaltungs-Mäuse-Blut gewonnenen Trypanosomen neu gestartet.

2.2.2.2 Kultivierung von *T. cruzi* in Mäusen (*in vivo* -Kultivierung zur Stammerhaltung)

Um die Virulenz von *T. cruzi* zu erhalten, wurden die Parasiten in Mäusen passagiert. Diese Stammerhaltung erfolgte in einem Rhythmus von zirka 10 Tagen durch den Transfer von Blut aus infizierten BALB/c-Mäusen mit hoher Parasitämie in nicht-infizierte BALB/c-Mäuse.

Dafür wurden einer infizierten Maus 1-2 ml Blut unter Narkose mit Metofane (Janssen, Neuss) durch Herzpunktion entnommen und mit 20 µl Heparin (200 Einheiten/ml) versetzt. In Abhängigkeit von der Parasitenlast wurden dann 100 bis 500 µl dieses Frischblutes der nächsten BALB/c-Maus intraperitoneal injiziert.

Alternativ konnte das Blut auch mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt werden, bevor es wieder zur Infektion verwendet wurde.

2.2.2.3 Bestimmung der Parasitämie im Blut bei *T. cruzi* -Infektion

Der Verlauf einer Infektion mit *T. cruzi* wurde anhand der Anzahl an Parasiten im Blut der Maus verfolgt. Hierzu wurde der infizierten Maus die Schwanzvene punktiert, so dass ein Tropfen Blut heraustrat. Von dem Blut wurden 2,5 µl abgenommen, mit 22,5 µl Tris-Ammoniumchlorid (0,87 % (w/v) NH₄Cl) verdünnt und für einige Minuten inkubiert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden 10 µl dieser Suspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei nur die beweglichen Trypomastigoten berücksichtigt wurden.

2.2.2.4 Infektion von Mäusen mit *T. cruzi* (in vivo -Infektion)

Für Infektionen von Mäusen mit einer definierten Anzahl an Parasiten wurde Blut von infizierten Stammerhaltungs-Mäusen verwendet. Wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben, wurde einer infizierten Maus unter Narkose mit Metofane Blut mittels Herzpunktion entnommen und mit Heparin versetzt. Nachdem die Menge der darin enthaltenen lebenden Trypanosomen durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt worden war (wobei nur bewegliche Trypomastigote berücksichtigt wurden), wurden die isolierten Trypanosomen mit sterilem PBS auf 2×10^4 /ml eingestellt. Diese wurden unmittelbar zur Infektion eingesetzt, indem jeder zu infizierenden Maus 500 µl Blut-PBS-Gemisch mit 1×10^4 Trypanosomen intraperitoneal injiziert wurden. 12-18 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse - nach Bestimmung der Parasitämie im Blut - getötet und Peritoneal-Makrophagen (2.2.1.5) oder Milzzellen (2.2.1.4) für die nachfolgenden Experimente präpariert.

2.2.2.5 In vitro -Infektion von Zellen mit *T. cruzi*

Die entsprechende Anzahl zu infizierender Zellen wurde in 100 µl Medium in den Vertiefungen einer 96-Loch-Gewebekulturplatte vorgelegt. Während einer einstündigen Inkubation im Brutschrank konnten Antigen-präsentierende Zellen an der Platte adhären. Auf die zu infizierenden Zellkulturansätze wurden jeweils 100 µl Medium mit Trypanosomen aus der 86HG39-Gewebekultur pipettiert, so dass sich die gewünschte MOI (multiplicity of infection) ergab. Die Ansätze wurden 24 oder 48 Stunden lang im Brutschrank inkubiert und anschließend mindestens dreimal mit frischem Medium gewaschen, um extrazellulär verbliebene Parasiten zu entfernen. Danach wurden die Zellen direkt in Stimulations-Experimenten (2.2.3) eingesetzt.

Die Anzahl der intrazellulären *T. cruzi* pro Zelle wurde durch eine Immunfärbung überprüft. Dazu wurden zusätzlich APC in „Chamber-Slides“ oder auf Glasdeckgläschen kultiviert und infiziert wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben.

2.2.3 *In vitro* -Stimulation von Immunzellen

2.2.3.1 T-Zell-Assay

Um zu testen, wie die Interaktion von T-Zellen mit APC durch eine Infektion mit *T. cruzi* beeinflusst wird, wurde ein Testsystem unter Nutzung TCR-transgener T-Zellen entwickelt. Verwendet wurden T-Zell-Hybridome oder T-Zellen aus den Mausstämmen DO11.10 (CD4⁺ T-Zellen; der transgene TCR erkennt einen Komplex aus dem 17er-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ und I-A^d) und OT-1 (CD8⁺ T-Zellen; der transgene TCR erkennt einen Komplex aus dem 8er-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ und H2-K^b).

Wenn nicht anders beschrieben, wurden 2×10^5 T-Zellen (2.2.1.8 bzw. 2.2.1.9) pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte mit 1×10^5 APC stimuliert. Ein Teil der Antigen-präsentierenden Zellen wurde zuvor mit Trypanosomen infiziert (*in vitro* -Infektion, 2.2.2.5) bzw. ist aus infizierten Mäusen präpariert worden (*in vivo* -Infektion, 2.2.2.4). Die entsprechenden Peptid-Antigene wurden in unterschiedlichen Konzentrationen direkt in den T-Zell-Assay gegeben. Aufgefüllt wurden die einzelnen Ansätze auf ein Endvolumen von 300 µl mit frischem Medium. Es wurden generell Dreifachwerte untersucht. Für Kontroll-Messungen ohne APC oder ohne T-Zellen wurde der entsprechende Zelltyp weggelassen.

Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation (oder zu anderen definierten Zeitpunkten) wurden Kultur-Überstände für die Zytokin-Bestimmung mittels ELISA (2.2.6) abgenommen. Des weiteren wurde in einigen Ansätzen die Proliferation der T-Zellen (2.2.1.12) oder die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen (2.2.5) untersucht.

In Vorversuchen wurde die Anzahl der eingesetzten APC variiert. Des weiteren wurden verschiedene Mengen an T-Zellen ausgetestet. Wurden zu viele PEC eingesetzt, verbrauchten diese vermutlich zu viele Nährstoffe, die den T-Zellen dann im weiteren Verlauf des Experimentes nicht mehr zur Verfügung standen. Eine zu geringe Dichte an PEC verhinderte aber auch eine ausreichende Aktivierung. Es stellte sich heraus, dass eine optimale Stimulation mit einer Anzahl von 1×10^5 PEC pro Ansatz in 96-Loch-Gewebekulturplatten, zusammen mit zwei T-Zellen pro APC, erreicht wird. Dieses Verhältnis der Zellen wurde nach Möglichkeit für alle weiteren Experimente eingesetzt.

2.2.3.2 Stimulation des T-Zell-Assays mit anti-CD3

Mit anti-CD3 können T-Zellen unabhängig von ihrem spezifischen Antigen über den T-Zell-Rezeptor-Komplex stimuliert werden (polyklonale Aktivierung). Dazu wurde in den entsprechenden T-Zell-Assay anstelle von spezifischem Antigen-Peptid (OVA_p) anti-CD3 mAK (Überstand der Hybridom-Zell-Linie 145-2C11, BNI, Hamburg) gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 3 µg/ml ergab.

2.2.3.3 T-Zell-Assay in Gegenwart blockierender Agenzien

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Zytokine oder Stimulationswege auf die Vermittlung immunsuppressiver Effekte durch *T. cruzi*-infizierte Antigen-präsentierende Zellen wurden unterschiedliche Blockade-Experimente durchgeführt. Dazu wurden in die T-Zell-Assays hemmende Agenzien wie z.B. Antikörper, die bestimmte Zytokine neutralisieren (anti-IFN-γ, anti-IL-12 oder anti-TGF-β1), oder Antikörper bzw. Fab-Fragmente, die verschiedene Kostimulatoren blockieren können (anti-CD86, anti-CTLA-4, Fab-Fragment von anti-CTLA-4 oder CTLA-4-Ig), gegeben.

Tab. 2.10: Zur Blockade eingesetzte Agenzien

Blockade von	Eingesetztes Agens	Endkonzentration
CD43	Ratte anti-Maus CD43	10 bzw. 50 µg/ml
CD86 (B7-2)	Ratte anti-Maus CD86	10 µg/ml
	CTLA-4 Ig	50 µg/ml
CTLA-4	Hamster anti-Maus CTLA-4	10 bzw. 100 µg/ml
	Fab-Fragment von anti-Maus CTLA-4	10 bzw. 100 µg/ml
IFN-γ	Ratte anti-Maus IFN-γ	20 µg/ml
IL-12	Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70	10 µg/ml
NO	Aminoguanidin (Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-5 mM
TGF-β1	Ratte anti-Maus TGF-β1	10 µg/ml

2.2.3.4 Blockade des Kontaktes infizierter APC mit T-Zellen durch Gewebekultur-Einsätze (Transwell-Experimente)

Jeweils 1×10^5 frisch präparierte Peritoneal-Makrophagen (2.2.1.5) aus infizierten bzw. nicht-infizierten BALB/c-Mäusen wurden mit 2×10^5 DO.11.10-Milzzellen (2.2.1.4) in 96-Loch-Flachbodenplatten mit OVA_p stimuliert.

Dabei wurden zum einen Makrophagen und Milzzellen vereint in der unteren Kammer eines Transwell-Einsatzes kultiviert, zum anderen die Makrophagen in der unteren Kammer von den Milzzellen in der oberen Kammer durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm getrennt voneinander kultiviert.

Für die praktische Durchführung wurden zuerst die Makrophagen in 175 μl Medium in der unteren Kammer vorgelegt. Die Milzzellen wurden in 50 μl Medium entweder direkt dazugegeben (Kontakt) oder aber nach Einhängen der Gewebekultur-Einsätze in die obere Kammer des Transwells pipettiert (kein Kontakt). Als zusätzliche Kontrolle wurden die Milzzellen ohne Peritoneal-Makrophagen als exogene APC unter den beschriebenen Bedingungen eingesetzt und mit Peptid stimuliert. Die Platten wurden für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei den Kulturen, die 48 Stunden inkubiert wurden, wurde nach 24 Stunden 30 μl frisches Medium in der oberen Kammer dazugegeben, um Verdunstungsverluste auszugleichen. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Gewebekultur-Einsätze herausgenommen, die Kultur-Überstände aus beiden Kammern vereinigt und anschließend zur Zytokin-Bestimmung (2.2.6) eingesetzt.

2.2.3.5 Restimulation von T-Zellen nach Stimulation durch infizierte bzw. nicht-infizierte APC (Transfer-Experimente)

Um zu untersuchen, inwieweit sich T-Zellen nach einer Stimulation durch infizierte Antigen-präsentierende Zellen wieder durch frische nicht-infizierte APC restimulieren lassen, wurden Transfer-Experimente durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3×10^6 frisch präparierte Peritoneal-Makrophagen (2.2.1.5) aus infizierten bzw. nicht-infizierten BALB/c-Mäusen in 5 ml Medium in einer 6-Loch-Gewebekulturplatte vorgelegt. Während einer Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten die Makrophagen am Boden der Platte adhären. Die nicht-adhären Zellen wurden anschließend durch Waschen mit Medium entfernt. Dann wurden jeweils 6×10^6 DO.11.10-T-Zellen (2.2.1.9) auf die Makrophagen gegeben und die Ansätze für 24 bis 48 Stunden in 5 ml Medium mit 1 $\mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Danach wurden die T-Zellen abgenommen, indem sie mit Medium von den am Boden der Gewebekulturplatte adhären APC abgespült

wurden. Die auf diese Weise gewonnenen T-Zellen wurden so auf 24- bzw. 96-Loch-Gewebekulturplatten verteilt, dass sie mit engem Kontakt zueinander für 3 Tage bei 37 °C im Brutschrank weiter kultiviert werden konnten. Für einige Experimente wurden die Zellen zuvor noch einmal mit Hilfe des *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* von möglicherweise kontaminierenden APC befreit. Nach dreitägiger Inkubation wurden je 1×10^5 der T-Zellen und 5×10^4 frisch präparierte PEC aus nicht-infizierten BALB/c-Mäusen in 96-Loch-Platten mit 0,5 bzw. 1 µg/ml OVA_p erneut für 24 bzw. 48 Stunden stimuliert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Kultur-Überstände zur Zytokin-Bestimmung (2.2.6) abgenommen.

2.2.3.6 Sialidase-Behandlung von T-Zellen

Die enzymatische Abspaltung der Sialinsäurereste auf der Oberfläche von T-Zellen wurde eingesetzt, um einen möglichen *trans*-Sialidase-Effekt von *T. cruzi* zu untersuchen bzw. auszuschließen. Dazu wurden die T-Zellen mit aus *Clostridium perfringens* gewonnener Neuraminidase (Sialidase von der Firma *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim) behandelt, bevor sie im Stimulations-Assay eingesetzt wurden. Für die praktische Durchführung wurden 1×10^7 T-Zellen in 500 µl Serum-freiem Medium resuspendiert und mit 0,05 U Sialidase für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert, wobei sie auf höchster Stufe geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Serum-freiem Medium gewaschen und sofort im T-Zell-Assay eingesetzt.

2.2.3.7 Fixierung von APC mit Paraformaldehyd

Vor einigen Stimulationsexperimenten wurden die APC fixiert. Dazu wurden MHC-II-transfizierte RT2.3HD6-Fibroblasten nach ihrer *in vitro* -Infektion (2.2.2.5) für 20 min bei RT in 200 µl 1 % PFA (w/v) in PBS bzw. die Kontrollen in 200 µl PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und als APC zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt (T-Zell-Assay, 2.2.3.1).

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

2.2.4.1 Cytospin (Immunfärbung von Cytozentrifugationen)

Die Expression von Oberflächenmolekülen nicht-adhärenter Zellen wurde untersucht, indem die Zellen auf Objektträger zentrifugiert und gefärbt wurden. Dazu wurden 100-200 µl Zellsuspension, die etwa 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen enthielten, in einen Trichter gegeben, der über einem gelochten Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) und darunterliegendem Objektträger angebracht war. Durch Zentrifugation in der Cytospin-Zentrifuge (600 rpm, 10 min) wurden die Zellen auf den Objektträger transferiert, wobei sie sich durch die Zentrifugalkraft gleichmäßig darauf ausbreiteten, während der Papierfilter die Flüssigkeit aufnahm.

Über Nacht wurden die Cytospins getrocknet, dann 10 min in Aceton fixiert und zum Trocknen einige Stunden stehen gelassen. Anschließend wurden die auf dem Objektträger aufgebrachten Zellen mit einem Wachsstift umkreist, um so definierte Volumina an Färbelösung einsetzen zu können. Die fixierten Zellen wurden entweder sofort gefärbt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Vor der Färbung der Cytospins wurden die Fc-Rezeptoren der Zellen mit 20 µl Cohn-II für mindestens 15 min blockiert. Dieser Arbeitsgang sowie die darauf folgenden Färbungen wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:500 in PBS für 30-60 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in einem mit PBS gefüllten Objektträgerständer für je 5-10 min wurde im Falle der indirekten Immunfluoreszenz der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper (1:100 bis 1:500 Verdünnung in PBS) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an eine dreißig bis sechzigminütige Inkubation im Dunkeln wurden die Objektträger erneut dreimal in PBS gewaschen und die Zellen anschließend unter einem Tropfen Anti-Fade-Solution mit einem Deckgläschen bedeckt. Bei der Verwendung von Primär-Antikörpern, die selbst Fluoreszenzfarbstoff-konjugiert waren, oder bei Ansätzen der Zellkern (DNA)-Färbung mit DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid) wurde ohne einen zweiten Färbeschritt eingedeckt. Um das Ausmaß unspezifischer Bindung der Fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörper beurteilen zu können, wurde bei indirekter Färbung stets eine Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper mitgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

2.2.4.2 Immunfärbung adhärent wachsender Zellen

Die Expression von Oberflächenmolekülen adhärent wachsender Zellen wurde untersucht, indem die Zellen direkt auf Objektträgern (in speziellen Zellkulturkammern, „Lab-Tek Chamber Slides“) oder auf Glasdeckgläschen kultiviert und gefärbt wurden. Dazu wurden Zellsuspensionen von z.B. 1×10^5 bis 2×10^5 PEC in „Chamber Slides“ gegeben, deren Kammergröße der der Vertiefung einer 96-Loch-Gewebekulturplatte entsprach. Darin wurden die Zellen kultiviert, bis sie an der Wachstumsoberfläche adhärten. Bei Bedarf konnten sie z.B. mit *T. cruzi* infiziert werden (2.2.2.5). Eine Kultivierung in größerem Maßstab konnte auf runden, sterilen Deckgläschen erfolgen, die in die Löcher einer 24-Loch-Gewebekulturplatte gelegt wurden.

Vor Durchführung der Immunfärbung wurden die adhären Zellen mit 1 %iger (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert (mind. 15 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C) und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die fixierten Zellen permeabilisiert, indem sie mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 Minuten inkubiert wurden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde RPMI 10 % FCS für 30 min bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) zu den Zellen gegeben, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu blockieren.

Die Färbung der Zellen letztendlich verlief analog zu der Färbung von Cytospins.

2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS)

Zur Quantifizierung der Expression von Oberflächenmolekülen oder zur Bestimmung der Anteile unterschiedlicher Zellpopulationen in einem Ansatz anhand ihres Repertoires an Oberflächenmarkern wurden durchflußzytometrische Messungen durchgeführt. Dabei können mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) - auch Durchflußzytometer genannt - einzelne Zellen klassifiziert werden. Das Gerät misst die Zellgröße, die Granuladichte und die Fluoreszenz gebundener fluoreszierender Antikörper, während die Zellen einzeln an einem Fotodetektor vorbeiströmen.

Bei dieser Methode wurden alle Reagenzien kalt gehalten und die einzelnen Versuchsschritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Jeweils 1×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Fc-Rezeptoren der Zellen

wurden mit 25 µl Cohn-II für mindestens 15 Minuten blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Pro Ansatz wurde 1 µl Erst-Antikörper in 25 µl FACS-Puffer oder 50 µl eines konzentrierten Hybridoma-Kultur-Überstandes hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und danach der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte spezies- und isotypspezifische Zweit-Antikörper (1 µl) in 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben, falls der Erst-Antikörper noch nicht Fluoreszenz-markiert war. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und die gefärbten Zellen schließlich in 300 µl 1 % (w/v) PFA in PBS fixiert. Um das Ausmaß unspezifischer Bindung der Fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörper beurteilen zu können, wurde bei indirekter Färbung stets eine Negativkontrolle ohne Erst-Antikörper durchgeführt. Messung und Auswertung der Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Durchflußzytometers (FACScan oder FACSCalibur Flow Cytometer) unter Verwendung der dazugehörigen Software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg). Bei der Auswertung wurden nur vitale Zellen berücksichtigt. Die mittlere Fluoreszenz von mit spezifischen Antikörpern gefärbten Zellen wurde als Histogramm gegen den Logarithmus der Zellzahl aufgetragen und der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen von allen vitalen Zellen bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Fluoreszenz-markierte unspezifische Antikörper (Isotypkontrolle), ungefärbte Zellen oder Zellen, die nur mit dem Zweit-Antikörper gefärbt wurden.

2.2.6 Enzym-gekoppelter Immunsorbent-Assay (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA)

Mit Hilfe eines sog. indirekten ELISAs oder Sandwich-ELISAs ist es möglich, in einer Lösung enthaltene Proteine spezifisch nachzuweisen und zu quantifizieren, selbst wenn sie in sehr niedriger Konzentration vorliegen. Dabei bindet das gesuchte Antigen an einen immobilisierten Antikörper und wird anschließend durch einen zweiten Antikörper detektiert. Durch die Verwendung von biotinylierten Zweit-Antikörpern und Streptavidin-Enzym-Konjugaten wird eine Amplifikation des Signals erreicht. Mit dieser Methode wurde die Konzentration an Zytokinen in verschiedenen Zellkultur-Überständen gemessen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten ELISAs wurden Mikrotiterplatten (96-Loch, MICROLON-ELISA-Platten) mit einem für das nachzuweisende Zytokin spezifischen Capture-Antikörper in Beschichtungs-Puffer (50 µl pro Loch) beschichtet. Die

Assoziation erfolgte über Nacht bei 4 °C aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen der Antikörper mit der Materialoberfläche. Antikörper, die nicht gebunden hatten, wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Um unspezifische Bindungen der folgenden Antigene oder Antikörper zu verhindern, wurden noch freie Oberflächenbindungsstellen auf der ELISA-Platte durch zweistündige Inkubation mit 1 % (w/v) BSA in PBS (200 µl/Loch) bei RT abgesättigt. Anschließend wurden in die entleerten Platten-Vertiefungen jeweils 50 µl zu untersuchender Kultur-Überstand gegeben. Zudem wurde auf jeder Platte eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen des entsprechenden rekombinanten Zytokins mitgeführt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht, wonach viermal mit PBS-Tween gewaschen wurde, bevor der zweite, biotinylierte Detektions-Antikörper in 0,1 % (w/v) BSA in PBS (50 µl/Loch) aufgetragen wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde die Platte erneut viermal gewaschen. Dann wurden je 50 µl eines Konjugats aus Streptavidin und HRPO (DAKO, Glostrup, Dänemark) in 0,1 % (w/v) BSA in PBS (1:10.000) in die Vertiefungen gegeben. Biotin bindet mit einer sehr hohen Affinität spezifisch an Avidin, so dass sich nach einer Stunde bei RT stabile Komplexe zwischen dem biotinylierten Antikörper und dem Enzym-markierten Streptavidin gebildet hatten. Eine Quantifizierung erfolgte nach sechsmaligem Waschen mit PBS-Tween über eine charakteristische Farbreaktion mit 100 µl frisch angesetzter Substratlösung. Das in der Substratlösung enthaltene TMB wurde dabei durch die Peroxidase, die proportional zu dem nachzuweisenden Zielmolekül im jeweiligen Ansatz vorhanden war, in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Die Farbreaktion lief so lange, bis die Standardreihe ausreichend zu erkennen war (ca. 10 min) und wurde dann durch Zugabe von 25 µl Stopp-Puffer beendet, wobei ein Farbumschlag zu Gelb erfolgte. Die Absorption der einzelnen Lösungen wurde mit Hilfe des ELISA-Readers vermessen (photometrische Messung bei 405 nm).

Zur Detektion von TGF-β1 in den Zellkultur-Überständen musste dieses erst inaktiviert werden. Dafür wurden 50 µl Probe mit 2 µl 1 M HCl versetzt und 15 min bei RT oder 1 Std. bei 4 °C inkubiert. Danach wurde mit 2 µl 1 N NaOH neutralisiert, und der ELISA konnte wie beschrieben durchgeführt werden.

Tab. 2.11: Konzentrationen der beim ELISA eingesetzten Antikörper

Zytokin	Capture-Antikörper	Biotin-Antikörper
IL-2	1 µg/ml	1 µg/ml
IL-10	2 µg/ml	1 µg/ml
IL-12	2 µg/ml	0,5 µg/ml
IFN-γ	2 µg/ml	0,5 µg/ml
TGF-β1	5 µg/ml	2 µg/ml

2.2.7 Stickstoffmonoxid (NO)-Bestimmung nach Grieff

Die Konzentration an Stickstoffmonoxid (NO) in Zellkultur-Überständen wurde mit Hilfe des „Grieff-Nachweises“ (Green *et al.*, 1982) bestimmt. Dazu wurden 100 µl Kultur-Überstand in einer 96-Loch-Flachbodenplatte mit je 50 µl Grieff I und 50 µl Grieff II versetzt. Zusätzlich wurde eine Standardreihe aus NaNO₃ mit einer Maximal-Konzentration von 125 µM NO auf der Platte mitgeführt. Proportional zur Menge an NO in der untersuchten Lösung bildeten sich durch Zugabe der Grieff-Reagenzien farbige Komplexe. Nach Abschluss der Farbentwicklung wurde die Absorption der einzelnen Lösungen bei einer Wellenlänge von 560 nm mit Hilfe des ELISA-Readers vermessen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Immunantwort gegen intrazelluläre Trypanosomen untersucht werden. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob sich ruhende T-Zellen von *Trypanosoma cruzi* -infizierten Antigen-präsentierenden Zellen stimulieren lassen, und ob ein Einfluss auf die nachfolgende T-Zell-Antwort nachweisbar ist.

3.1 Etablierung eines Systems zur Stimulation von T-Zellen durch *T. cruzi* -infizierte APC

Um die Einflüsse einer *T. cruzi* -Infektion auf die nachfolgende Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen, wurde ein *in vitro* -System entwickelt (Abb. 3.1). In dem hier etablierten System wurden als Antigen-präsentierende Zellen entweder Makrophagen oder dendritische Zellen eingesetzt. Diese wurden *in vitro* mit verschiedenen Mengen an *T. cruzi* -Trypomastigoten infiziert (2.2.2.5). Die infizierten APC wurden mit naiven MHC-Klasse I- oder II-restringierten T-Zellen und dem entsprechenden Antigen kultiviert. Als T-Zellen kamen dabei Zellen zum Einsatz, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor mit definierter Spezifität für Ovalbumin-Peptide trugen. Es wurden zunächst T-Zell-Hybridome, im weiteren Verlauf der Arbeit dann gereinigte T-Zellen von TCR-transgenen DO11.10- oder OT-1-Mäusen verwendet.

Es wurden verschiedene Systeme von transgenen T-Zellen, Peptiden und APC eingesetzt: Die hauptsächlich verwendeten T-Zellen aus DO11.10-Mäusen exprimieren einen TCR, der einen Komplex aus I-A^d und dem aus Hühner-Ovalbumin stammenden 17er-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ erkennt (Hosken *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu den vorher genannten CD4⁺ T-Helfer-Zellen sind die des weiteren verwendeten T-Zellen aus OT-1-Mäusen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Sie exprimieren einen TCR, der das aus Hühner-Ovalbumin stammende 8er-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ bei Präsentation auf H2-K^b-Molekülen erkennt (Hogquist *et al.*, 1994). (Peptidsequenzen siehe Tab. 2.4)

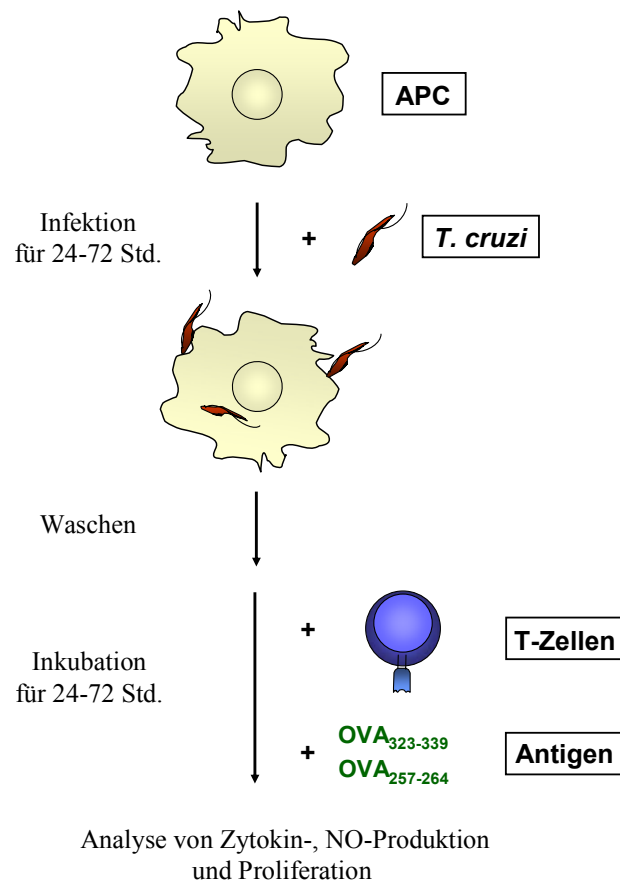


Abb. 3.1: Schema des *in vitro*-Modells zur Stimulation von T-Zellen durch *T. cruzi*-infizierte APC.

APC (Makrophagen oder DC) von BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen wurden mit verschiedenen Mengen an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24- bis 72-stündiger Infektion wurden die Kulturen gewaschen, um freie Parasiten zu entfernen. Danach wurden T-Zell-Hybridome oder gereinigte T-Zellen von DO11.10- bzw. OT-1-Mäusen und das entsprechende Ova-Peptid als Antigen zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kultur-Überstände abgenommen und analysiert. Des weiteren wurde die Proliferation der T-Zellen oder die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen untersucht.

3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse *T. cruzi* -infizierter Zellen

Die Infektion der Antigen-präsentierenden Zellen wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen überprüft. Dazu wurden peritoneale Exsudat-Zellen (PEC), die zu 90 % aus Zellen bestehen, die den Makrophagen-Marker CD11b tragen, auf Glasdeckgläschen kultiviert und infiziert. Nach DAPI und anti-*T. cruzi*-TRITC-Färbung wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. DAPI färbt die Zellkerne der PEC sowie die Kinetoplasten der infizierenden Trypanosomen, während das anti-*T. cruzi*-Antiserum die Trypanosomen-Oberfläche markiert. Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung *T. cruzi*-infizierter PEC. Die DAPI-Färbung (A) sowie der „Overlay“ beider Färbungen (C) zeigen, dass ein Großteil der Zellen infiziert ist. Um zu überprüfen, ob es sich bei den infizierten Zellen tatsächlich um Makrophagen handelte, wurden Kontrollfärbungen auf den für diese Zellen typischen Oberflächenmarker CD11b durchgeführt. Alle infizierten Zellen waren für diesen Marker positiv (Daten nicht gezeigt).

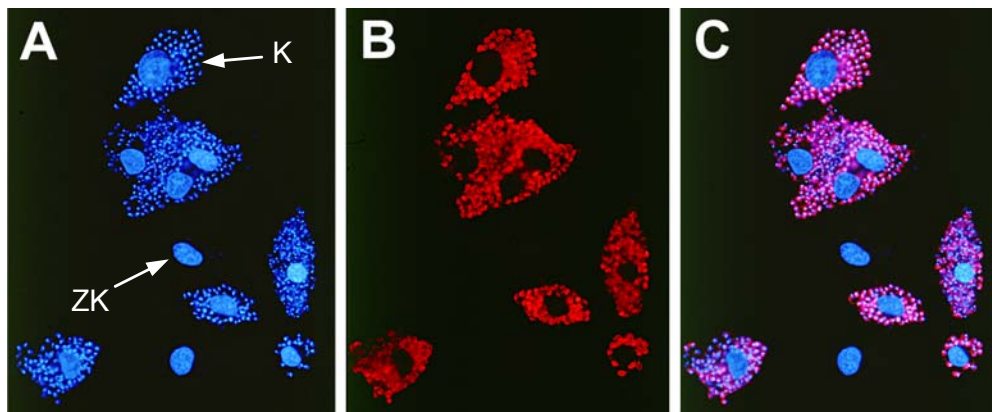


Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Analyse *T. cruzi* -infizierter PEC.

3×10^5 PEC wurden auf Glasdeckgläschen in 24-Loch-Platten kultiviert und mit der dreifachen Menge an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 5×10^4 DO11.10-T-Zell-Hybridome und 3 µg/ml OVAp hinzugegeben. 48 Stunden später wurde eine Doppelfärbung der Ansätze durchgeführt. DNA wurde spezifisch mit DAPI (1:500, A) und *T. cruzi* mit anti-*T. cruzi*-Kaninchenserum (1:500) sowie Maus anti-Kaninchen IgG-Tritc (1:400, B) angefärbt. Kontrollfärbungen auf CD11b (Ratte anti-Maus CD11b-FITC, 1:100) belegten, dass die infizierten Zellen Makrophagen waren (nicht gezeigt). Abb. C zeigt die Färbungen A und B übereinander gelagert. Aufnahme bei 63-facher Vergrößerung. ZK: Zellkern; K: Kinetoplast.

Die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass mit dieser *in vitro*-Infektion ein Großteil der Antigen-präsentierenden Zellen mit *T. cruzi* infiziert werden konnte. Die Makrophagen waren bei einer MOI von 3 Parasiten pro Zelle nach 72-stündiger Kultivierung fast vollständig mit Amastigoten-Formen des Parasiten ausgefüllt. Weitere fluoreszenzmikroskopische Analysen ergaben jeweils Infektionsraten zwischen 50 und 85 %. Im Durchschnitt wiesen 70 % der *in vitro*-infizierten APC Trypanosomen in ihrem Zellinneren auf.

3.1.2 Charakterisierung Antigen-präsentierender und kostimulatorischer Oberflächenmoleküle auf infizierten APC

Um zu überprüfen, ob die Infektion der Zellen mit der Expression von MHC-II-Molekülen oder der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2) interferiert, wurden diese Moleküle auf der Oberfläche der APC analysiert.

Makrophagen weisen eine sehr große Menge an Fc-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche auf, was zu einem hohen Hintergrund in durchflußzytometrischen Messungen (FACS) führt. Daher wurden dendritische Zellen (DC) als professionelle APC gewählt, um die Frage zu klären, ob eine Infektion der Zellen das Expressionsmuster ihrer kostimulatorischen und ihrer MHC-Moleküle beeinflusst.

Knochenmarks-stämmige dendritische Zellen (2.2.1.7) wurden *in vitro* mit *T. cruzi* infiziert. Nach 48-stündiger Infektion wurden nicht-infizierte und infizierte DC mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Proteine CD86 und MHC-II gefärbt und anschließend mit Hilfe eines FACS-Gerätes analysiert (2.2.5). Die dabei gemessene Fluoreszenz korreliert direkt mit der Oberflächenprotein-Menge der untersuchten Zellen und lieferte nach Auswertung mit der *CellQuest-Software* folgende Histogramme (Abb. 3.3):

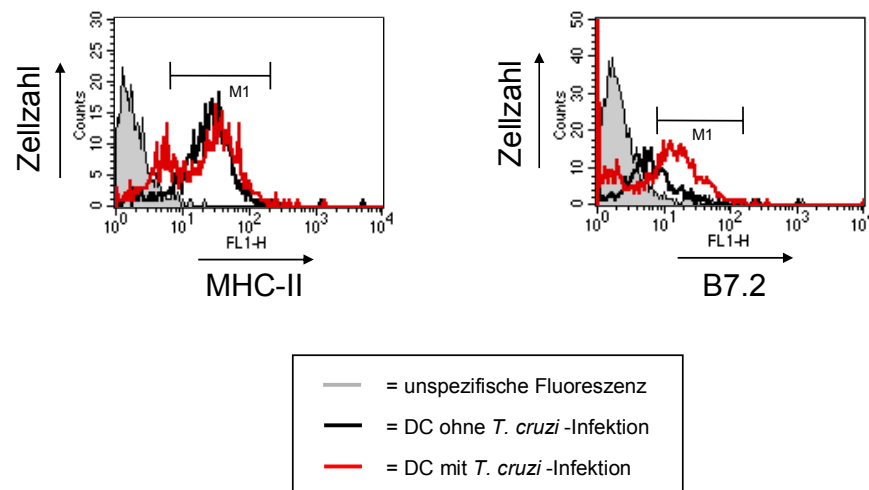


Abb. 3.3: Durchflußzytometrische Untersuchung *T. cruzi*-infizierter DC.

1×10^6 DC aus BALB/c-Mäusen wurden mit 2×10^6 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nicht-infizierte (schwarz) und *T. cruzi*-infizierte (rot) DC wurden nach 48 Stunden mittels Durchflußzytometrie auf die Expression der Oberflächenproteine MHC-II und CD86 (B7.2) hin untersucht. Die Zellen wurden mit Ratte anti-Maus MHC-II bzw. mit Ratte anti-Maus CD86 und Ziege anti-Ratte-FITC gefärbt. Als Kontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Fluoreszenz dienten Zellen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper versetzt wurden (grau ausgefüllte Fläche). Für die Auswertung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

Zellen, die nur mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper inkubiert worden waren, dienten zunächst als Kontrolle zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen sowie der unspezifischen Antikörper-Bindung. Die gemessenen unspezifischen Fluoreszenzen sind in den Histogramm-Darstellungen als grau ausgefüllte Flächen gekennzeichnet. Mit Hilfe eines *Markers* (M1 in Abb. 3.3), der am Fuß des Kontroll-*Peaks* gesetzt wird, kann unter Verwendung der *CellQuest-Software* der Anteil unspezifisch fluoreszierender Zellen ausgegrenzt und die Auswertung auf den Teil der Zellpopulation beschränkt werden, der das jeweils untersuchte Oberflächenprotein exprimiert. Der Anteil der Zellen, die ein bestimmtes Oberflächen-Molekül aufwiesen, sowie die durchschnittlichen Fluoreszenzen der Zellen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst:

Tab. 3.1: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung dendritischer Zellen (DC) auf die Oberflächenproteine CD86 (B7.2) und MHC-II mit und ohne *T. cruzi* -Infektion.

Der Anteil positiver Zellen gibt den Prozentsatz der Zellpopulation an, der das untersuchte Oberflächenprotein exprimiert. „Mean“ steht für die mittlere Fluoreszenzintensität.

Oberflächenprotein	Anteil positiver Zellen ohne <i>T. cruzi</i> -Infektion	Anteil positiver Zellen mit <i>T. cruzi</i> -Infektion
CD86 (B7.2)	32,3 % (Mean: 13,2)	61,3 % (Mean: 21,1)
MHC-II	71,4 % (Mean: 202,0)	78,0 % (Mean: 278,4)

Der Anteil dendritischer Zellen, die das kostimulatorische Molekül CD86 (B7.2) exprimieren, verdoppelte sich bei Infektion von 30 % auf 60 %. Der Anteil MHC-II-exprimierender Zellen erhöhte sich von 71 % auf 78 %. Dabei stieg auch die zugehörige mittlere Fluoreszenzintensität an. D.h. es kam durch die Infektion nicht nur zu einem Anstieg in dem Prozentsatz positiver Zellen, sondern auch zu einer Erhöhung der Zahl der Oberflächenmoleküle pro Zelle. Auch der jeweilige Anteil der dendritischen Zellen, die CD80 (B7.1) bzw. MHC-I auf der Zelloberfläche exprimierten, nahm bei Infektion nicht ab. Zudem wurde ebenfalls ein schwacher Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenz für diese Marker detektiert, der allerdings im Vergleich zu CD86 und MHC-II viel geringer ausfiel (nicht gezeigt).

Auch nach 24 Stunden war sowohl auf infizierten dendritischen Zellen als auch auf infizierten Knochenmarks-Makrophagen bereits eine erhöhte MHC-II- und B7.2-Expression detektierbar. Immunfärbungen mit DAPI belegten, dass zum Zeitpunkt der durchflußzytometrischen Untersuchung mehr als die Hälfte (53 %) der Zellen mit *T. cruzi* infiziert waren (Daten nicht gezeigt).

Ein häufig vorkommender Mechanismus von Krankheitserregern, durch den eine Immunsuppression vermittelt werden kann, liegt in der Beeinträchtigung der MHC-II- oder B7.2-Expression der infizierten Wirtszellen. Dies ist hier nicht feststellbar. Die Antigen-präsentierenden Zellen weisen alle notwendigen Moleküle auf, um T-Zellen zu stimulieren, und sie scheinen aktiviert zu sein, da die Expression von MHC-II und dem Kostimulator B7.2 bei infizierten APC höher ist als bei den nicht-infizierten.

3.1.3 Einfluss einer *T. cruzi*-Infektion der APC auf die Aktivierung von T-Zellen

Um die Interaktion zwischen *T. cruzi*-infizierten Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen zu untersuchen, wurde als erstes die Aktivierung naiver DO11.10-T-Zell-Hybridome untersucht, die mit dem 17er-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ aus Ovalbumin, präsentiert auf H2-A^d-tragenden PEC, stimuliert wurden. Zunächst sollten IL-2, IFN- γ und Stickstoffmonoxid (NO) in Kultur-Überständen analysiert werden.

Die Zytokine IL-2 und IFN- γ werden nach Aktivierung von T-Zellen produziert, während NO von aktivierten Makrophagen freigesetzt wird. Letzteres wirkt als inflammatorischer Botenstoff und kann auch direkt Pathogene abtöten.

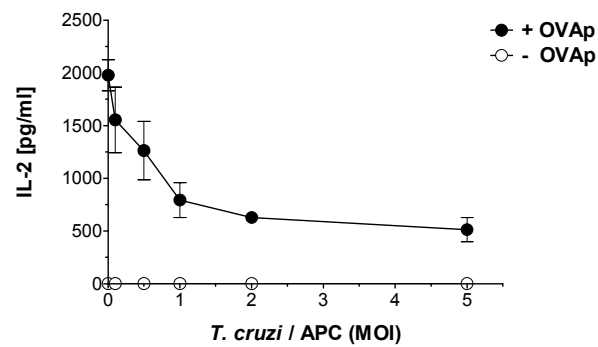
Peritoneale Exsudat-Zellen (PEC) aus BALB/c-Mäusen wurden mit Trypanosomen infiziert, wobei die Zahl der Parasiten wie in Abb. 3.4 ersichtlich, variiert wurde. Nach 24-stündiger Infektion wurden T-Zell-Hybridome sowie bei einem Teil der Ansätze Ova-Peptid als Antigen zur Stimulation hinzugegeben und schließlich die Überstände auf das Vorhandensein von IL-2, IFN- γ und NO hin untersucht.

Ohne Antigen konnte in dem untersuchten Stimulationssystem kein IL-2 im Zellkultur-Überstand detektiert werden (Abb. 3.4, A). Bei Zugabe von Ova-Peptid sezernierten die T-Zellen hohe Mengen an IL-2. Mit steigender Parasitenzahl pro APC sank die IL-2-Produktion der T-Zellen jedoch kontinuierlich ab. Ihr Minimum erreichte sie bei der höchsten Infektionsrate (MOI).

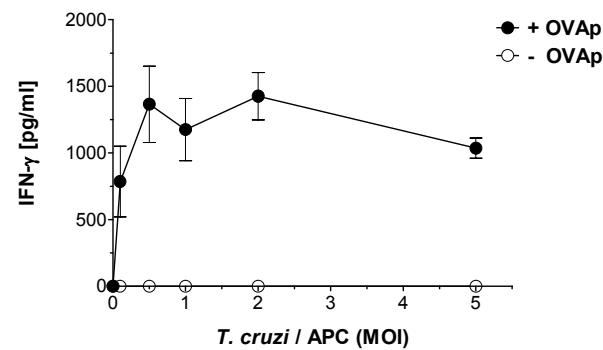
Auch IFN- γ war in Abwesenheit des Antigens nicht nachweisbar (Abb. 3.4, B). Die Zugabe von Ova-Peptid allerdings führte bei Anwesenheit infizierter APC zu einer Produktion dieses Zytokins, welche durch Erhöhung der Parasitenzahl bei Infektion noch gesteigert werden konnte.

Die NO-Produktion der Antigen-präsentierenden Zellen stieg parallel zur ansteigenden Infektionsrate (MOI) (Abb. 3.4, C). In Abwesenheit von Antigen war sie deutlich geringer und ohne Infektion gar nicht detektierbar.

A)



B)



C)

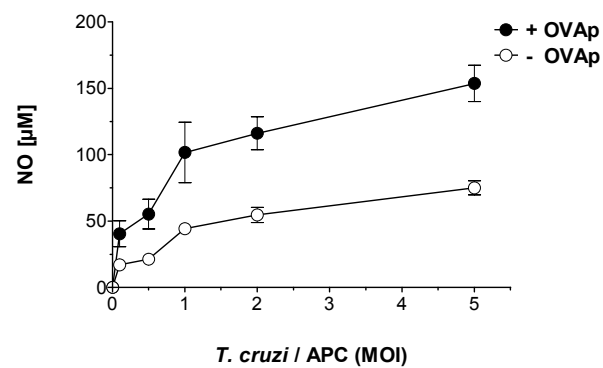


Abb. 3.4: Stimulation von naiven DO11.10-T-Zellen durch APC, die mit verschiedenen MOI an *T. cruzi* infiziert worden sind.

3×10^5 PEC wurden mit verschiedenen Mengen an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 5×10^4 DO11.10-T-Zellen in Anwesenheit (schwarze Symbole) oder Abwesenheit (weiße Symbole) von Antigen (5 $\mu\text{g/ml}$ OVAp) zugegeben. 24 Stunden später wurden im Überstand IL-2 (A), IFN- γ (B) und NO (C) quantifiziert.

Weder PEC noch T-Zellen alleine reagierten mit der Ausschüttung von Zytokinen bei Zugabe von Antigen (Daten nicht gezeigt). Nur in Anwesenheit des anderen Zelltyps ließ sich eine Zytokin-Produktion nachweisen. Dies traf auf die Freisetzung von Stickstoffmonoxid nicht zu. Von den Makrophagen wurden maximal 40 μM NO produziert, ohne dass T-Zellen anwesend sein mussten. Durch die Anwesenheit von IFN- γ produzierenden T-Zellen ließ sich die NO-Produktion der PEC aber noch weiter steigern.

Aufgrund dieser Daten wurde für die folgenden Experimente nach Möglichkeit eine MOI von ein bis zwei Parasiten pro Antigen-präsentierender Zelle eingesetzt. Bei diesem Infektionsverhältnis war ein deutlicher Einfluss der Infektion auf die T-Zell-Stimulation zu beobachten, der durch eine weitere Erhöhung der Parasitenzahl nicht weiter anstieg.

Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen, dass es bei Infektion auf Seiten der APC zu einer gesteigerten Expression sowohl von MHC-II als auch des kostimulatorischen CD86 (B7.2)-Moleküls kommt. Dies führte zwar zu einer Induktion von IFN- γ auf Seiten der T-Zelle, es kam allerdings auch zu einer stark verminderten Sezernierung von IL-2. Das zuletzt genannte Zytokin stellt einen wichtigen Wachstumsfaktor für T-Zellen dar und spielt daher eine Schlüsselrolle für die Regulation der T-Zell-Antwort. Im weiteren Verlauf der Arbeit soll deshalb vornehmlich IL-2 als Maß für die T-Zell-Aktivierung herangezogen und betrachtet werden.

3.1.4 Einfluss der Antigen-Konzentration auf die Stimulation naiver T-Zellen durch infizierte APC

Die Menge der durch T-Zellen produzierten Zytokine korreliert möglicherweise mit der Konzentration der präsentierten Antigene. Um beurteilen zu können, welche Mengen an Peptidantigen für eine deutliche Stimulation der T-Zell-Hybridome ausreichen, wurde die Konzentration von Ova-Peptid in diesem Versuch variiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.5 zeigen, dass die IL-2-Produktion der T-Zellen mit der Erhöhung der OVAp-Konzentration steigt. Auch hier war eine signifikante Reduktion der Zytokin-Produktion um 50-65 Prozent bei Stimulation durch infizierte im Vergleich zu nicht-infizierten PEC nachweisbar.

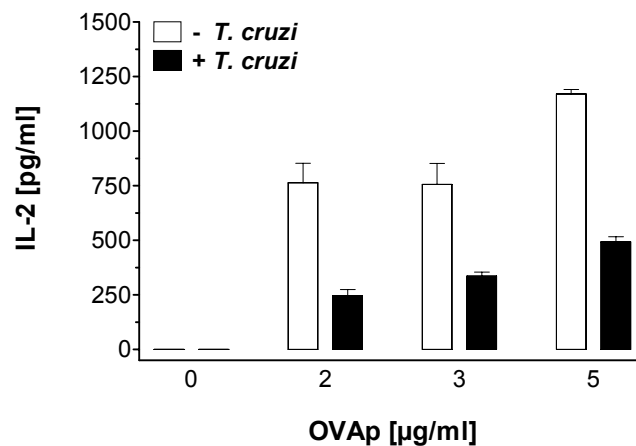


Abb. 3.5: Stimulation von naiven DO11.10-T-Zellen durch *in vitro*-infizierte PEC in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration.

3×10^5 PEC wurden mit der gleichen Menge an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 5×10^4 DO11.10-T-Zellen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) oder infizierten (schwarze Balken) PEC hinzugegeben. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Ova-Peptid stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

3.1.5 Einfluss *in vitro*-infizierter APC auf die Stimulation naiver T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen

Die bisher verwendeten T-Zell-Hybridome weisen große Unterschiede zu naiven T-Zellen auf, weil sie z.B. nur ein eingeschränktes Zytokin-Repertoire sezernieren können und möglicherweise wichtige immunologische Eigenschaften im Laufe ihrer Klonierung und Kultivierung verloren haben. Da diese Zellen jedoch direkt verfügbar waren, wurden sie für die Etablierung des Systems eingesetzt. Um aber wichtige Regulationsmechanismen bei der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden im Folgenden naive T-Zellen verwendet.

Die Antigen-spezifischen T-Zellen für den folgenden Versuch wurden aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen gewonnen. Ihr transgener TCR erkennt - ebenso wie der der zuvor verwendeten Hybridome - das 17er-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ aus Ovalbumin, präsentiert auf H2-A^d-tragenden APC. Die T-Zellen wurden aus den Milzen der Mäuse gewonnen und über Nylonwolle-Säulen angereichert (2.2.1.8), um den Anteil an anderen Milzzellen wie Makrophagen und B-Zellen so gering wie möglich zu halten.

Zunächst sollten die für eine T_H1-Antwort charakteristischen Zytokine IL-2 und IFN- γ im Stimulationsexperiment analysiert werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob

IL-12, ein wichtiger Induktor der T_H1 -Antwort, von infizierten APC freigesetzt wird. Dazu wurden peritoneale Exsudat-Zellen (PEC) aus BALB/c-Mäusen als Antigen-präsentierende Zellen mit Trypanosomen infiziert. Nach 24-stündiger Infektion wurden die gereinigten T-Zellen sowie verschiedene Konzentrationen an Ova-Peptid als Antigen zur Stimulation hinzugegeben. 24 und 48 Stunden später wurden die Überstände auf das Vorhandensein von IL-2, IFN- γ und IL-12 hin untersucht.

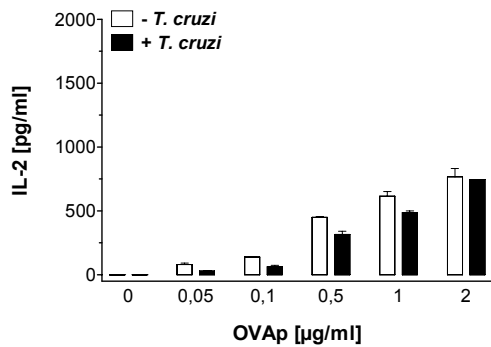
In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse dieses Experimentes dargestellt. 24 Stunden nach Zugabe von T-Zellen und Antigen war bezüglich der IL-2-Produktion nur ein geringfügiger Unterschied zwischen der Stimulation durch infizierte (+ *T. cruzi*) und nicht-infizierte PEC (- *T. cruzi*) erkennbar. Nach 48-stündiger Koinkubation hingegen war in infizierten Kulturen signifikant weniger IL-2 festzustellen als in den nicht-infizierten Kontrollen.

Die IL-2-Produktion korrelierte auch hier - wie zuvor bei der Stimulation von T-Zell-Hybridomen - deutlich mit der Antigen-Konzentration.

Ein Anstieg der IFN- γ -Produktion mit steigender Antigen-Konzentration war ebenfalls zu beobachten. Durch Infektion der APC ergab sich nahezu eine Verdopplung der bei Stimulation durch nicht-infizierte Zellen detektierbaren Menge an IFN- γ .

IL-12 war ebenfalls in den Kultur-Überständen nachweisbar. Während IL-2 und IFN- γ in Abwesenheit von Antigen nicht sezerniert wurden, war bereits ohne Antigen eine Induktion von IL-12 in den infizierten Proben zu erkennen. Bei Stimulation mit Peptid wurde die Produktion von IL-12 allerdings noch verstärkt. Die absoluten Mengen an detektierbarem IL-12 sanken nach 48-stündiger Stimulation verglichen mit der 24-stündigen leicht ab.

24 Stunden



48 Stunden

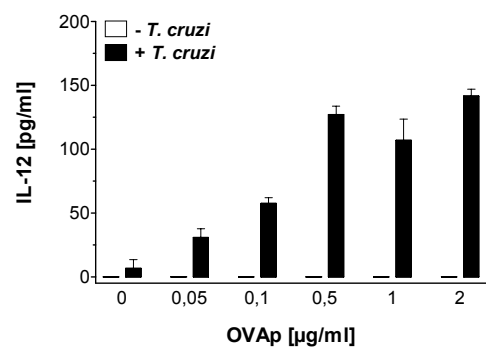
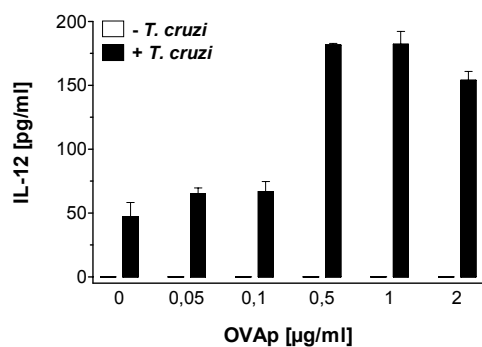
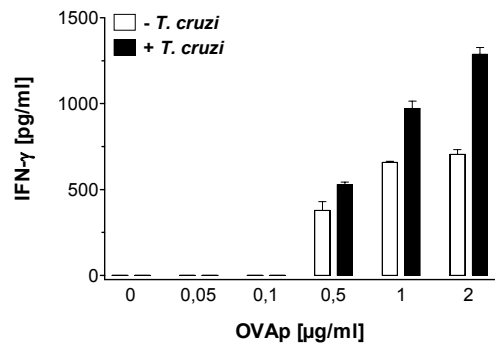
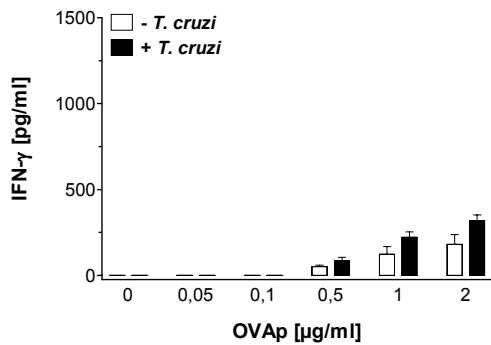
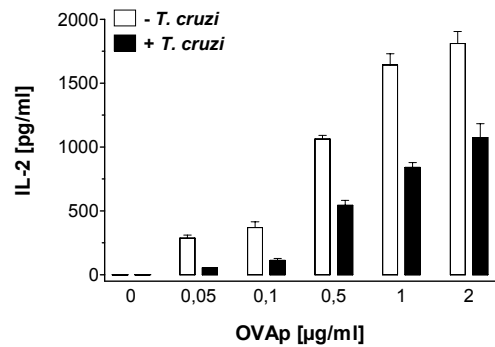


Abb. 3.6: T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen zeigen bei Stimulation durch *in vitro*-infizierte PEC vergleichbare Reaktionen wie T-Zell-Hybridome. Zytokin-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration.

1×10^5 PEC wurden mit der gleichen Menge an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 1×10^5 frisch präparierte T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) PEC hinzugegeben. Das Antigenpeptid wurde austitriert (0-2 µg/ml OVAp). 24 und 48 Stunden später wurden im Überstand IL-2, IFN-γ und IL-12 quantifiziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine *in vitro*-Infektion von APC mit *T. cruzi* sowohl bei naiven murinen T-Zellen als auch bei T-Zell-Hybridomen eine verringerte IL-2-Sekretion auslöst. Zudem scheint mit den T-Zellen aus der Maus ein sensibleres System als mit den Hybridomen vorzuliegen, denn bereits bei sehr geringen Antigen-Konzentrationen ist eine deutliche Stimulation der Zellen zu beobachten. Daher wurden für die weiteren Experimente naive TCR-transgene T-Zellen verwendet.

3.1.6 Einfluss der Dauer der *in vitro*-Infektion von APC auf die Stimulation naiver T-Zellen

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Dauer der *in vitro*-Infektion der Antigen-präsentierenden Zellen einen Einfluss auf die IL-2-Produktion stimulierter T-Zellen hat. Dazu wurden Infektionszeiten von 24 und 48 Stunden miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

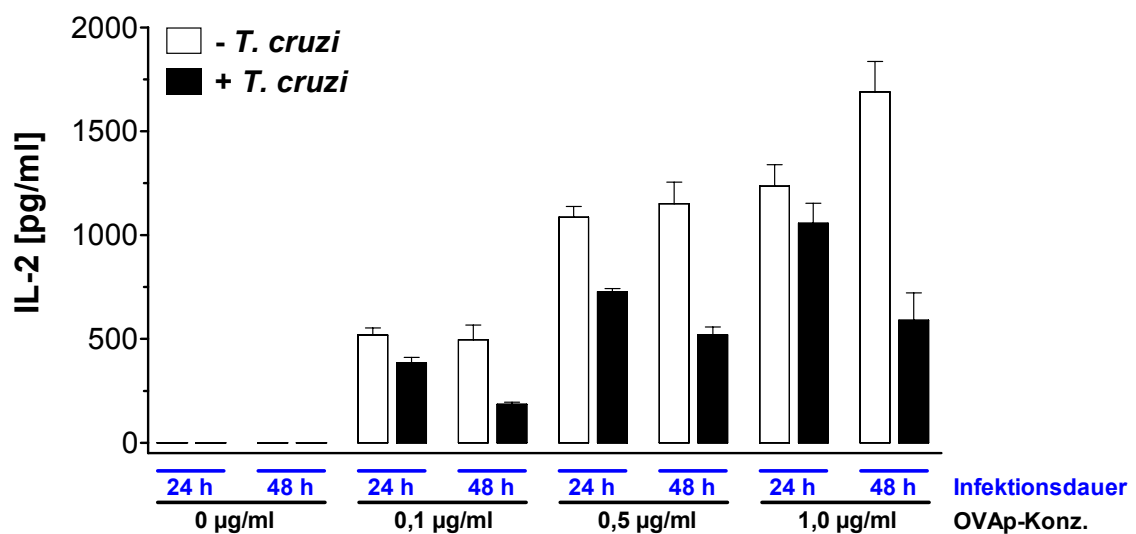


Abb. 3.7: IL-2-Konzentration in Kulturen von *in vitro*-infizierten PEC und naiven DO11.10-T-Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Infektion.

1×10^5 PEC wurden mit 2×10^5 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24- bzw. 48-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 2×10^5 naive DO11.10-T-Zellen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) oder infizierten (schwarze Balken) PEC hinzugegeben. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Ova-Peptid stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Die Daten zeigen, dass die Verminderung der IL-2-Produktion der T-Zellen bei der Stimulation durch APC, die für 48 Stunden infiziert worden waren, noch deutlicher

wird als bei der Stimulation durch APC, die nur 24 Stunden lang infiziert worden waren.

In nicht gezeigten Vorversuchen wurde ermittelt, dass der Zeitraum der *in vitro* - Infektion der APC vor ihrem Einsatz in Stimulationsexperimenten allerdings auch nicht viel länger sein darf als 48 Stunden, da die infizierten Makrophagen sonst im weiteren Verlauf der Stimulationsexperimente bereits zerstört werden können und durch die toten Zellen keine Antigen-Präsentation und damit Stimulation der T-Zellen mehr erfolgen kann. Durch die Lyse der Makrophagen würden zudem Trypanosomen in den Kulturen freigesetzt, die wiederum neue Zellen infizieren oder auch undefinierte unmittelbare Wirkungen auf die T-Zellen haben könnten. Bei einer Infektionsdauer von 72 Stunden waren in den Ansätzen der darauf folgenden 48-stündigen Stimulationsexperimente viele Antigen-präsentierende Zellen vorzufinden, die bereits zerstört waren.

3.1.7 Einfluss von APC aus *in vivo* -infizierten Mäusen auf die Stimulation naiver T-Zellen

Als nächstes stellte sich die Frage der biologischen Relevanz der bisherigen Beobachtungen. *In vitro* waren im Durchschnitt 70 % der APC mit Trypanosomen infiziert, was zu einer deutlichen Hemmung der IL-2-Produktion in Stimulationsexperimenten führte. Um herauszufinden, ob dieses mit dem *in vitro* -Infektionssystem realisierte hohe Ausmaß an infizierten Zellen und die daraus resultierenden Effekte auch *in vivo* erreicht werden können, wurden Mäuse mit *T. cruzi* infiziert (2.2.2.4). Bei messbarer Parasitämie im Blut der Tiere (2.2.2.3) wurden PEC als APC aus ihnen isoliert. Diese wurden mit über Nylonwolle-Säulen angereicherten T-Zellen und Antigen in Stimulationsexperimenten eingesetzt.

Obwohl nur zirka 15 % der APC aus *in vivo* -infizierten Mäusen nachweislich mit Trypanosomen infiziert waren, wie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, war auch hier eine sehr starke Reduktion der IL-2-Produktion im T-Zell-Stimulationsexperiment zu verzeichnen (Abb. 3.8). Diese ist vergleichbar mit der im *in vitro* -System, in dem ein Großteil der APC infiziert ist. Die IL-2-Produktion der T-Zellen, die durch PEC aus infizierten Mäusen stimuliert wurden, betrug lediglich 25 % der IL-2-Produktion von T-Zellen, die durch PEC aus nicht-infizierten Kontrollmäusen stimuliert wurden. Demgegenüber erhöhte sich die IFN- γ -Produktion der T-Zellen bei Stimulation durch infizierte APC um den Faktor 9. Außerdem zeigte sich

bei PEC aus infizierten Mäusen verglichen mit denen aus Kontroll-Mäusen ein extremer Anstieg der NO-Produktion. Hier konnte eine Erhöhung des Stickstoffmonoxids um den Faktor 45 detektiert werden.

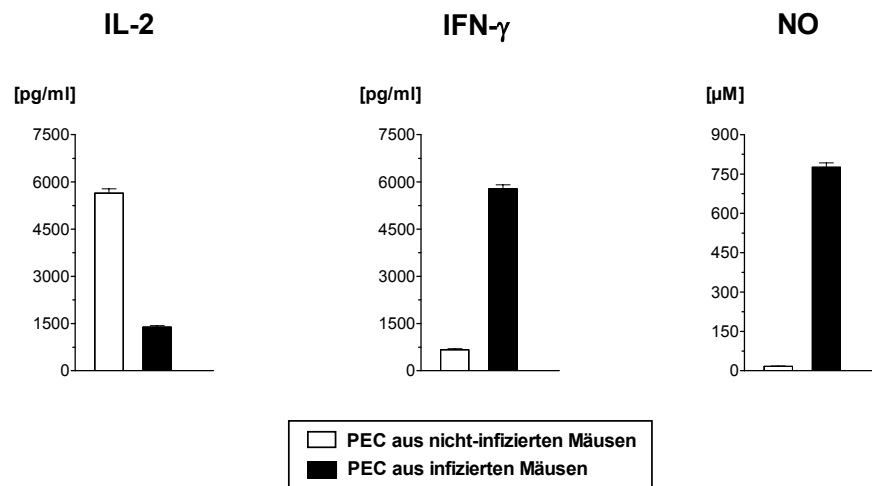


Abb. 3.8: Stimulation von OVA-spezifischen T-Zellen durch PEC aus infizierten versus nicht-infizierten Mäusen.

3×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen (Tag 8 p.i.) wurden mit 5×10^4 frisch präparierten naiven T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Die Zellen wurden mit $5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentrationen von IL-2, IFN- γ und NO bestimmt.

Mit den Antigen-präsentierenden Zellen aus *in vivo*-infizierten Mäusen konnten dem *in vitro*-Infektionssystem entsprechende Ergebnisse gezeigt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden daher nach Möglichkeit Zellen aus infizierten Mäusen untersucht, um den Verhältnissen bei einer natürlichen Infektion möglichst nahe zu kommen.

3.1.8 Stimulation von Milzzellen aus infizierten DO11.10-TCR-transgenen Mäusen

Bisher waren nur APC *in vitro* infiziert oder aus infizierten Mäusen gewonnen und als Stimulatoren für naive T-Zellen eingesetzt worden. Nun hingegen sollten T-Zellen untersucht werden, die *in vivo* dem komplexen proinflammatorischen Zytokin-Milieu ausgesetzt waren, das durch die *T. cruzi*-Infektion induziert wird. Dafür wurden DO11.10-TCR-transgene Mäuse mit *T. cruzi* infiziert und 16 Tage nach Infektion ihre Milzzellen isoliert. Diese wurden mit Ova-Peptid stimuliert. Danach wurden IL-2 und IFN- γ in den Kultur-Überständen quantifiziert. Außerdem wurde die Proliferation der Zellen durch ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt (2.2.1.12). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 zusammengefasst.

Bei Milzzellen aus nicht-infizierten Mäusen war eine Antigen-abhängige IL-2-Produktion der Zellen zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die T-Zellen in diesem System funktional waren (Abb. 3.9, A). Obwohl sie *in vivo* nie Kontakt zu ihrem Antigen hatten, ließen sie sich hierdurch *in vitro* aktivieren. Milzzellen aus infizierten Mäusen dagegen produzierten maximal 10 % der IL-2-Menge der Milzzellen nicht-infizierter Mäuse.

Außerdem war eine starke Induktion von IFN- γ bei den Milzzellen aus infizierten Mäusen detektierbar (Abb. 3.9, B). Sie sezernierten teilweise um den Faktor 15 mehr IFN- γ als die Kontrollen. Dabei führten hier schon extrem geringe Antigen-Mengen zu höchster Zytokin-Produktion in den Proben aus infizierten Tieren. Es war in diesem Fall allerdings bereits ohne Antigen-Zugabe eine - jedoch vergleichsweise geringe - Produktion von IFN- γ festzustellen. Diese wurde möglicherweise durch NK-Zellen verursacht, die in den Gesamtmilzzellen vorhanden sein können.

Die Milzzellen aus infizierten Mäusen zeigten eine nur etwa halb so hohe Proliferation wie die aus nicht-infizierten Mäusen (Abb. 3.9, C).

Von den Zellen aus den infizierten Mäusen waren zirka 50 % mit Trypanosomen infiziert, wie aus hier nicht gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Milzzellen (Cytospins, 2.2.4.1) ersichtlich wurde.

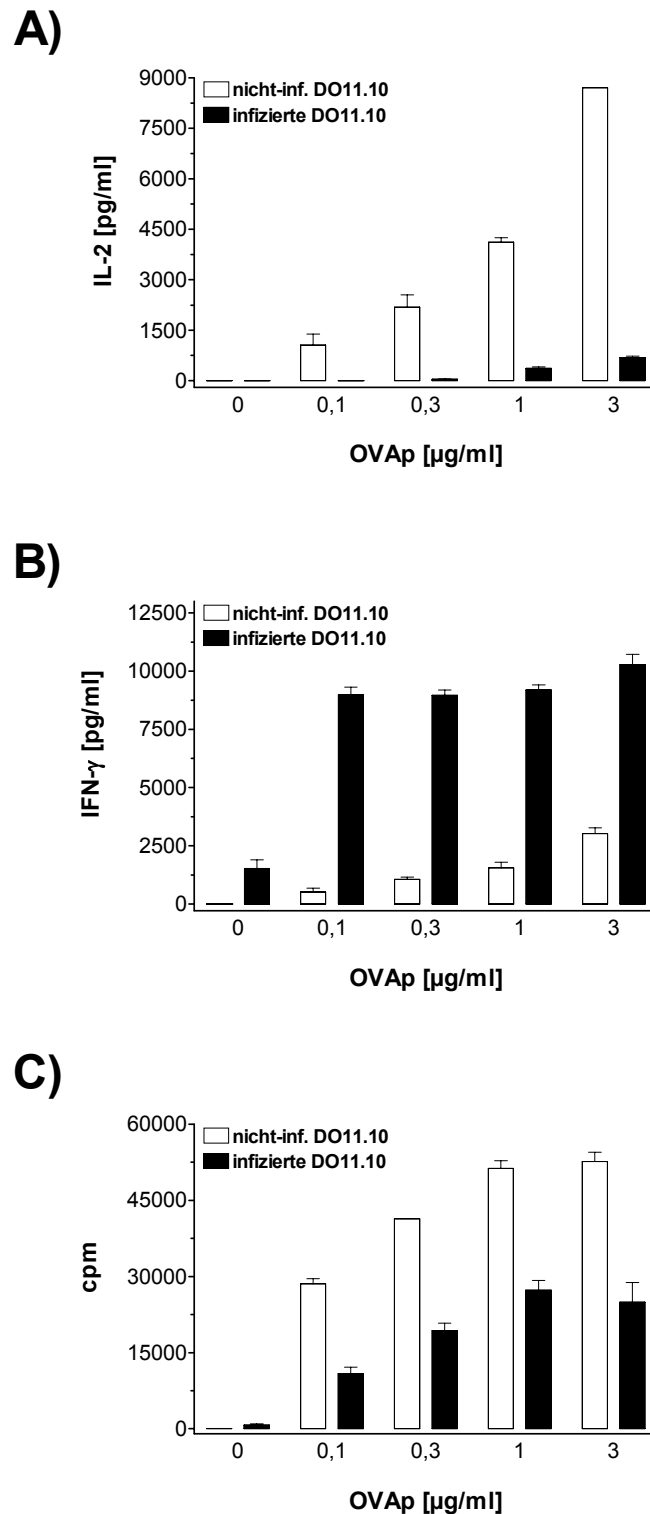


Abb. 3.9: Stimulation von Milzzellen aus infizierten DO11.10-TCR-transgenen Mäusen.

2×10^5 frisch präparierte Milzzellen aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) DO11.10-TCR-transgenen Mäusen (Tag 16 p.i.) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Ova-Peptid stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentrationen von IL-2 (A) und IFN- γ (B) mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (C).

3.1.9 Kinetik der *in vivo* -Infektion von DO11.10-TCR-transgenen Mäusen

Um zu sehen, wie sich die *T. cruzi*-Infektion zu früheren Zeitpunkten auf die Stimulationsfähigkeit der Milzzellen auswirkt, wurden erneut DO11.10-TCR-transgene Mäuse infiziert. Ihre Milzzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion präpariert, mit Ova-Peptid stimuliert und IL-2 sowie IFN- γ im Kulturüberstand quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die IL-2- bzw. IFN- γ -Produktion der Zellen aus nicht-infizierten Mäusen wurde für die Auswertung mit 100 Prozent gleichgesetzt, und die Zytokin-Produktion der Zellen aus infizierten Mäusen dazu ins Verhältnis gebracht.

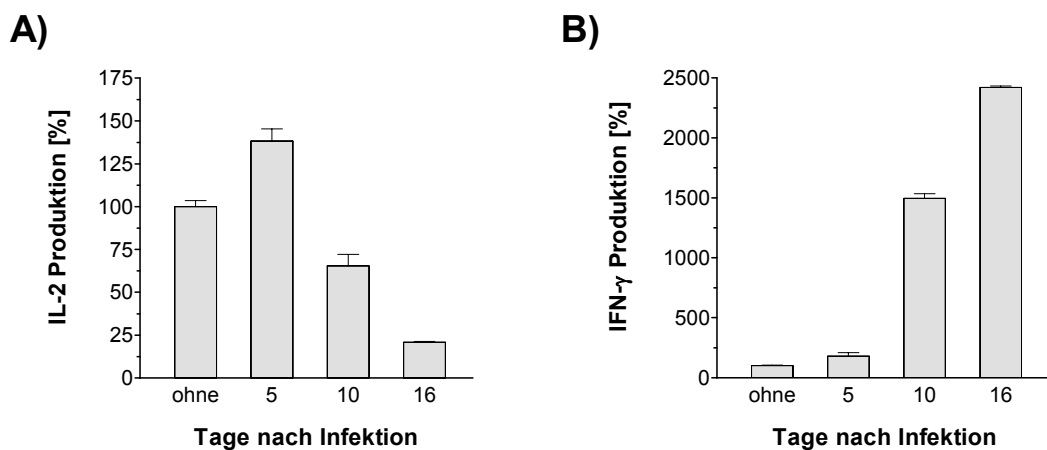


Abb. 3.10: Prozentualer Anteil der IL-2- und IFN- γ -Konzentrationen in Überständen von Milzzellen aus infizierten DO11.10-TCR-transgenen Mäusen.

2×10^5 Milzzellen wurden an den angegebenen Tagen nach Infektion aus infizierten DO11.10-TCR-transgenen Mäusen bzw. den entsprechenden nicht-infizierten Kontroll-Mäusen (ohne) präpariert und mit 1 μ g/ml OVAp stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentrationen von IL-2 (A) und IFN- γ (B) mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Milzzellen *T. cruzi*-infizierter und nicht-infizierter Tiere wurden frühestens 5 Tage nach Infektion präpariert und stimuliert. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei Zellen aus infizierten und nicht-infizierten Mäusen noch eine vergleichbare IL-2-Produktion detektiert werden, d.h. bei den Milzzellen aus infizierten Tieren ließ sich sogar eher noch eine verstärkte IL-2-Sekretion feststellen (Abb. 3.10, A). Die IFN- γ -Konzentrationen in den Überständen beider Zellpopulationen lagen zu diesem Zeitpunkt noch nahe der Nachweisgrenze (Abb. 3.10, B). Am 10. Tag nach Infektion hingegen war die messbare Menge an IL-2 in den Überständen der Zellen aus infizierten Mäusen verglichen mit der nicht-infizierter bereits deutlich reduziert (auf 65 %), am 16. Tag extrem abgesunken (auf 21 %). Parallel dazu wurde bei der Stimulation von Zellen

infizierter Tiere eine stark erhöhte IFN- γ -Produktion sowohl an Tag 10 (um den Faktor 15) als auch an Tag 16 nach Infektion (um den Faktor 24) gemessen. Das heißt, in den Kulturen, in denen eine Verminderung der IL-2-Produktion auftritt, ist gleichzeitig eine Erhöhung der IFN- γ -Produktion zu verzeichnen.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob nicht die hohen IFN- γ -Mengen den inhibitorischen Effekt auf die IL-2-Produktion ausüben könnten. Daher sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Effektor-Zytokine, die bei der *T. cruzi* -Infektion in großen Mengen produziert werden, tatsächlich eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Zell-Antwort haben könnten.

3.2 Bedeutung löslicher Faktoren für den Einfluss der Infektion auf die Stimulation naiver T-Zellen

3.2.1 Blockade von IFN- γ , NO, IL-12 und TGF- β

Da Effektor-Zytokine wie IFN- γ und NO in der *T. cruzi* -Infektion sehr stark induziert werden, und publiziert worden ist, dass in einigen Modell-Systemen Typ 1-Zytokine Anergie induzieren können (Pelletier *et al.*, 1982; Yang *et al.*, 1997; Pedras-Vasconcelos *et al.*, 2002), sollte geklärt werden, ob dies auch im vorliegenden System der Fall sein könnte. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Neutralisation dieser löslichen Mediatoren die Hemmung der IL-2-Produktion in infizierten Kulturen ganz oder teilweise aufheben kann.

Dazu wurden Stimulationsexperimente mit *in vitro* -infizierten PEC und naiven T-Zellen aus DO11.10-Mäusen durchgeführt. Dabei wurden Antikörper gegen IFN- γ , IL-12 und TGF- β 1 zu den Kulturen gegeben. Die Produktion von Stickstoffmonoxid wurde durch Aminoguanidin, einen spezifischen Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) unterbunden (2.2.3.3). Außerdem wurden Ansätze mitgeführt, zu denen Ratte IgG1 als Isotypkontrolle zu den verwendeten monoklonalen Antikörpern hinzugegeben wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die IL-2-Produktion nicht-infizierter Kulturen wurde für die Auswertung gleich 100 % gesetzt, und die IL-2-Produktion der infizierten Kulturen mit und ohne Blockade-Agenzien dazu ins Verhältnis gebracht.

Ohne Zusatz blockierender Agenzien betrug die IL-2-Produktion infizierter Kulturen 49 % der Produktion nicht-infizierter Kulturen. Ein signifikanter Anstieg der IL-2-

Konzentration in infizierten Kulturen war in keinem Fall zu beobachten. Wurden IFN- γ , NO, IL-12 oder TGF- β im T-Zell-Stimulationsexperiment neutralisiert, war also die gleiche Inhibition in der IL-2-Produktion der T-Zellen festzustellen wie beim Vorliegen dieser Mediatoren.

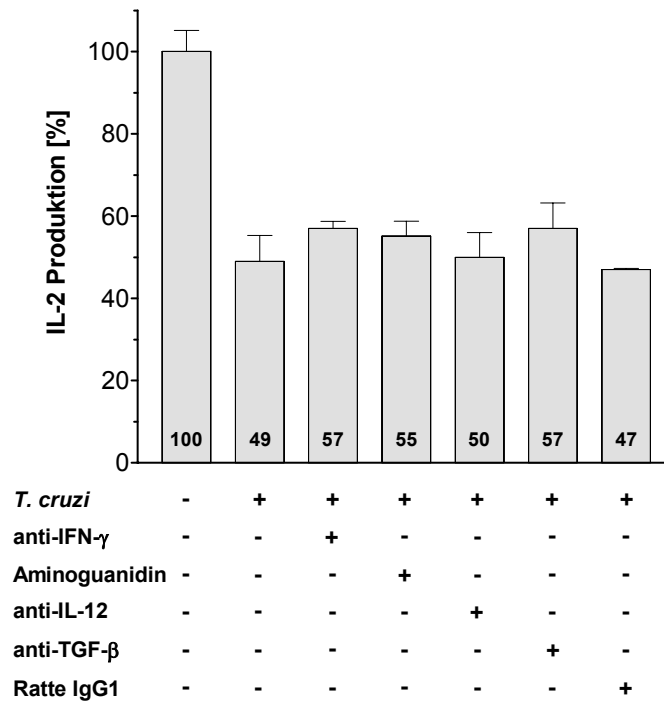


Abb. 3.11: Prozentualer Anteil der IL-2-Konzentration in Überständen von *in vitro*-infizierten PEC bei Neutralisation von IFN- γ , NO, IL-12 oder TGF- β .

2×10^5 PEC wurden mit 4×10^5 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 48-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 3×10^5 frisch präparierte T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen zu den nicht-infizierten oder infizierten PEC hinzugegeben. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-IFN- γ , 3 mM Aminoguanidin, 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL12p40/p70, 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-TGF- β 1 oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Ratte IgG1 mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ OVAp stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

3.2.2 Untersuchung der Wirkung von infizierten PEC aus IL-12-defizienten Mäusen auf die Stimulation naiver T-Zellen

IL-12 ist ein zentrales Zytokin bei der (Antigen-unabhängigen) Aktivierung von T-Zellen, vor allem bei ihrer Differenzierung zu inflammatorischen, IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen, und seine Produktion durch *T. cruzi*-infizierte PEC wurde hier bereits nachgewiesen (siehe 3.1.5). Obwohl die *in vitro*-Blockade von IL-12 keine signifikante Wiederherstellung der IL-2-Produktion in infizierten Kulturen gezeigt hatte, sollte der Einfluss dieses Zytokins noch einmal genauer überprüft werden.

Um festzustellen, inwieweit die verstärkte Freisetzung von IL-12 durch die infizierten Antigen-präsentierenden Zellen für die geminderte IL-2-Produktion der T-Zellen notwendig oder mitverantwortlich sein könnte, wurden für die Stimulation der T-Zellen PEC aus IL-12-defizienten Mäusen eingesetzt. Dabei wurden IL-2 und IL-12 in den Kultur-Überständen quantifiziert und die Proliferation der Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt.

Bei Verwendung von APC aus nicht-infizierten IL-12-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen (WT) im T-Zell-Stimulationsexperiment wurden vergleichbare Mengen an IL-2 produziert (Abb.3.12, A). Bei Stimulation durch PEC aus IL-12-defizienten Mäusen war die IL-2-Konzentration noch etwas höher als bei der Stimulation durch WT-PEC. In den Ansätzen mit infizierten PEC war die IL-2-Produktion dagegen in beiden Fällen stark gehemmt. Bei WT-PEC war sie um 43 % vermindert, bei den PEC aus IL-12-defizienten Mäusen um 68 %. Auch die Proliferation der Zellen war in Anwesenheit von Stimulatoren aus infizierten Mäusen gleichermaßen vermindert (Abb. 3.12, B). T-Zellen, die durch APC aus infizierten Mäusen stimuliert wurden, proliferierten in beiden Fällen deutlich weniger als T-Zellen, die durch APC aus nicht-infizierten Mäusen stimuliert wurden. Die Proliferation der T-Zellen korreliert demnach mit der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2.

Die zur Kontrolle durchgeführte Bestimmung der IL-12-Konzentration in den Kultur-Überständen bestätigte, dass die PEC aus den IL-12-*knockout*-Mäusen nicht zur Produktion dieses Zytokins fähig waren (Abb. 3.12, C).

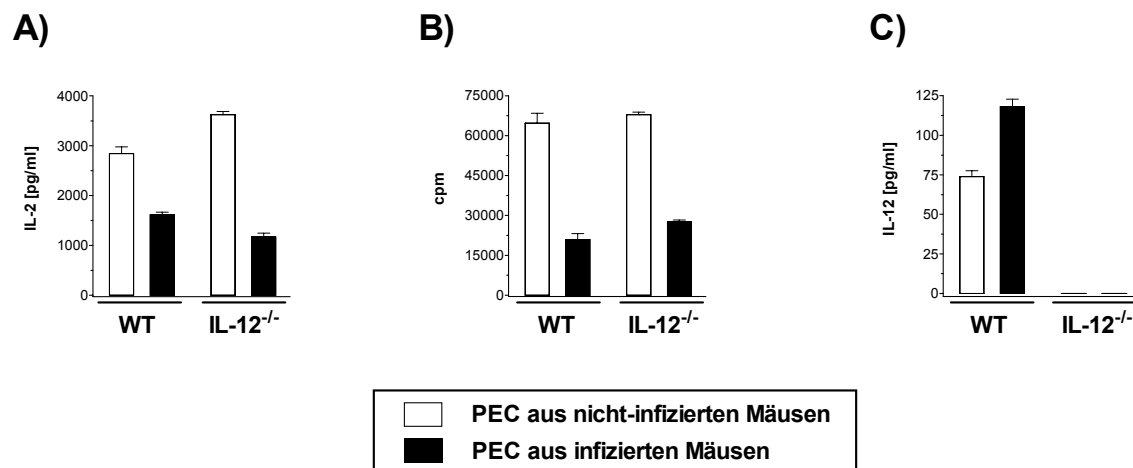


Abb. 3.12: Zytokin-Produktion und Proliferation von OVA-spezifischen naiven DO11.10-T-Zellen bei Stimulation durch *in vivo*-infizierte PEC aus WT versus IL-12^{-/-}-Mäusen.

1x10⁵ PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen oder BALB/c IL-12 p40^{-/-}-Mäusen (Tag 10 p.i.) wurden mit 1x10⁵ frisch präparierten T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,5 µg/ml OVA_p stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentrationen von IL-2 (A) und IL-12 (C) mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (B).

Wurden PEC aus IL-12-defizienten Mäusen im T-Zell-Stimulationsexperiment eingesetzt, war also die gleiche Inhibition in der IL-2-Produktion der T-Zellen festzustellen wie bei PEC aus WT-Mäusen. Es scheint diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zwischen einer Infektion von IL-12-defizienten Mäusen, die keine starke T_H1-Antwort induzieren können, und einer Infektion von WT-Mäusen zu bestehen.

3.2.3 Analyse anti-inflammatorischer Zytokine in infizierten Zellkulturen

Die durch *T. cruzi*-Infektion der APC ausgelöste Hemmung der T-Zell-Antwort (Immunsuppression) scheint weder durch eine Inhibierung der Antigen-Präsentation noch durch die starke Produktion von T_H1-Zytokinen oder NO verursacht zu werden. Daher müssen andere Mechanismen zur Vermittlung des auftretenden immunsuppressiven Effektes existieren. Eine Möglichkeit dazu läge in der gesteigerten Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine. Daher sollte überprüft werden, ob bei der Infektion von Milzzellen eine Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 festzustellen ist.

Obwohl die *in vitro*-Neutralisation von TGF-β1 nicht darauf hingedeutet hatte, dass dieses Zytokin eine große Rolle bei der IL-2-Hemmung spielt, wurde des weiteren untersucht, ob zwischen nicht-infizierten und *T. cruzi*-infizierten PEC-Kulturen ein

Unterschied in der Produktion von TGF- β 1 festzustellen ist. TGF- β 1 gehört ebenfalls zu den anti-inflammatorischen Botenstoffen und wirkt hemmend auf das Zellwachstum.

Abbildung 3.13 zeigt jedoch, dass weder im Fall von TGF- β 1 (A) noch von IL-10 (B) ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen im Kultur-Überstand nicht-infizierter und *T. cruzi*-infizierter Zellen detektierbar ist.

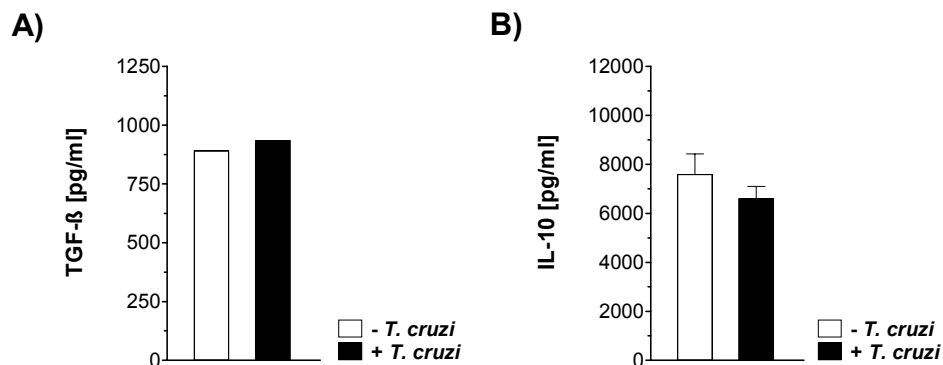


Abb. 3.13: TGF- β und IL-10-Produktion in Überständen von *in vitro*-infizierten versus nicht-infizierten Zellen.

(A) 4×10^5 aus BALB/c-Mäusen präparierte PEC wurden mit 2×10^6 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden freie Trypomastigoten entfernt. 96 Stunden später wurde der Überstand der nicht-infizierten (weiße Balken) oder infizierten (schwarze Balken) Kulturen abgenommen und die Konzentration von TGF- β 1 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

(B) 1×10^5 aus DO11.10-TCR-transgenen-Mäusen präparierte Milzzellen wurden mit 1×10^4 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden freie Trypomastigoten entfernt und die Kulturen mit 0,5 μ g/ml OVAp stimuliert. 96 Stunden später wurde der Überstand der nicht-infizierten (weiße Balken) oder infizierten (schwarze Balken) Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-10 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass T_H1 -Zytokine in infizierten Kulturen induziert, inhibitorische Zytokine aber nicht verstärkt sezerniert werden.

3.2.4 Untersuchung der Wirkung von Überständen infizierter PEC auf die Stimulation naiver T-Zellen

Da nicht alle löslichen Faktoren, die als supprimierende Agenzien in der Infektion eine Rolle spielen könnten, einzeln überprüft werden können, wurden als nächstes naive Milzzellen in Anwesenheit von Kultur-Überständen nicht-infizierter bzw. infizierter PEC mit Peptid stimuliert. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der Kultur-Überstände verwendet. Schließlich wurden die Produktion von IL-2 und IFN- γ sowie

die Proliferation der stimulierten Milzzellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

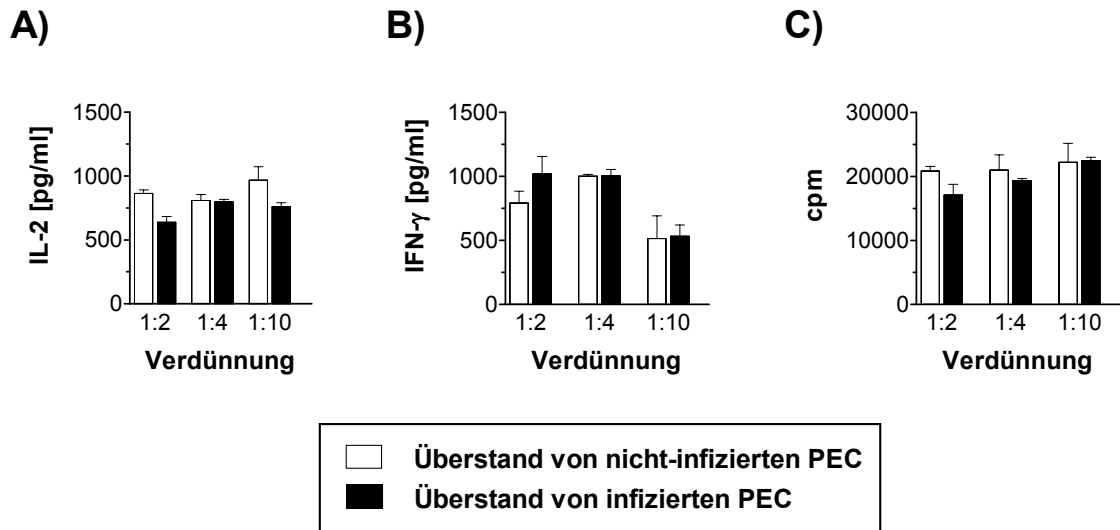


Abb. 3.14: Zytokin-Produktion und Proliferation von Milzzellen bei Stimulation in Gegenwart von Überständen von *in vitro*-infizierten versus nicht-infizierten PEC.

4×10^5 PEC wurden mit 2×10^6 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 24-stündiger *in vitro*-Infektion wurden freie Trypomastigoten entfernt. 96 Stunden später wurde der Überstand gesammelt und in verschiedenen Verdünnungen zu jeweils 2×10^5 frisch präparierten Milzzellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen gegeben. Nach 48-stündiger Stimulation der Zellen mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p in Gegenwart des Überstands nicht-infizierter (weiße Balken) oder infizierter (schwarze Balken) PEC wurde das Medium der Kulturen abgenommen und die Konzentrationen von IL-2 (A) und IFN- γ (B) mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (C).

Abbildung 3.14 zeigt, dass eine leichte Verringerung der IL-2-Produktion bei den Milzzellen auftrat, die in Gegenwart der Überstände infizierter APC stimuliert wurden (A). Signifikante Differenzen in der IFN- γ -Produktion (B) und Proliferation (C) waren nicht zu verzeichnen. Dieser geringe Abfall der IL-2-Produktion in Gegenwart von „Infektions-Überständen“ kann nicht die großen Effekte (bis hin zu einer 90 %-igen Reduktion) erklären, die bisher *in vitro* zu beobachten waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Inhibition der untersuchten löslichen Mediatoren und Effektor-Zytokine kein IL-2-Anstieg verzeichnet werden konnte. Die betrachteten Effektor-Zytokine sind demnach in diesem System nicht die Ursache der immunsuppressiven Wirkung der *T. cruzi*-Infektion auf die T-Zell-Antwort. Generell konnte ausgeschlossen werden, dass lösliche Faktoren hauptverantwortlich für die als Folge der Infektion verminderte IL-2 bzw. gesteigerte IFN- γ -Produktion sind.

3.2.5 Blockade des direkten Zellkontaktes infizierter APC mit T-Zellen

Da in Transfer-Experimenten mit den Überständen von infizierten APC keine überzeugenden Effekte löslicher Mediatoren gezeigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob ein kontaktabhängiger Mechanismus für die beobachtete Immunsuppression in der *T. cruzi*-Infektion verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage sollte der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen infizierten APC und den zu stimulierenden Zellen blockiert werden. Dafür wurde ein Transwell-Membran-System eingesetzt, durch das mit Hilfe einer Membran eine zweite Kammer innerhalb desselben Zellkulturgefäßes geschaffen wird. Infizierte APC in der unteren Kammer werden durch die Membran an dem direkten Zellkontakt mit Milzzellen in der oberen Kammer gehindert. Beide Zellpopulationen befinden sich jedoch in demselben Medium, und Proteine wie z.B. das Antigen, Zytokine oder andere lösliche Faktoren können die Membran passieren. Der Aufbau dieses Systems ist in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

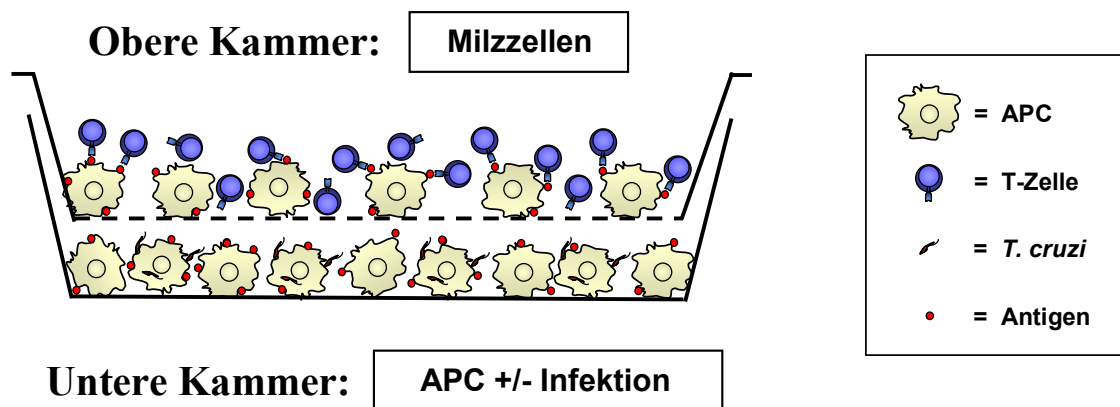


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des Transwell-Membran-Systems zur Blockade des direkten Kontaktes von *T. cruzi*-infizierten APC mit T-Zellen.

PEC aus *T. cruzi*-infizierten bzw. nicht-infizierten BALB/c-Mäusen wurden in der unteren Kammer eines Transwell-Einsatzes kultiviert. Sie wurden durch eine Membran mit der Porengröße von 0,2 µm von Milzzellen aus nicht-infizierten DO11.10-Mäusen getrennt, die in der oberen Kammer kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit Ova-Peptid stimuliert.

Für die praktische Durchführung (vgl. 2.2.3.4) wurden PEC aus nicht-infizierten bzw. *T. cruzi*-infizierten Mäusen in der unteren Kammer des Transwells kultiviert und Milzzellen aus nicht-infizierten DO11.10-Mäusen in der oberen Kammer. Hier konnten keine reinen T-Zellen verwendet werden, da es für ihre Antigen-abhängige Stimulation notwendig ist, dass sie direkten Kontakt zu den APC haben. Die Ergebnisse der Quantifizierung von IL-2 im Kulturüberstand der Transwell-Experimente sowie der

Kontroll-Experimente, bei denen eine direkte Zell-Zell-Interaktion nicht unterbunden wurde, sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

In Anwesenheit von nicht-infizierten PEC wurde bei direktem Zellkontakt zu den Milzzellen erwartungsgemäß deutlich mehr IL-2 im Kulturüberstand detektiert als in reinen Milzzell-Kulturen, die als zusätzliche Kontrollen mitgeführt wurden (Abb. 3.16, ohne Transwell). Die PEC als hinzukommende exogene APC führen zu einem größeren Angebot an Stimulatoren und damit präsentiertem Antigen für die T-Zellen. Wurden dagegen PEC aus infizierten Mäusen eingesetzt, so war - wie in den zuvor beschriebenen Infektions- und Stimulationsexperimenten auch - eine starke Suppression der IL-2-Produktion festzustellen (Abb. 3.16, ohne Transwell). Dabei sank die Menge an produziertem IL-2 noch unter die Menge, die in reinen Milzzell-Kulturen zu detektieren war (48 h). Das heißt, hier ist ein sehr starker, dominanter Effekt der IL-2-Suppression zu beobachten. Denn obwohl zusätzlich sehr viele aus der Milz stammende nicht-infizierte APC (wie B-Zellen, Makrophagen und DC) im System anwesend sind, können die infizierten PEC die IL-2-Produktion naiver nicht-infizierter Milzzellen inhibieren. Das bedeutet, dass einige wenige infizierte Makrophagen dazu in der Lage sind, eine große Überzahl an Zellen zu supprimieren.

Wenn Transwell-Membranen die infizierten APC von den nicht-infizierten Milzzellen separierten, war dagegen keine Hemmung der IL-2-Produktion zu beobachten (Abb. 3.16, Transwell-System). In den Kulturen mit PEC aus infizierten Mäusen in der oberen Kammer war nach 48 Stunden sogar eine höhere IL-2-Konzentration zu messen als in denen mit PEC aus nicht-infizierten Mäusen. Das bedeutet, dass die Suppression der IL-2-Produktion von T-Zellen durch infizierte APC kontaktabhängig ist.

Die absoluten Konzentrationen von IL-2, die im Transwell-System gemessen wurden, waren niedriger als die in den Kulturen ohne Transwell-Membran, da durch den fehlenden Zell-Zell-Kontakt weniger APC direkt über Antigen-Präsentation mit den T-Zellen aus der Milz interagieren und diese stimulieren konnten.

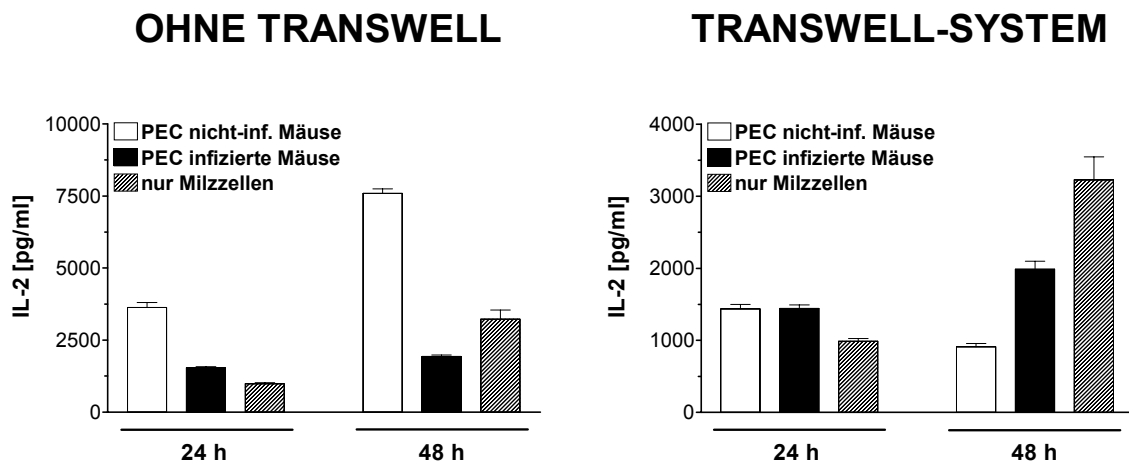


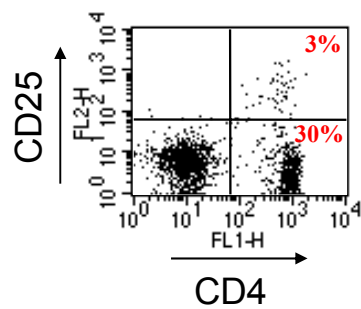
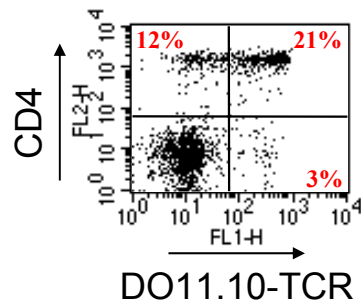
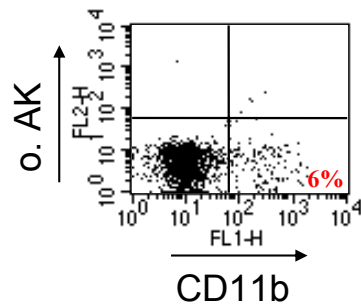
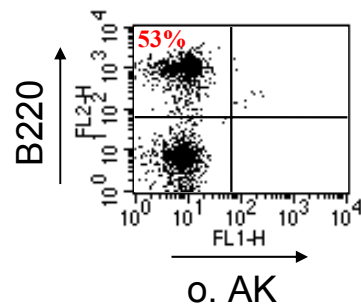
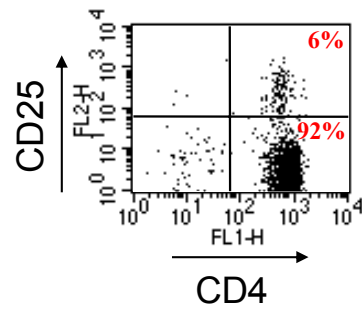
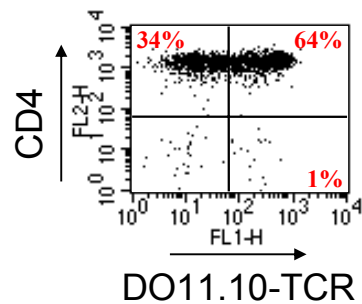
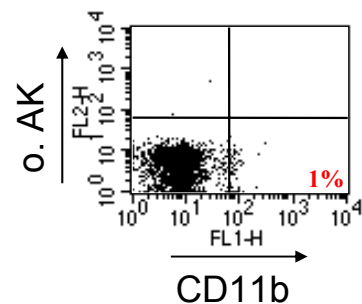
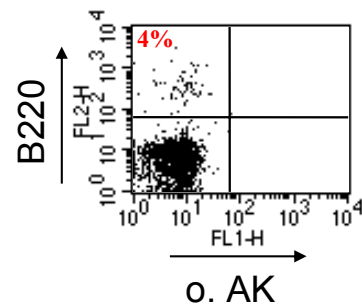
Abb. 3.16: IL-2 Produktion bei Blockade des direkten Kontaktes infizierter APC mit T-Zellen.

1×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen (Tag 11 p.i.) wurden in 96-Loch-Flachbodenplatten pipettiert. 2×10^5 frisch präparierte Milzzellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen wurden entweder direkt dazugegeben (ohne Transwell, links) oder aber nach Einhängen von Gewebekultur-Einsätzen in die obere Kammer des Transwells pipettiert (Transwell, rechts). Als zusätzliche Kontrolle wurden Milzzellen ohne PEC als exogene APC eingesetzt (schraffierte Balken). Die Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ OVAp stimuliert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Gewebekultur-Einsätze herausgenommen, die Kultur-Überstände aus beiden Kammern vereinigt und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Da diese Daten eine Kontaktabhängigkeit der Immunsuppression in dem vorliegenden Modell für eine *T. cruzi*-Infektion bestätigt haben, sollten im folgenden Teil der Arbeit mögliche kontaktabhängige Faktoren näher untersucht werden.

3.3 Vergleich verschiedener Methoden der Isolierung von T-Zellen aus der Milz

Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass für die im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente die T-Zellen nicht mehr über Nylonwolle-Säulen aus Milzzellen isoliert wurden, sondern mit Hilfe eines Sets Magnetpartikel-gekoppelter Antikörper negativ selektioniert wurden (vgl. 2.2.1.9). Die so isolierten Zellen wurden per FACS-Analyse auf ihre Reinheit hin untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.17 in Form von *Dotplots* dargestellt. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine einzelne Zelle, von denen 10.000 pro Probe ausgewertet wurden. Der Übersichtlichkeit halber sind hier dreiviertel der Punkte ausgeblendet.

Vor Aufreinigung:**Nach Aufreinigung:****Abb. 3.17: Durchflußzytometrische Analyse von Milzzellen und den daraus isolierten T-Zellen.**

Milzzellen wurden vor und nach Anreicherung der T-Zellen mit Hilfe des $CD4^+$ T Cell Isolation Kit mittels Durchflußzytometrie auf die Expression der Oberflächenproteine B220, CD11b, CD4, DO11.10-TCR und CD25 hin untersucht. Die Zellen wurden mit B220-PE, CD11b-FITC oder einer Kombination aus DO11.10 TCR-FITC/CD4-PE bzw. CD4-FITC/CD25-PE gefärbt. Für die Auswertung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

Im Vergleich der Zellen vor und nach Aufreinigung zeigte sich, dass die Populationen der B220-positiven B-Zellen und der CD11b-positiven Makrophagen durch die Aufreinigung fast vollständig verschwanden. Die statistische Auswertung ergab, dass die aufgereinigten Zellen nur noch einen sehr geringen Teil an B-Zellen (4 % anstelle von 53 %) und Makrophagen (1 % anstelle von 6 %) enthielten, die als unerwünschte endogene APC dienen könnten. Weiter zeigte sich, dass die aufgereinigten Zellen zu mehr als 98 % positiv für CD4 waren. Insgesamt waren 64 % positiv für den transgenen T-Zell-Rezeptor und 6 % wiesen CD25 auf ihrer Oberfläche auf.

Auch vor dem Test der Negativ-Selektions-Methode war die Reinheit von T-Zellen - nach ihrer Isolierung mit Hilfe verschiedenster Methoden - regelmäßig durchflußzytometrisch überprüft worden. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der einzelnen Anreicherungsverfahren zusammengefasst.

Tab. 3.2: Gegenüberstellung verschiedener Methoden der T-Zell-Anreicherung.

Die Zahlen geben den Prozentsatz der Zellpopulation an, der das untersuchte Oberflächenprotein exprimiert. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 7 unabhängigen Experimenten. n.d.: nicht durchgeführt.

Oberflächen-protein	Gesamtmilz (%)	Anreicherung über Nylonwolle (%)	Adhärenz und Nylonwolle (%)	Nylonwolle und CD11b-MACS-Depletion (%)	CD90-MACS-Selektion (%)	Isolierung über <i>CD4⁺ T Cell Isolation Kit</i> (%)
B220	57	17	10	8	18	4
CD11b	6	12	7	12	8	1
CD4	27	58	69	62	66	98
DO11.10-TCR	20	45	n.d.	48	47	65
$\alpha\beta$ -TCR	26	57	85	n.d.	n.d.	n.d.

Bei einem Vergleich der einzelnen Methoden fällt auf, dass mit der Isolierung über den *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* die höchste Reinheit der T-Zellen zu erzielen ist. Die Anreicherung über Nylonwolle-Säulen hatte zwar vereinzelt zu *CD4⁺ T-Zell*-Anteilen von über 80 % geführt, schnitt mit einem Mittelwert von 58 % jedoch insgesamt am schlechtesten ab. Wurden die Milzzellen vor der Aufreinigung über Nylonwolle zunächst für ein- bis zwei Stunden in Plastik-Gewebekulturflaschen vorinkubiert, um eine Adhärenz von Makrophagen und B-Zellen an die Plastikoberfläche zu

ermöglichen, konnte der Anteil an T-Zellen noch etwas erhöht werden (Spalte 4, Adhärenz und Nylonwolle).

Die Depletion von CD11b-positiven Zellen mit Hilfe von Magnetpartikel-gekoppelten Antikörpern im Anschluss an die Nylonwolle-Anreicherung führte zu keiner Verbesserung gegenüber einer einfachen Anreicherung, ebenso wenig war eine Selektion von CD90-positiven Zellen mit Hilfe von Magnetpartikel-gekoppelten Antikörpern signifikant besser als eine Anreicherung über Nylonwolle-Säulen.

Da das *T Cell Isolation Kit* der Firma Miltenyi erst im Verlauf dieser Arbeit entwickelt und auf den Markt gebracht wurde, war zuvor die Anreicherung über Nylonwolle-Säulen (mit vorheriger Adhärenz) die etablierte Methode zur T-Zell-Isolierung. Um reinere T-Zell-Populationen für die Stimulationsexperimente zu erhalten, wurde schließlich die Negativ-Selektion mit Hilfe des Kits gewählt.

3.4 Bedeutung von CTLA-4 und Kostimulation für die Immunsuppression durch Infektion von APC

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die infektionsbedingte Immunsuppression kontaktabhängig ist, wurde als nächstes überprüft, ob *T. cruzi*-infizierte APC die Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle auf den T-Zellen induzieren können und auf diese Weise die IL-2-Suppression bewirken.

Ein interessanter Kandidat für ein solches inhibitorisches Molekül ist CTLA-4. CTLA-4 besitzt eine Sequenzhomologie zu CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird und kostimulatorische Signale vermittelt. Die Bindung von CD28 an seine Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Oberfläche von APC vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zellen, erhöht die Expression anti-apoptotischer Faktoren und stimuliert die Produktion von IL-2. CTLA-4 bindet mit B7.1 und B7.2 dieselben Liganden wie CD28, allerdings mit 20-mal höherer Affinität. Dabei inhibiert ein Engagement von CTLA-4 jedoch die Proliferation der T-Zellen, indem die Expression des IL-2-Rezeptors reduziert, die IL-2-Produktion vermindert und der Zellzyklus arretiert werden. Es ist demzufolge als negativer Regulator aktiv.

Für Infektionen mit *Leishmania donovani* konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 zu einer verstärkten Resistenz des Wirtes führt (Murphy *et al.*, 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass die CTLA-4-Expression auf der Oberfläche von T-Zellen bei der Infektion von Mäusen mit *T. cruzi* erhöht wird (Sebastian Graefe;

persönliche Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass möglicherweise das Engagement von CTLA-4 für die IL-2-Suppression verantwortlich ist.

Ein Vergleich der CTLA-4-Expression auf DO11.10-T-Zellen von infizierten und nicht-infizierten Proben aus Stimulationsexperimenten durch fluoreszenzmikroskopische Analyse deutete darauf hin, dass auf der Oberfläche von T-Zellen aus infizierten Kulturen mehr CTLA-4 vorzufinden ist als auf der von T-Zellen nicht-infizierter Kulturen (Daten nicht gezeigt). Um die Bedeutung von CTLA-4 für die beobachtete Beeinflussung der T-Zell-Antwort durch die Infektion zu untersuchen, sollte es in Stimulationsexperimenten blockiert werden. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper gegen CTLA-4 eingesetzt. Da bivalente Gesamtantikörper gegen CTLA-4 möglicherweise durch Kreuzvernetzen ein inhibitorisches Signal auslösen können, wurden zusätzlich monovalente Fab-Fragmente verwendet, die ein solches Signal über CTLA-4 wirklich blockieren. Der Antikörper bzw. das Fab-Fragment wurden vor der Antigen-Stimulation in einer Endkonzentration von 10 µg/ml und 100 µg/ml zu T-Zell-Assays mit PEC aus nicht-infizierten bzw. infizierten Mäusen und naiven T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen zugesetzt. Nach 24- und 48-stündiger Stimulation wurden Kultur-Überstände abgenommen und die IL-2-Produktion untersucht. Zusätzlich wurde die Proliferation der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Blockaden nach einer Stimulation von 24 Stunden sind in Abb. 3.18 zusammengefasst.

Die Blockade von CTLA-4 konnte im Vergleich zur Kontrolle (o. AK) weder nach 24 (Abb. 3.18, oben) noch nach 48 Stunden (nicht gezeigt) die durch die *T. cruzi*-Infektion ausgelöste Inhibition der IL-2-Produktion verringern. T-Zellen, die durch PEC aus infizierten Mäusen stimuliert wurden, sezernierten nur etwa 20 % der Zytokinmenge, die T-Zellen bei Stimulation durch PEC aus nicht-infizierten Mäusen freisetzten. Nach 48 Stunden verstärkten die Fab-Fragmente gegen CTLA-4 zwar die IL-2-Produktion in Ansätzen mit PEC nicht-infizierter Mäuse, die Produktion von IL-2 in Ansätzen mit PEC aus infizierten Mäusen blieb jedoch auch hier unverändert niedrig (nicht gezeigt). Die Hypothese, dass eine verstärkte CTLA-4-Wirkung in der Infektion die Suppression der IL-2-Produktion bedingt, kann durch diese Ergebnisse nicht bestätigt werden.

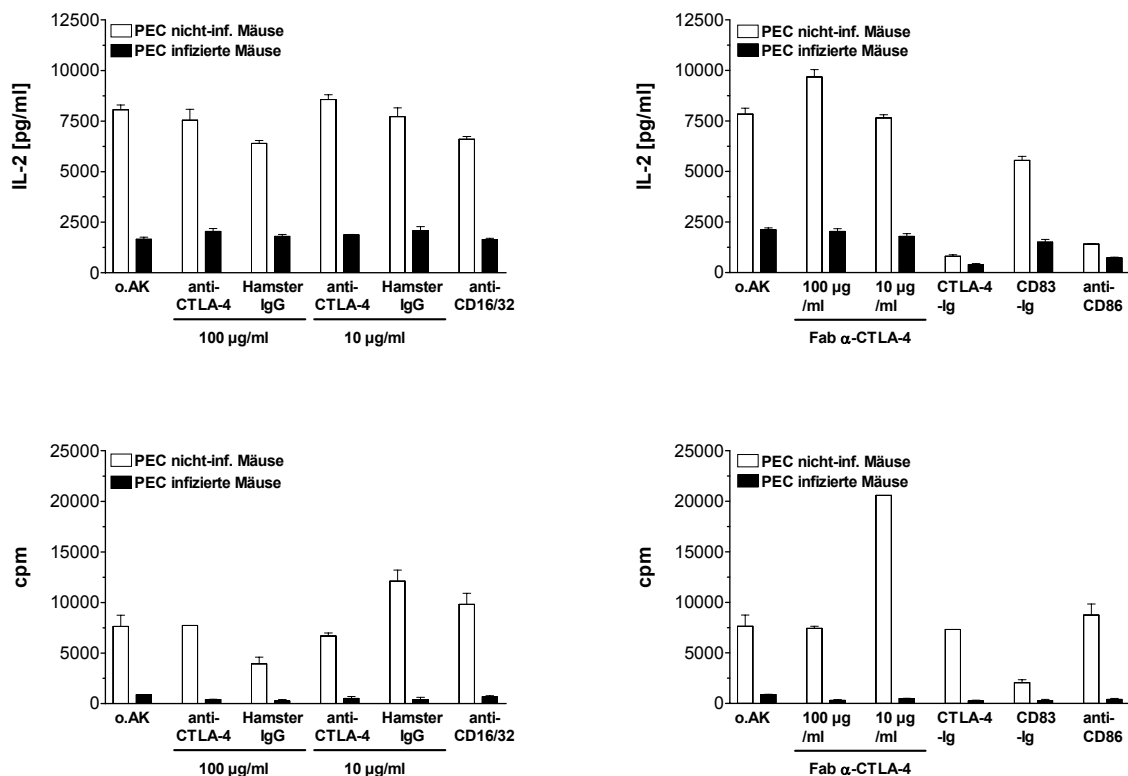


Abb. 3.18: IL-2 Produktion und Proliferation von T-Zellen bei Blockade verschiedener Kostimulationswege.

1×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen (Tag 17 p.i.) wurden mit 2×10^5 frisch präparierten T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Außerdem wurden folgende Agenzien zugegeben: 10 oder $100 \mu\text{g/ml}$ anti-CTLA-4 bzw. die entsprechende Isotypkontrolle (Hamster IgG1, κ), 10 oder $100 \mu\text{g/ml}$ Fab-Fragment von anti-CTLA-4, $50 \mu\text{g/ml}$ CTLA-4-Ig bzw. CD83-Ig oder $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD86. In jedem Antikörper-enthaltenden Ansatz wurden die Fc-Rezeptoren durch Zusatz von $10 \mu\text{g/ml}$ anti-CD16/CD32 geblockt. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt (obere Reihe). Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (untere Reihe).

In 3.1.2 wurde nachgewiesen, dass eine Infektion von APC zur verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.2 führt. Die B7-Moleküle erhöhen eigentlich die Kapazität der APC, die Produktion von IL-2 von T-Zellen zu induzieren. Um diesen Einfluss von B7.2 auf die Stimulation von T-Zellen in unserem System zu überprüfen, wurde dieses kostimulatorische Molekül unabhängig von der CTLA-4-Blockade durch spezifische Antikörper maskiert (anti-CD86). Dadurch wurde die IL-2-Produktion der T-Zellen in beiden Ansätzen deutlich blockiert (Abb. 3.18, oben rechts).

Ferner wurde die Kostimulation mit Hilfe von CTLA-4-Ig-Fusionsmolekülen unterdrückt. CTLA-4-Ig bindet mit hoher Affinität an B7.1 und B7.2 und verhindert dadurch deren Bindung an CD28 auf den T-Zellen. Die IL-2-Produktion der T-Zellen

ließ sich mit einem Überschuss an CTLA-4-Ig noch massiver unterdrücken als durch die Blockade von B7.2 alleine (Abb. 3.18, oben rechts). Das belegt die Wichtigkeit der Kostimulation (vor allem über B7.2) für die T-Zell-Aktivierung. Ein zur Kontrolle eingesetztes CD83-Ig-Fusionsmolekül hatte keine deutliche Auswirkung auf die IL-2-Produktion der T-Zellen. Die Wirkung von CTLA-4-Ig ist also auf CTLA-4, nicht den Ig-Teil, zurückzuführen.

In der Proliferation ist der immunsuppressive Effekt durch die Infektion der APC noch deutlicher zu sehen (Abb. 3.18, untere Reihe). Bei Stimulation durch infizierte PEC wurden die T-Zellen in ihrer Proliferation massiv unterdrückt.

3.5 Restimulation von T-Zellen nach vorhergehender Stimulation durch infizierte APC

Eine weitere Möglichkeit für eine Immunsuppression besteht darin, dass die T-Zellen durch infizierte APC aktiviert und danach durch Apoptose eliminiert werden. Das ist jedoch unwahrscheinlich, da Färbungen mit Trypanblau bestätigten, dass die Zellen in den Stimulationsexperimenten lebten. Alternativ zur Apoptose ist es möglich, dass eine Anergie der T-Zellen auftritt. Um zu überprüfen, ob die T-Zellen nach einer Stimulation durch infizierte APC noch leben, und inwieweit sie danach noch restimulierbar sind, wurden T-Zell-Übertragungsexperimente durchgeführt.

Dazu wurden naive T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen Antigen-spezifisch durch PEC aus nicht-infizierten bzw. infizierten Mäusen stimuliert. Nach der Stimulation wurden die T-Zellen von den PEC getrennt und im Anschluss an eine dreitägige Ruhephase durch PEC aus nicht-infizierten Mäusen erneut stimuliert. IL-2-Produktion und Proliferation der Zellen wurden untersucht.

Die folgende schematische Darstellung (Abb. 3.19) soll den Versuchsablauf eines solchen Transfer-Experimentes zur Restimulation von T-Zellen veranschaulichen:

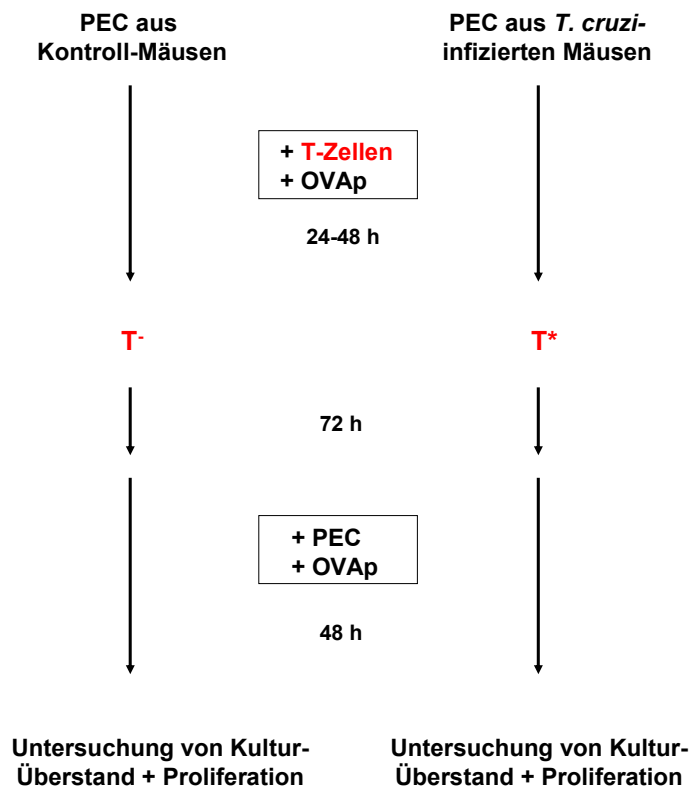


Abb. 3.19: Schematische Darstellung zur Durchführung von Transfer-Experimenten.

PEC aus *T. cruzi*-infizierten bzw. nicht-infizierten BALB/c-Mäusen wurden mit naiven DO11.10-T-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden mit Ova-Peptid stimuliert. Nach 24-48 Stunden wurden die T-Zellen von den PEC getrennt und für weitere 72 Stunden kultiviert. Danach erfolgte eine Restimulation der Zellen unter Zugabe von frisch präparierten nicht-infizierten PEC und Ova-Peptid. 48 Stunden später wurden die Kultur-Überstände zur Zytokin-Bestimmung abgenommen und die Proliferation der Zellen untersucht. T⁻: T-Zellen, die durch nicht-infizierte PEC stimuliert wurden; T^{*}: T-Zellen, die durch *T. cruzi*-infizierte PEC stimuliert wurden.

Auch bei Restimulation durch nicht-infizierte PEC produzierten die T-Zellen, die zuvor durch infizierte APC stimuliert worden waren, sehr viel weniger IL-2 als die T-Zellen, die zuvor durch nicht-infizierte APC stimuliert worden waren (Abb. 3.20, A). Das deutet darauf hin, dass T-Zellen, die einmal von *T. cruzi*-infizierten APC stimuliert worden sind, auch dann noch einen Defekt haben, wenn sie auf nicht-infizierte APC treffen. Der inhibierende Einfluss infizierter APC auf die T-Zellen scheint demnach ein lang anhaltender Effekt zu sein.

Bei beiden Gruppen von T-Zellen ist in Anwesenheit von Antigen eine deutliche Proliferation zu messen (Abb. 3.20, B), wobei die T-Zellen, die ursprünglich durch PEC infizierter Mäuse stimuliert worden waren, weniger stark proliferierten. Die insgesamt jedoch hohe Proliferation zeigt, dass die Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen viabel sind. Zusätzlich bestätigte eine Lebendfärbung mit Trypanblau, dass die transferierten Zellen nicht tot waren. Die Proliferation der PEC lag in diesem

Versuch an der Nachweisgrenze und deutlich unter der Proliferation der T-Zellen, wie die als Kontrolle mitgeführten Ansätze von PEC ohne Zugabe von T-Zellen darlegten (nicht gezeigt). Es handelt sich bei den gemessenen Werten also wirklich um die Proliferation der betrachteten T-Zellen.

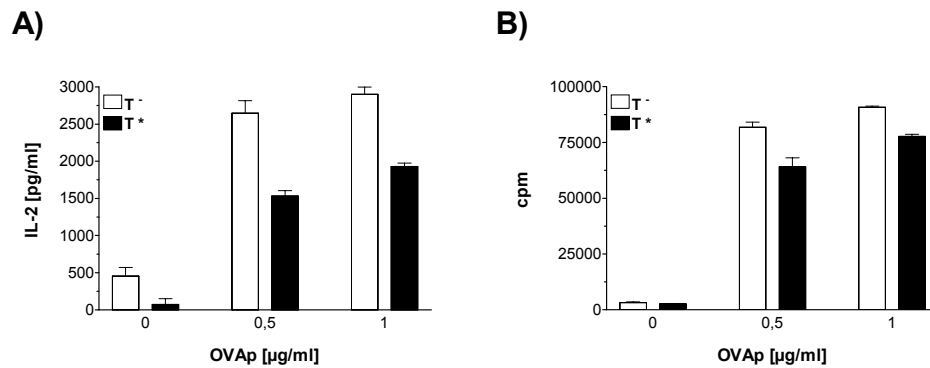


Abb. 3.20: Restimulation von T-Zellen nach vorhergehender Stimulation durch infizierte APC.

3×10^6 PEC aus nicht-infizierten bzw. infizierten BALB/c-Mäusen (Tag 9 p.i.) wurden mit 6×10^6 frisch präparierten T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml OVAp stimuliert. Nach 28 Stunden wurden die T-Zellen abgenommen und jeweils 1×10^5 Zellen pro Ansatz auf 96-Loch-Gewebekulturplatten verteilt. Nach einer dreitägigen Inkubation wurden jeweils 5×10^4 frisch präparierte PEC aus nicht-infizierten BALB/c-Mäusen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 0,5 oder 1 µg/ml OVAp stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt (A). Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (B). T⁻: T-Zellen, die durch nicht-infizierte PEC stimuliert worden waren; T⁺: T-Zellen, die durch *T. cruzi*-infizierte PEC stimuliert worden waren.

Mit Hilfe von T-Zell-Übertragungsversuchen, die diesem Experiment folgten, konnte ausgeschlossen werden, dass die bei der Restimulation von T⁺-Zellen beobachtete Hemmung der IL-2-Produktion durch versehentlich aus der ursprünglichen Stimulationskultur verschleppte infizierte PEC bedingt war. Um solch eine unbeabsichtigte Kontamination definitiv zu verhindern, waren die T-Zellen nach der Abnahme von den infizierten PEC noch einmal mit Hilfe des *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* gereinigt worden, bevor sie restimuliert wurden.

3.6 Vergleich polyklonaler und Antigen-spezifischer Stimulation von T-Zellen nach Infektion

In bisherigen Experimenten wurde die Hemmung der IL-2-Produktion von T-Zellen durch infizierte APC mittels Antigen-spezifischer Stimulation der Zellen ausgelöst. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit sich Zellen trotz *T. cruzi*-Infektion polyklonal, also Antigen-unabhängig stimulieren lassen. Dazu wurden Milzzellen *in vitro* mit Trypanosomen infiziert und ein Teil von ihnen mit Ova-Peptid, der andere Teil mit Antikörpern gegen den CD3-Komplex stimuliert (2.2.3.2). Es wurde eine Kinetik über den Zeitraum von vier Tagen aufgenommen, bei der die IL-2-Produktion der Zellen betrachtet wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.21 dargestellt.

Bei der Antigen-spezifischen Stimulation war die messbare Konzentration an IL-2 in nicht-infizierten und infizierten Kulturen nach 24 Stunden noch identisch und stieg dann im weiteren Zeitverlauf in den nicht-infizierten Kulturen stetig an (Abb. 3.21, A). Ein Vergleich der nicht-infizierten Kulturen mit den infizierten zeigte bei letzteren die bekannte Inhibition der IL-2-Produktion. Alle Zeitpunkte ließen erkennen, dass Milzzellen, die durch ihr Antigen stimuliert wurden, höhere absolute Mengen an IL-2 produzierten als Zellen, die durch anti-CD3 stimuliert wurden. Allerdings tritt ein bemerkenswerter Effekt bei der Stimulation über den CD3-Komplex auf (Abb. 3.21, B): Nicht-infizierte und infizierte Milzzellen sezernierten am ersten Tag noch gleich viel IL-2 - wie bei der Antigen-spezifischen Stimulation auch. Danach jedoch war in den infizierten Kulturen eine deutlich höhere IL-2-Produktion zu messen als in den nicht-infizierten Kulturen. Das Gegenteil der IL-2-Reduktion, die bei der Antigen-spezifischen Stimulation mit Ova-Peptid zu beobachten ist, trat hier auf. Dies deutet darauf hin, dass die T-Zellen prinzipiell stimuliert werden können und generell dazu fähig sind, mit einer Produktion von IL-2 zu antworten. Die beobachteten inhibitorischen Effekte beziehen sich demnach nur auf das Antigen-spezifische Signal, das die T-Zellen von infizierten APC erhalten.

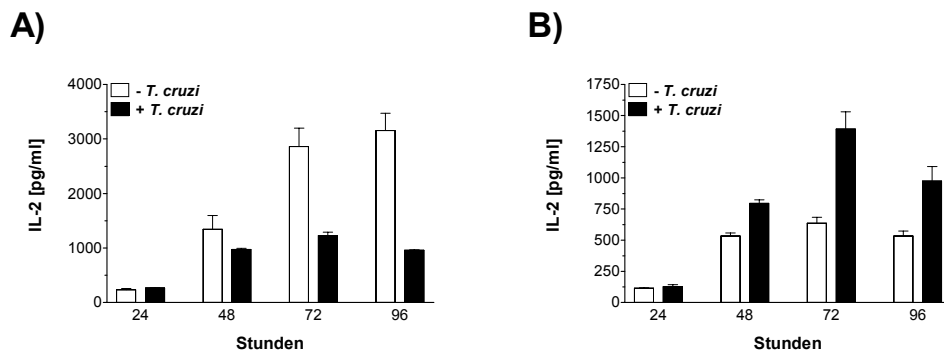


Abb. 3.21: Kinetik der IL-2-Produktion von *in vitro*-infizierten versus nicht-infizierten Milzzellen bei Antigen-spezifischer Stimulation mit OVAp gegenüber polyklonaler Stimulation mit anti-CD3.

1×10^5 aus DO11.10-TCR-transgenen-Mäusen präparierte Milzzellen wurden mit 1×10^4 *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert und je ein Teil der Kulturen mit 0,5 µg/ml OVAp (A) bzw. 3 µg/ml anti-CD3 (B) stimuliert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Überstände der nicht-infizierten (weiße Balken) und infizierten (schwarze Balken) Kulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

3.7 Analyse der Interaktion der *T. cruzi* -*trans*-Sialidase mit CD43 auf T-Zellen

T. cruzi exprimiert eine sogenannte *trans*-Sialidase (TS). Diese stellt eine einzigartige Oberflächen-Sialidase dar, welche Sialinsäurereste von Wirts-Donor-Molekülen auf Mucin-ähnliche Akzeptor-Glykoproteine überträgt. Die TS ist auf der Parasitenmembran GPI-verankert und kann während der akuten *T. cruzi*-Infektion des Menschen in relativ hohen Mengen ins Serum freigesetzt werden. Die Oberflächen-TS wird für die Invasion des Parasiten in Säuger-Zellen benötigt, während die lösliche TS ein Virulenzfaktor zu sein scheint, der zumindest die Parasitämie und Mortalität von *T. cruzi*-infizierten Mäusen verstärkt. Kürzlich erschienene Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass lösliche TS die Invasion von Makrophagen durch die Trypanosomen verstärkt, Apoptose in Zellen des Immunsystems auslöst und über eine Aktivierung von Helfer-Zellen die T-Zell-Antworten *in vitro* erhöht. Todeschini *et al.* (2002) entdeckten jüngst, dass lösliche TS *in vivo* eine $CD4^+$ T-Zell-Aktivierung induziert und naive T-Zellen *in vitro* kostimuliert. In $CD4^+$ T-Zellen von infizierten Mäusen verstärkt sie mitogene Antworten und bewahrt T-Zellen vor dem Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD). Dabei bindet die TS an CD43 (auch als Ly-48, Leukosialin o. Sialophorin bekannt) auf der T-Zell-Oberfläche. Durch Studien mit CD43-defizienten Mäusen ist bekannt, dass CD43 an der negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist.

(Manjunath *et al.*, 1995; Thurman *et al.*, 1998; Stockton *et al.*, 1998). CD43-Engagement wird für die Kostimulation und die Bewahrung vor dem AICD benötigt (Sperling *et al.*, 1995).

Da die *T. cruzi*-TS einen natürlichen CD43-Liganden mit T-Zell-aktivierenden Eigenschaften darzustellen scheint, ist dieses Molekül ein Kandidat für die bei der Infektion auftretende Induktion der Immunpathologie. Aus diesem Grund soll überprüft werden, ob ein CD43-Engagement durch die *trans*-Sialidase der Parasiten als Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte auf die Immunantwort in Frage kommen könnte.

Zu diesem Zweck wurde zunächst das Oberflächen-Antigen CD43 auf den Zellen durch Gabe von anti-CD43-Antikörpern maskiert. Die Antikörper wurden in zwei verschiedenen Endkonzentrationen zu den naiven T-Zellen, die durch PEC aus nicht-infizierten bzw. infizierten Mäusen Antigen-spezifisch stimuliert wurden, hinzugegeben. Nach 24- sowie 48-stündiger Stimulation wurden die IL-2-Produktion und die Proliferation der T-Zellen gemessen.

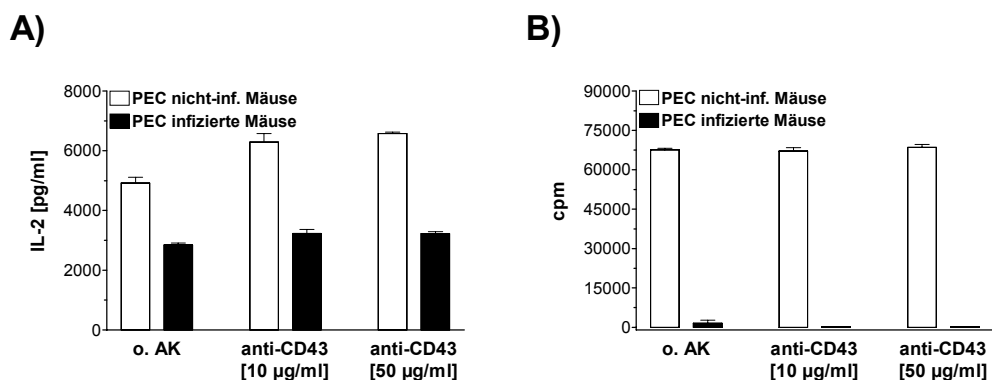


Abb. 3.22: IL-2 Produktion und Proliferation von T-Zellen nach Blockade von CD43.

1×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen (Tag 16 p.i.) wurden mit 2×10^5 frisch präparierten T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Außerdem wurden 10 oder $50 \mu\text{g/ml}$ anti-CD43 zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt (A). Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (B).

Bei den Ergebnissen fällt auf, dass die IL-2-Produktion der T-Zellen, die durch nicht-infizierte PEC stimuliert wurden, bei Blockade von CD43 signifikant erhöht ist (Abb. 3.22, A). Eine Verringerung des Unterschieds an IL-2 zwischen Kulturen mit nicht-infizierten und infizierten Stimulatoren war jedoch weder bei der niedrigen noch bei der hohen Antikörper-Konzentration festzustellen. Die Proliferation der T-Zellen

wurde bei Stimulation durch infizierte PEC unter den drei Bedingungen jeweils vollständig unterdrückt (Abb. 3.22, B). Nach 48 Stunden ergab sich genau das gleiche Bild wie nach 24 Stunden (Daten nicht gezeigt).

Um einen möglichen Effekt der *trans*-Sialidase von *T. cruzi* aufzuheben, sollte außer der Maskierung von CD43 auf der Zelloberfläche in anderen Experimenten eine denkbare Interaktion mit CD43 verhindert werden, indem vor dem Einsatz in Stimulationsexperimenten alle Sialinsäurereste enzymatisch von der Oberfläche der naiven T-Zellen abgespalten wurden. Dazu wurden die T-Zellen mit Neuraminidase (Sialidase) aus *Clostridium perfringens* behandelt (2.2.3.6). Nach der Stimulation wurden wiederum IL-2-Produktion und Proliferation der Zellen analysiert.

Wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist, führte auch die Sialidase-Behandlung der T-Zellen nicht dazu, dass die IL-2-Produktion in Ansätzen mit infizierten APC weniger inhibiert wurde (A). Die Kontrollen und die Sialidase-behandelten Zellen wiesen bei Infektion der PEC jeweils eine Verringerung der IL-2-Produktion um mehr als 60 % auf. Die Proliferation der T-Zellen wurde ebenfalls in beiden Fällen bei Infektion der Stimulatoren extrem stark supprimiert (B).

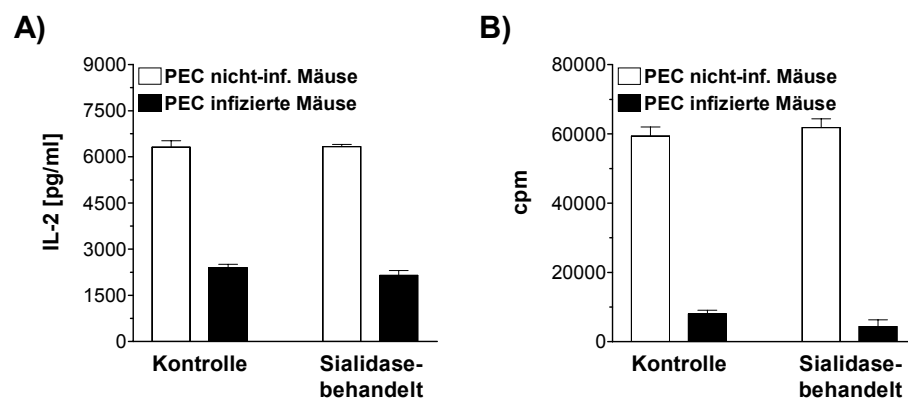


Abb. 3.23: IL-2 Produktion und Proliferation von T-Zellen nach Sialidase-Behandlung.

1×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c-Mäusen (Tag 14 p.i.) wurden mit 2×10^5 frisch präparierten T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Ein Teil der T-Zellen wurde zuvor mit Sialidase behandelt. Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt (A). Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (B).

Aufgrund der beiden hier beschriebenen Versuchsergebnisse ist offenbar auszuschließen, dass ein CD43-Engagement durch die *trans*-Sialidase der Parasiten als Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Immunsuppression in Frage kommt.

3.8 CD8⁺ T-Zellen zeigen bei Stimulation durch infizierte PEC vergleichbare Reaktionen wie CD4⁺ T-Zellen

In den bisher beschriebenen Experimenten war der Einfluss einer *T. cruzi*-Infektion auf die Aktivierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen untersucht worden, die über die Präsentation von Antigenen in MHC-Klasse II-Molekülen stimuliert wurden. Nun sollte überprüft werden, ob sich die bisherigen Ergebnisse einer dominanten Immunsuppression auch auf zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, d.h. die Antigen-Präsentation über das MHC-Klasse I-System, übertragen lassen.

Zu diesem Zweck wurden die Antigen-spezifischen T-Zellen aus OT-1-TCR-transgenen Mäusen gewonnen. Ihr transgener TCR erkennt das 8er-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ aus Ovalbumin, präsentiert auf H2-K^b-tragenden APC. Die T-Zellen wurden aus den Milzen der Mäuse präpariert und mit Hilfe des *CD8⁺ T Cell Isolation Kit* isoliert (2.2.1.9), um den Anteil an anderen Zellen so gering wie möglich zu halten.

Zunächst sollten IL-2, IFN- γ sowie IL-12 im Stimulationsassay analysiert werden. Dazu wurden peritoneale Exsudat-Zellen (PEC) aus C57BL/6-Mäusen als Antigen-präsentierende Zellen mit Trypanosomen infiziert. Nach 48-stündiger Infektion wurden die frisch gereinigten OT-1-T-Zellen hinzugegeben. Verschiedene Konzentrationen an Ova-Peptid als Antigen wurden zur Stimulation ausgetestet. Jeweils 24 und 48 Stunden später wurden die Überstände auf das Vorhandensein von IL-2, IFN- γ und IL-12 hin untersucht.

In Abbildung 3.24 sind exemplarisch die Ergebnisse einer 48-stündigen Stimulation bei zwei verschiedenen Antigen-Konzentrationen dargestellt.

24 Stunden nach Zugabe von T-Zellen und Antigen war in der IL-2-Produktion bereits ein geringfügiger Unterschied zwischen den Proben mit infizierten (+ *T. cruzi*) und denen mit nicht-infizierten PEC (- *T. cruzi*) erkennbar (Daten nicht gezeigt). Nach 48-stündiger Stimulation wurde dann in infizierten Kulturen eine deutliche Suppression der IL-2-Produktion detektiert (Abb. 3.24, A). Die IL-2-Konzentration in den Überständen

infizierter Zellen war mit 870 pg/ml im Vergleich zu 2240 pg/ml in den Überständen nicht-infizierter Kontrollen bei der höchsten Peptid-Konzentration um 60 Prozent verringert. Auch in diesem System korreliert die IL-2-Produktion nicht-infizierter Zellen deutlich mit der Antigen-Konzentration - wie bei der Stimulation von CD4⁺ T-Zellen.

Die IFN- γ -Produktion der T-Zellen wurde durch Infektion der sie stimulierenden PEC ungefähr verdoppelt (Abb. 3.24, B). Auch die IL-12-Produktion der PEC verdoppelte sich durch die Infektion im Fall der höheren Antigen-Konzentration (Abb. 3.24, C). Bei der niedrigeren war durch die Infektion ein Anstieg um 30 % zu verzeichnen.

Keines der untersuchten Zytokine wurde in Abwesenheit von Antigen sezerniert.

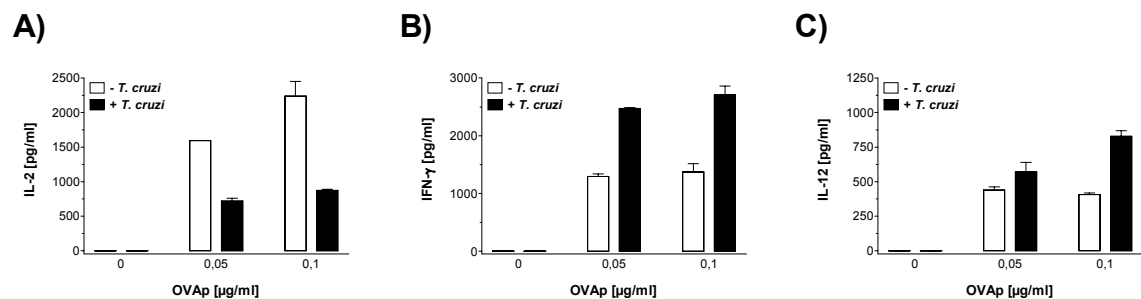


Abb. 3.24: CD8⁺ T-Zellen aus OT-1-Mäusen zeigen bei Stimulation durch *in vitro*-infizierte PEC vergleichbare Reaktionen wie CD4⁺ T-Zellen. Zytokin-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration.

1x10⁵ aus C57BL/6-Mäusen präparierte PEC wurden mit 2x10⁵ *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 48-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 2x10⁵ frisch präparierte T-Zellen aus OT-1-Mäusen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) PEC hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 0,05 bzw. 0,1 μg/ml Ova-Peptid stimuliert. 48 Stunden später wurden im Überstand IL-2 (A), IFN- γ (B) und IL-12 (C) quantifiziert.

Eine Stimulation von CD8⁺ T-Zellen über MHC-Klasse I-präsentiertes Antigen funktioniert somit prinzipiell während der *T. cruzi*-Infektion, ebenso wie es eine Stimulation von CD4⁺ T-Zellen über MHC-Klasse II-präsentiertes Antigen tut. Die infizierten APC scheinen jeweils in der Lage zu sein, Antigen zu präsentieren.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Wirkung der *T. cruzi*-Infektion auf die Aktivierung von T-Zellen ist nicht auf CD4⁺ T-Zellen beschränkt, sondern spielt auch für CD8⁺ T-Zellen eine Rolle.

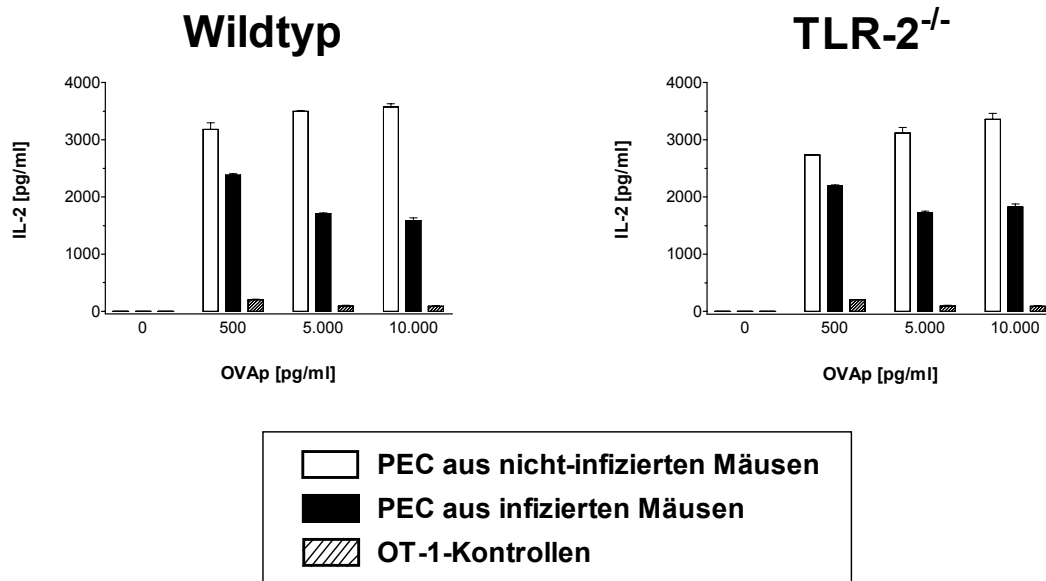
3.9 Wechselwirkungen über TLR-2 spielen keine Rolle für die IL-2-Suppression nach der Infektion

Immunzellen der angeborenen Immunität, wie Makrophagen und unreife dendritische Zellen, unterscheiden zwischen infektiösen Agenzien und „Selbst(-Antigenen)“ mit Hilfe von Rezeptoren, die Strukturen erkennen können, welche von großen Gruppen von Pathogenen geteilt werden - so genannten pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs) wie z.B. LPS oder Proteoglykanen von Bakterien. Dieses Erkennen resultiert in einer Zell-Aktivierung über Transmembranrezeptoren (Medzhitov und Janeway, 2000). Eine Familie dieser Transmembranrezeptoren auf Immunzellen, die in der Evolution hochkonserviert wurden und ausschließlich als signalgebende Rezeptoren zu wirken scheinen, ist die Familie der Toll-ähnlichen oder Toll-Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), die ursprünglich bei der Taufliege entdeckt wurden. Zu dieser Familie der Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) des angeborenen Immunsystems zählt unter anderem der Toll-Rezeptor 2, kurz TLR-2. TLR-2 reagiert auf mikrobielle Proteoglykane, wobei noch nicht bekannt ist, wie die Erkennung erfolgt. Die Verknüpfung von TLR-2 aktiviert einen in der Evolution früh entstandenen Signalweg, der den Transkriptionsfaktor NF κ B und dadurch eine Reihe von Genen aktiviert. Darunter sind Gene für Zytokine, Chemokine und kostimulierende Moleküle, die bei der Steuerung der adaptiven Immunantwort in späteren Phasen einer Infektion von Bedeutung sind. So wird beispielsweise die Erzeugung von Stickstoffmonoxid (NO) innerhalb der Zellen stimuliert, das für diverse Pathogene toxisch ist. Auch die Freisetzung von IL-12, das wiederum CD4⁺ T-Zellen dazu veranlasst, IFN- γ und TNF- α freizusetzen, wird induziert (Janeway *et al.*, 2002).

Im Fall von *Trypanosoma cruzi* haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass GPI-Anker und Glykoinositolphospholipide (GIPLs) des Parasiten starke Aktivatoren von humanem und murinem TLR-2 auf Makrophagen sind (Campos *et al.*, 2001). Die TLR-2-Aktivierung durch GPI führte dabei zur Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α .

Um zu überprüfen, ob eine Signalgebung über TLR-2 auch für die infektionsbedingte IL-2-Suppression der T-Zellen eine Rolle spielen könnte, wurden PEC aus Mäusen, die TLR-2 nicht exprimieren können (TLR-2-*knockout*-Mäuse), für die Stimulation von T-Zellen eingesetzt. Dabei wurde IL-2 in den Kultur-Überständen quantifiziert und die Proliferation der Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt.

A)



B)

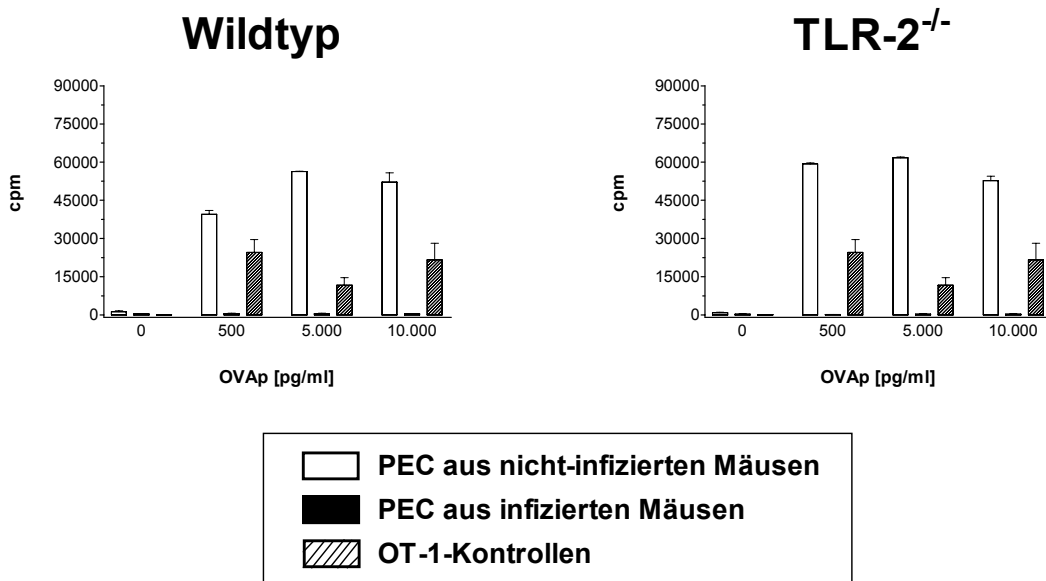


Abb. 3.25: Stimulation von OVA-spezifischen T-Zellen durch PEC von infizierten bzw. nicht-infizierten WT- versus TLR-2^{-/-}-Mäusen.

1x10⁵ PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) C57BL/6-Mäusen oder C57BL/6 TLR-2^{-/-}-Mäusen (Tag 17 p.i.) wurden mit 2x10⁵ frisch präparierten T-Zellen aus OT-1-Mäusen kultiviert. Zusätzlich wurden OT-1-T-Zellen ohne PEC kultiviert (schraffierte Balken). Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Ova-Peptid stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt (A). Achtzehn Stunden später wurde die Proliferation über den Einbau der Radioaktivität gemessen (B).

Bei Verwendung von PEC aus nicht-infizierten TLR-2-defizienten und Wildtyp-Mäusen wurden im T-Zell-Stimulationsexperiment vergleichbare Mengen an IL-2 produziert (Abb.3.25, A). Demgegenüber war die IL-2-Produktion in den Ansätzen mit infizierten PEC in beiden Fällen gleich stark gehemmt. Auch die Proliferation der Zellen wurde in allen Ansätzen mit Stimulatoren aus infizierten Mäusen gleichermaßen vermindert bzw. fast vollständig unterdrückt (Abb. 3.25, B).

In diesem Experiment wurde durch die OT-1-T-Zellen bei Antigen-Stimulation auch ohne Zugabe von PEC IL-2 produziert, d.h. die Isolierung mit Hilfe des *CD8⁺ T Cell Isolation Kit* war nicht hundertprozentig erfolgreich. Es müssen sich noch einige aus der Milz stammende APC in der T-Zell-Fraktion befunden haben. Die produzierten IL-2-Mengen lagen jedoch weit unter der der T-Zellen, die durch hinzugegebene PEC stimuliert wurden. Daher sind sie zu vernachlässigen. Außerdem proliferierten diese T-Zellen bei Antigen-Gabe selbst mit der sehr geringen Anzahl an vorhandenen Milzstämmigen APC (wahrscheinlich B-Zellen) als Stimulatoren deutlich. Doch auch diese „Hintergrund“-Proliferation wurde durch die Anwesenheit infizierter PEC komplett unterdrückt. Das spricht erneut für einen dominanten Effekt infizierter APC über nicht-infizierte.

Wurden PEC aus TLR-2-defizienten Mäusen im T-Zell-Stimulationsexperiment eingesetzt, war also die gleiche Inhibition in der IL-2-Produktion der T-Zellen festzustellen wie bei PEC aus WT-Mäusen. Daher scheint der TLR-2-Signalweg nicht mit der Immunsuppression assoziiert zu sein.

3.10 Die Immunsuppression wird auch bei nicht-passendem MHC-Haplotyp vermittelt

Um die Frage zu klären, ob die Anwesenheit infizierter APC ohne Möglichkeiten zur spezifischen Antigen-Interaktion für eine Beeinträchtigung der IL-2-Produktion von T-Zellen bei Stimulation ausreicht, wurden verschiedene Mischungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden infizierte PEC von C57BL/6-Mäusen (MHC-I-System), die das 17er-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ **nicht** präsentieren können, infiziert und mit DO11.10-T-Zellen zusammengegeben, deren TCR nur die Präsentation dieses 17er-Peptids durch MHC-II-Moleküle erkennt. Für die praktische Durchführung wurden 2×10^5 Milzzellen mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ stimuliert. Zu diesen Milzzellen wurden PEC aus infizierten C57BL/6-Mäusen hinzugegeben. Um des weiteren festzustellen wie viele APC aus infizierten

Mäusen nötig sind, um die Stimulation der Milzzellen zu inhibieren, wurden verschiedene Mengen an PEC (zwischen 0 und 100.000) in die Kulturen gegeben. Zum Vergleich wurde ebenso mit PEC passender Antigen-Spezifität aus infizierten BALB/c-Mäusen verfahren. Die Zellen wurden mit 0,5 oder 1 µg/ml OVA_p für 24 oder 48 Stunden stimuliert und dann IL-2-Produktion und Proliferation analysiert.

In Abbildung 3.26 ist die IL-2-Produktion der Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 0,5 µg Ova-Peptid pro Milliliter zusammengefasst.

Die IL-2-Produktion entsprach in beiden Versuchsansätzen bei Zugabe von weniger als 10.000 PEC jeweils der IL-2-Produktion der Milzzellen alleine. In den Ansätzen, zu denen 10.000 PEC aus infizierten Mäusen hinzugegeben wurden, war die IL-2-Produktion um 10 % verringert, verglichen mit der in den Ansätzen, zu denen PEC aus nicht-infizierten Mäusen gegeben wurden. Eine Verringerung um mehr als 60 % war schließlich bei der Zugabe von 100.000 PEC aus infizierten Mäusen zu messen, und zwar sowohl bei dem Einsatz „passender“ Stimulatoren aus BALB/c-Mäusen als auch bei Einsatz „nicht-passender“ Stimulatoren aus C57BL/6-Mäusen. Dieser Effekt trat auf, obwohl jeweils ausreichend nicht-infizierte Stimulatoren aus der naiven Milz im System vorhanden waren, denn selbst in Anwesenheit von 100.000 PEC (von denen auch längst nicht alle infiziert sind) lag eine sehr große Überzahl an Milz-stämmigen nicht-infizierten APC vor. Wie die FACS-Analysen in Abschnitt 3.3 ergaben, bestehen Milzzellen durchschnittlich zu mehr als 60 % aus professionellen APC, vor allem B-Zellen.

In den Kulturen, bei denen die größte Anzahl an nicht-infizierten PEC aus BALB/c-Mäusen zu den DO11.10-Zellen gegeben worden war, lag eine bedeutend höhere IL-2-Konzentration vor als in den Ansätzen reiner Milzzellen. Das ist damit zu begründen, dass in diesem Fall durch die BALB/c-PEC die Anzahl der APC, die die T-Zellen stimulieren können, drastisch erhöht wurde. Dass es auch in Anwesenheit der höchsten Anzahl an PEC aus nicht-infizierten C57BL/6-Mäusen zu einer Erhöhung der IL-2-Produktion im Vergleich zu der der reinen Milzzellen kam, könnte möglicherweise durch eine Stimulation mit allogenen APC erklärt werden.

Insgesamt sank die Zytokin-Konzentration durch die Anwesenheit infizierter PEC in keiner der Kulturen unter die in reinen Milzzell-Kulturen messbare Konzentration. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen zeigte sich prinzipiell das gleiche Bild, wobei die ausgeprägteste IL-2-Inhibition jeweils bei zirka 40 % lag (nicht gezeigt).

Die Proliferation der Milzzellen wurde bereits in Anwesenheit von 10.000 PEC aus infizierten Mäusen leicht, in Anwesenheit von 100.000 PEC sehr stark supprimiert. Im

letztgenannten Fall war fast gar keine Proliferation der Zellen mehr zu messen (nicht gezeigt).

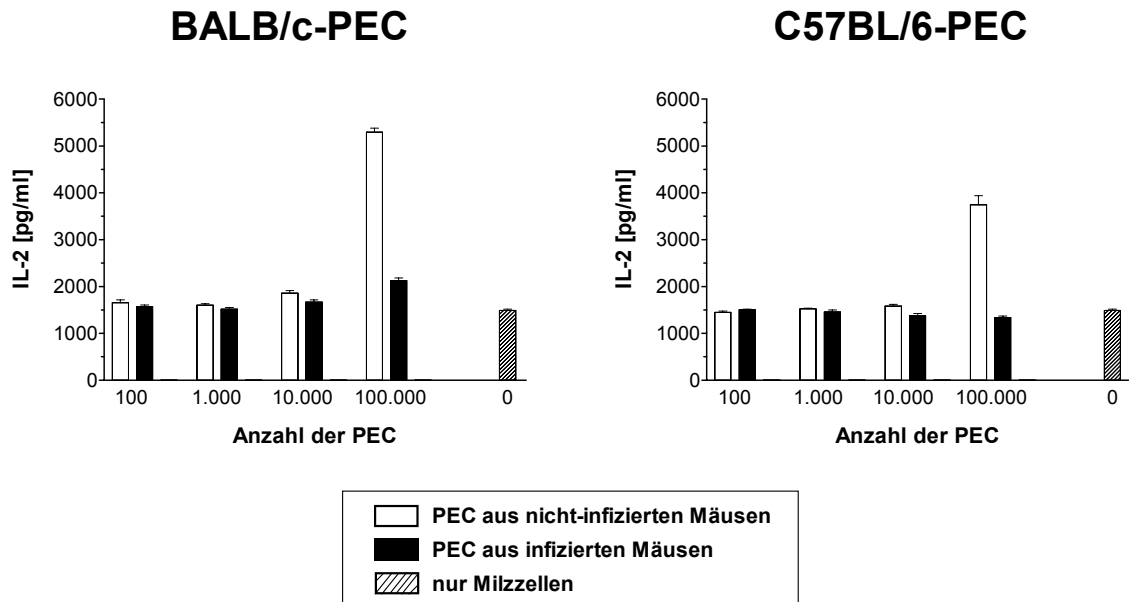


Abb. 3.26: IL-2-Konzentration in Überständen von naiven DO11.10-Milzzellen nach Stimulation durch *in vivo*-infizierte PEC aus BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen.

1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 bzw. 1×10^5 PEC aus nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) BALB/c- oder C57BL/6-Mäusen (Tag 18 p.i.) wurden mit 2×10^5 frisch präparierten Milzzellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen kultiviert. Zusätzlich wurden Milzzellen ohne PEC kultiviert (schraffierte Balken). Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Nicht nur MHC-passende BALB/c-PEC supprimieren die IL-2-Produktion von T-Zellen während ihrer Antigen-spezifischen Stimulation, sondern auch PEC von C57BL/6-Mäusen, die über ihre MHC-Moleküle nicht Antigen-spezifisch mit den T-Zellen interagieren können.

Der Kontakt zu infizierten APC - ohne eine direkte Interaktion mit dem spezifischen Antigen - reicht offensichtlich bereits aus, um eine Suppression der von den infizierten Zellen unabhängigen Antigen-spezifischen Stimulation hervorzurufen.

3.11 Untersuchung des Einflusses infizierter Fibroblasten auf die Stimulation von T-Zellen

3.11.1 Einfluss infizierter MHC-II-transfizierter Fibroblasten auf die Stimulation von naiven T-Zellen

Bisher konnte mit den beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass es sich bei der durch *T. cruzi*-Infektion verursachten IL-2-Suppression um einen Effekt handelt, der nicht durch lösliche Faktoren induziert wird, sondern der abhängig von einem direkten Zellkontakt mit den infizierten Zellen ist. Der Effekt ist dominant und bewirkt eine lang anhaltende Immunsuppression. Die Immunsuppression wird - nach bisherigem Kenntnisstand - durch die Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen verursacht, kann aber unabhängig von einer direkten Antigen-spezifischen Interaktion mit der infizierten Zelle induziert werden. Das wirft die Frage auf, ob zur Induktion der beschriebenen Immunsuppression die Eigenschaften oder Fähigkeiten einer professionellen APC vonnöten sind, also ob diese Zellen durch irgendein immun-regulatorisches Eingreifen infolge ihrer Infektion die T-Zell-Suppression bewirken. Um das zu überprüfen, wurden murine Fibroblasten, die mit MHC-II (I-A^d) transfiziert sind, als künstliche APC in Stimulationsexperimenten eingesetzt. Diese Fibroblasten mit der Bezeichnung RT2.3HD6 exprimieren große Mengen von MHC-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche, so dass sie von außen mit Antigen-Peptiden beladen werden können. Sie besitzen keine weiteren Eigenschaften professioneller APC (z.B. keine Kostimulatoren), sondern können lediglich Peptide im Komplex mit I-A^d an DO11.10-T-Zellen präsentieren.

Für die praktische Durchführung wurden die Fibroblasten *in vitro* mit Trypanosomen infiziert und mit der doppelten Menge an T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen in Stimulationsassays eingesetzt. Dabei wurden verschiedene Mengen an Zellen der Fibroblasten-Zell-Linie RT2.3HD6 und unterschiedliche Peptid-Konzentrationen ausgetestet. Nach einer Stimulation von 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellkultur-Überstände auf die IL-2-Konzentrationen hin untersucht. In Abb. 3.27 sind exemplarisch die Ergebnisse der 24- (A) bzw. 48-stündigen (B) Stimulation mit einer Ova-Peptid-Konzentration von 0,5 µg/ml zusammengefasst.

Während eine Anzahl von 1×10^3 Fibroblasten und 2×10^3 T-Zellen pro Ansatz zu gering war, um mit Hilfe des ELISAs eine IL-2-Produktion messen zu können, konnten sowohl bei der zehnfachen als auch bei der hundertfachen Menge an Zellen signifikante Konzentrationen des Zytokins detektiert werden. Dabei fällt auf, dass auch hier eine

zeitabhängige Wirkung der Infektion auf die Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation auftrat. Wie bei der Infektion professioneller APC wurde hier eine verringerte IL-2-Produktion der T-Zellen bei Infektion der Fibroblasten beobachtet. Dieser Effekt war bereits nach 24 Stunden mit einer Reduktion der IL-2-Konzentration um etwa ein Viertel erkennbar und wurde nach 48 Stunden noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt konnte gegenüber dem Einsatz nicht-infizierter Fibroblasten nur noch die Hälfte der IL-2-Menge detektiert werden.

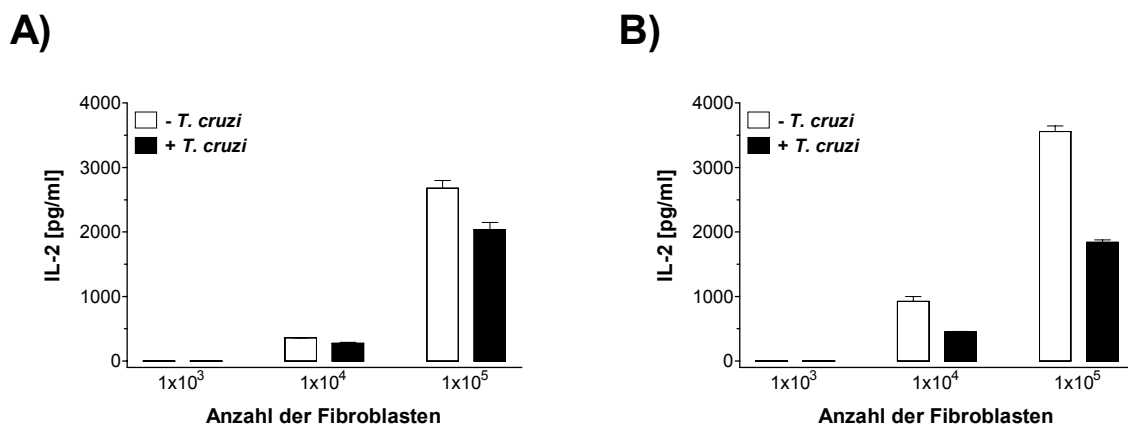


Abb. 3.27: *T. cruzi*-infizierte MHC-II transfizierte Fibroblasten haben einen vergleichbaren Effekt auf die Stimulation von naiven DO11.10-T-Zellen wie infizierte professionelle APC.

1×10^3 , 1×10^4 bzw. 1×10^5 RT2.3HD6-Fibroblasten wurden mit der doppelten Menge an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 48-stündiger *in vitro*-Infektion wurden 2×10^3 , 2×10^4 bzw. 2×10^5 frisch präparierte T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) PEC hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 0,5 µg/ml OVAp stimuliert. 24 (A) und 48 (B) Stunden später wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

Da die hier verwendeten Fibroblasten lediglich MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufweisen und z.B. keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, scheint es für den Parasiten-induzierten Effekt der Immunsuppression nicht notwendig zu sein, dass die infizierten Immunzellen immunregulatorische Faktoren hochregulieren. Diese Versuchsergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch die Infektion die Induktion eines Proteins der Wirtszelle bewirkt wird, oder aber ein Faktor von *T. cruzi* auf die Oberfläche der Zelle gelangt, der die Immunsuppression vermittelt. Bei der hier betrachteten, durch *T. cruzi*-Infektion verursachten Immunsuppression scheint es sich insgesamt um einen nicht auf APC festgelegten Effekt zu handeln.

3.11.2 Einfluss von fixierten infizierten Zellen auf die IL-2-Produktion

Um zu klären, ob veränderte Membranfluiditäten oder veränderte Lipidstrukturen von infizierten Zellen für die Inhibition verantwortlich sind, wurden Fixierungsexperimente durchgeführt. RT2.3HD6-Fibroblasten wurden mit *T. cruzi* infiziert und nach Infektion mit 1 % PFA fixiert (2.2.3.7). Dann wurden sie als künstliche APC zur Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen aus DO11.10-Mäusen eingesetzt.

Abbildung 3.28 zeigt, dass die T-Zellen IL-2 produzierten, wenn Antigen auf fixierten Zellen präsentiert wurde. Auch hier war der Parasiten-induzierte Effekt vorhanden: In den infizierten Ansätzen war die IL-2-Produktion verglichen mit der in den nicht-infizierten Kulturen deutlich reduziert. Das galt in gleichem Maße für die Kulturen, in denen die Antigen-präsentierenden Fibroblasten fixiert wurden, wie für die Kontrollen, in denen nicht-fixierte Fibroblasten verwendet wurden. Die infizierten Zellen müssen demnach nicht mehr stoffwechselaktiv sein, um die IL-2-Produktion zu inhibieren.

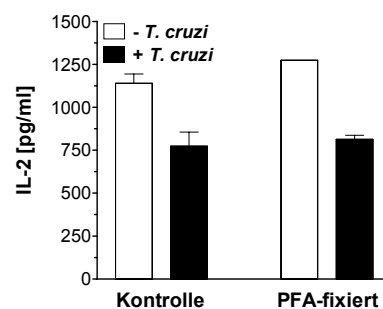


Abb. 3.28: IL-2 Produktion von T-Zellen bei Stimulation durch PFA-fixierte APC.

1x10⁵ RT2.3HD6-Fibroblasten wurden mit 2x10⁵ *T. cruzi* -Trypomastigoten infiziert. Nach 48-stündiger Infektion wurde ein Teil der Fibroblasten mit 1% PFA in PBS fixiert. Danach wurden 2x10⁵ frisch präparierte T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen zu den nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) Fibroblasten gegeben. Die Zellen wurden mit 0,5 µg/ml OVA_p stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

3.11.3 Einfluss infizierter Fibroblasten ohne MHC auf die IL-2-Suppression

Im Folgenden sollten noch einmal die Befunde bestätigt werden, dass nicht die unmittelbar an der Antigen-spezifischen Stimulation der T-Zellen beteiligten professionellen APC selber mit Trypanosomen infiziert sein müssen, damit die T-Zell-Antwort supprimiert wird. Dazu sollten Zellen infiziert werden, die nicht an der eigentlichen APC-T-Zell-Interaktion teilnehmen können. Da die bisher eingesetzten RT2.3HD6-Fibroblasten ohne die beschriebene MHC-II-Transfektion nicht zu erhalten waren, wurde für dieses Experiment auf die Fibroblasten-Linie L929 zurückgegriffen, bei der es sich ebenfalls um eine Fibroblasten-Linie aus der Maus handelt. Die L929-Fibroblasten besitzen keine MHC-II-Moleküle, können $CD4^+$ T-Zellen also nicht stimulieren. Verschiedene Mengen von L929-Fibroblasten pro Ansatz wurden mit *T. cruzi* infiziert. Nach der Infektion wurden so viele nicht-infizierte, MHC-II-transfizierte RT2.3HD6-Fibroblasten als Antigen-präsentierende Zellen hinzugegeben, dass sich insgesamt 1×10^5 Zellen in einem Ansatz befanden. Unter Zugabe von Ova-Peptid und naiven T-Zellen aus DO11.10-Mäusen wurden schließlich Stimulationsassays durchgeführt.

Je höher die Anzahl an infizierten L929-Fibroblasten in der Kultur war, desto stärker war auch die zu verzeichnende Reduktion der IL-2-Produktion der T-Zellen (Abb. 3.29; 1:4>1:10>1:20). Wurden die T-Zellen nur mit L929-Fibroblasten zusammen kultiviert, so konnten sie gar nicht durch das Antigen stimuliert werden, und es war kein IL-2 in den Ansätzen nachweisbar (Abb. 3.29, nur L929). T-Zellen, die zusammen mit RT2.3HD6-Fibroblasten anstelle der L929-Fibroblasten inkubiert wurden, produzierten mit fast 5 ng/ml hingegen hohe Mengen des Zytokins (Abb. 3.29, nur RT2.3). Wurde ein Teil dieser nicht-infizierten RT2.3-Fibroblasten durch nicht-infizierte L-Zellen ersetzt, sank die messbare Gesamt-IL-2-Produktion in den Ansätzen entsprechend ab. In den Kulturen, in denen jede vierte der Zellen durch eine nicht-Antigen-präsentierende L-Zelle ersetzt worden war, war schließlich nur etwa die Hälfte an IL-2 nachzuweisen. Wie bereits erwähnt wurde jedoch in jedem Fall die IL-2-Produktion deutlich unterdrückt, wenn infizierte L-Zellen anstelle nicht-infizierter L-Zellen eingesetzt wurden. Bei einem Verhältnis von einem L929-Fibroblasten auf drei RT2.3-Fibroblasten sezernierten die T-Zellen in Anwesenheit infizierter L929 nur 50 Prozent der IL-2-Menge, die sie in Anwesenheit nicht-infizierter L929 freisetzen (Abb. 3.29, 1:4). Die Inhibition der IL-2-Produktion in Kokultur mit infizierten L-Zellen zeichnete sich bereits nach einer 24-stündigen Stimulation der Zellen ab (nicht gezeigt). Der Parasiten-induzierte Effekt ist also auch bei dieser Zusammensetzung der

Zellen vorhanden. Ein direkter Befall professioneller APC ist zur Induktion der Immunsuppression nicht nötig.

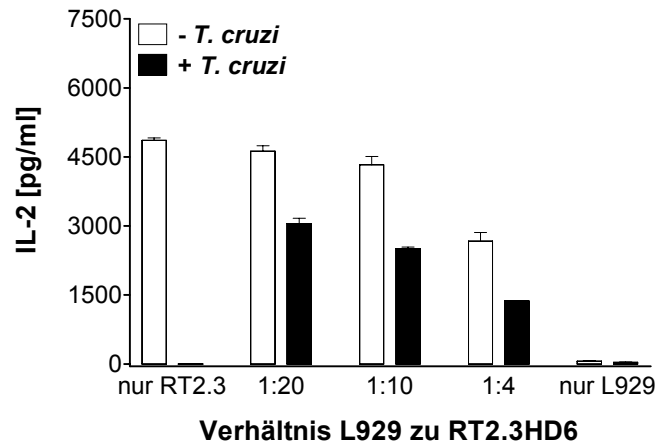


Abb. 3.29: Stimulation von naiven DO11.10-T-Zellen durch MHC-II-transfizierte Fibroblasten bei Mischung mit *in vitro*-infizierten, nicht-Antigen-präsentierenden L929-Fibroblasten.

5×10^3 , 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ bzw. 1×10^5 L929-Fibroblasten wurden mit der doppelten Menge an *T. cruzi*-Trypomastigoten infiziert. Nach 48-stündiger Infektion wurden so viele RT2.3HD6-Fibroblasten als APC zu den nicht-infizierten (weiße Balken) bzw. infizierten (schwarze Balken) L929 hinzugegeben, dass sich eine Gesamtzellzahl von 1×10^5 Zellen in jedem Ansatz ergab (Zugabe von $9,5 \times 10^4$, 9×10^4 bzw. $7,5 \times 10^4$ RT2.3HD6-Fibroblasten). Außerdem wurden Kontrollen mit 1×10^5 RT2.3HD6 ohne L929-Zellen angesetzt. Danach wurden jeweils 2×10^5 frisch präparierte T-Zellen aus DO11.10-TCR-transgenen Mäusen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ OVA_p stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IL-2 mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

4 Diskussion

Die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* stellt mit 16-18 Millionen Betroffenen eine der bedeutendsten Tropenparasitosen des Menschen dar (Andrade, 1999; Schofield und Dias, 1999). Sie führt in einem Drittel der Fälle zu chronischen Krankheitsverläufen, die aufgrund von Organversagen tödlich enden können (Knobloch, 1996). Die Hauptursache dieser schweren Krankheitsverläufe liegt in der unzureichenden Bekämpfung des Parasiten durch das Immunsystem. Zwar ruft die Infektion mit *T. cruzi* anfangs eine starke Aktivierung des Immunsystems hervor, die Immunantworten des Wirtes reichen jedoch in der Regel nicht aus, um den Körper vollständig von den Parasiten zu befreien. Vielmehr sind die Trypanosomen sogar dazu in der Lage, Jahrzehnte bzw. ein Leben lang in ihrem menschlichen Wirt zu persistieren (Tarleton, 2001).

Während der Infektion tritt nach einer polyklonalen Aktivierung von T- und B-Lymphozyten (Minoprio *et al.*, 1989) sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen eine Immunsuppression auf, bei der Immunantworten gegen Mitogene sowie Parasiten-spezifische und Parasiten-unspezifische Antigene unterdrückt werden (Kierszenbaum, 1982; Cetron *et al.*, 1993). Diese Immunsuppression wird für die Disseminierung und Persistenz des Parasiten im infizierten Wirt verantwortlich gemacht (Goni *et al.*, 2002). Das Auftreten einer Immunsuppression bei *T. cruzi* -Infektionen sowohl des Menschen als auch der Maus ist umfassend belegt worden. Dennoch existieren immer noch zahlreiche widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des verantwortlichen Immunzell-Typs sowie der verantwortlichen Mechanismen. Sowohl $\alpha\beta$ T-Zellen (Tarleton, 1988a; Lopes und DosReis, 1994) als auch $\gamma\delta$ T-Zellen (Cardillo *et al.*, 1998) und adhärenz Makrophagen-ähnliche Zellen (Kierszenbaum, 1982; Motran *et al.*, 1996) wurden als Suppressor-Zellen diskutiert, denn es ließ sich beispielsweise durch die Depletion adhärenz Zellen die T-Zell-Proliferation von Milzzellen teilweise wiederherstellen (Harel-Bellan *et al.*, 1983; Cerrone *et al.*, 1992). Bezüglich des Mechanismus wurden u.a. verminderte IL-2- (Tarleton, 1988a; Harel-Bellan *et al.*, 1985) und IL-2-Rezeptor-Expression (Lopez *et al.*, 1993; Kierszenbaum *et al.*, 1994), erhöhte IFN- γ - und NO-Produktion (Abrahamsohn und Coffman, 1995), Prostaglandin-Freisetzung (Pinge-Filho *et al.*, 1999) oder Apoptose (Abrahamsohn und Coffman, 1995; Nunes *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998) diskutiert. Zudem sind die Interaktionen zwischen den verschiedenen Mechanismen und den supprimierenden Zelltypen nicht geklärt.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Immunantwort gegen intrazelluläre Trypanosomen betrachtet werden. Insbesondere sollte untersucht werden, auf welche

Weise eine *T. cruzi*-Infektion Antigen-präsentierender Zellen die Stimulation von ruhenden T-Zellen und damit die Immunantwort beeinflusst.

Dazu wurde zunächst ein Infektions- und Stimulationssystem etabliert. Da *T. cruzi* in der akuten Phase überwiegend Makrophagen infiziert, sollte vornehmlich eine Infektion dieser Zellen betrachtet werden. Aufgrund der beschriebenen Immunsuppression wird es erschwert, Parasiten-spezifische T-Zell-Linien zu gewinnen, zumal nur zwischen 2% und 5% der Lymphozytenklone, die bei Immunantworten gegen Parasiten-Infektionen aktiviert werden, spezifisch gegen Parasiten-Antigene gerichtet sind (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollten T-Zellen eingesetzt werden, die nicht durch eine Infektion entstanden oder *T. cruzi*-spezifisch sind, da diese aus dem komplexen Umfeld einer Infektion stammen würden und daher bereits undefinierte Defekte aufweisen könnten. Stattdessen wurden T-Zellen verwendet, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor mit definierter Spezifität für Ovalbumin-Peptide tragen. Da außerdem nicht die Prozessierung von Antigenen in diesem System analysiert werden sollte, wurden die MHC-Moleküle der stimulierenden APC von außen mit den entsprechenden Antigen-Peptiden beladen. Um naive T-Zell-Hybridome bzw. naive T-Zellen aus Ova-spezifischen TCR-transgenen Mäusen zu stimulieren, wurden adhärente peritoneale Exsudat-Zellen als APC eingesetzt, die entweder *in vitro* mit *T. cruzi* infiziert oder aus infizierten Mäusen gewonnen worden waren.

Die Etablierung dieses *in vitro*-Infektionssystems ist im Ergebnisteil der Arbeit dargestellt und erläutert worden. Daher soll sich die Diskussion hauptsächlich auf die Charakterisierung der Immunsuppression und deren Mechanismen konzentrieren.

4.1 Analyse der stimulatorischen Fähigkeiten von APC nach Infektion

Durch *in vitro*-Infektion konnte ein Großteil der Antigen-präsentierenden Zellen mit Trypanosomen infiziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Analysen belegten Infektionsraten von durchschnittlich 70% (Abschnitt 3.1.1, Abb. 3.2). Dabei führte die Infektion der APC zu einer gesteigerten Expression sowohl von MHC-II als auch des kostimulatorischen Moleküls B7.2 (CD86), was nicht nur als ein Anstieg im Anteil positiver Zellen, sondern auch als Erhöhung der Zahl der Oberflächenmoleküle pro Zelle zu beobachten war (Abschnitt 3.1.2).

Viele Pathogene wie Mykobakterien (Saha *et al.*, 1994), Listerien oder Leishmanien (Kaye *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1995) nutzen verschiedenste Strategien, um die Wirts-Immunantwort auf der Ebene der Kostimulation oder der Antigen-Präsentation zu beeinflussen, denn kostimulatorische Moleküle auf infizierten APC sind kritisch für die Initiierung der Immunantwort. Von *Leishmania major* und *Leishmania amazonensis* infizierte Makrophagen zeigen eine verminderte Kapazität zur Antigen-Präsentation (Fruth *et al.*, 1993; Lytton *et al.*, 1993; Prina *et al.*, 1993), und die Infektion von Knochenmarks-Makrophagen durch *L. donovani* führt dazu, dass die Expression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 nicht mehr induziert wird. Daher wäre es nahe liegend anzunehmen, dass auch *T. cruzi* Mechanismen entwickelt hat, die die Kostimulation bzw. die Präsentation von Parasiten-Antigenen durch die APC inhibieren können. In diesem Zusammenhang haben Van Overtvelt *et al.* veröffentlicht, dass die LPS-induzierte Reifung von humanen DC durch eine Infektion mit *T. cruzi* stark beeinträchtigt wird (Van Overtvelt *et al.*, 2002). Sie beobachteten eine reduzierte Sekretion von IL-12, TNF- α und IL-6, die normalerweise in großen Mengen von LPS-aktivierten DC freigesetzt werden. Zudem inhibierte *T. cruzi* die LPS-vermittelte Induktion von MHC-I (HLA-DR) und CD40-Molekülen auf der Oberfläche der humanen DC. Diese Inhibition wurde durch vom Parasiten selbst freigesetzte lösliche Faktoren vermittelt, da sie auch von Überständen einer Parasiten-Suspension, die zu den DC-Kulturen gegeben wurden, ausgelöst wurde. Auch die Induktion kostimulatorischer Moleküle während der LPS-vermittelten DC-Reifung wurde von den Trypanosomen inhibiert (Van Overtvelt *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen mit humanen Zellen konnte eine Reduktion von MHC-Klasse I-Molekülen bei *T. cruzi*-infizierten Makrophagen aus der Maus nicht beobachtet werden. Buckner *et al.* zeigten, dass hier keine Beeinträchtigung der Antigen-Präsentation über MHC-Klasse I an zytotoxische T-Lymphozyten auftrat (Buckner *et al.*, 1997). Zudem wurde beschrieben, dass *T. cruzi* IFN- α/β -abhängig eine Erhöhung der MHC-Klasse I-Expression sowohl auf der murinen Makrophagen-Zell-Linie J774 als auch auf Maus-Fibroblasten induziert (Stryker und Nickell, 1995).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten lassen bei einer Infektion mit dem *T. cruzi*-Stamm Tulahuén keine Aktivierungshemmung der APC vermuten (Abschnitt 3.1.2). Es fand vielmehr eine Aktivierung der Zellen durch die Infektion statt, bei der sich der Anteil B7.2-positiver Zellen von etwa 30% (ohne Infektion) auf über 60% verdoppelte. Der Anteil MHC-II-exprimierender Zellen erhöhte sich von 71% auf 78% (siehe Abb. 3.3 u. Tab. 3.1). Die Infektion hatte also keinen negativen Einfluss auf die Expression der Antigen-präsentierenden und kostimulatorischen Moleküle der APC.

Die Voraussetzungen für eine Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung durch die infizierten APC sind folglich gegeben. Darüber hinaus wurde eine Induktion der IL-12-Sekretion durch die Infektion der APC festgestellt (vgl. Abb. 3.6). IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen sezerniert und stimuliert u.a. die Entwicklung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen (Chouaib *et al.*, 1994) sowie die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten zu T_H1-Effektorzellen (Trinchieri, 1995; Windhagen *et al.*, 1996; Mehrotra *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit beobachtete Aktivierung der APC durch die Infektion mit *T. cruzi* wird bestätigt durch Ergebnisse von Frosch *et al.*, die bei Knochenmarks-stämmigen Makrophagen eine selektive und starke Induktion der Expression von B7.2-Molekülen nach *T. cruzi*-Infektion demonstrieren konnten, die bei anti-CD3-Stimulation zu einer effizienteren Stimulierung von Milz-CD4⁺ T-Zellen führte (Frosch *et al.*, 1997). Untersuchungen von La Flamme *et al.* (1997) bestätigen den Befund, dass die MHC-II-Expression von APC durch die *T. cruzi*-Infektion nicht beeinträchtigt wird. Sie fanden bei nicht-infizierten und infizierten Zellen der murinen Makrophagen-Linie J774 eine vergleichbare Expression dieses Antigen-präsentierenden Moleküls und auch die gleiche Anzahl an MHC-II-Antigenpeptid-Komplexen sowie CD40 auf der Makrophagenoberfläche.

T. cruzi-infizierte APC sollten daher nicht nur in der Lage sein, von außen zugegebene Antigen-Peptide auf ihren Oberflächen-MHC-Klasse II-Molekülen zu präsentieren, sondern aufgrund der gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle und der Sekretion von IL-12 sogar zu einer verbesserten Aktivierung von T-Zellen führen. Tatsächlich sind infizierte Makrophagen - als eine Konsequenz der Zunahme der B7.2-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche - dazu in der Lage, CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von anti-CD3-Antikörpern mit höherer Effizienz zu stimulieren als nicht-infizierte Makrophagen (Abschnitt 3.6, Abb. 3.21). Auch diese Beobachtung geht mit den Befunden von Frosch *et al.* einher, die als Folge einer *T. cruzi*-Infektion von Knochenmarks-Makrophagen eine effizientere Stimulierung von Milz-CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von anti-CD3 feststellten (Frosch *et al.*, 1997).

Dieser Effekt basiert wohl hauptsächlich auf der Induktion der B7.2-Expression durch *T. cruzi*, denn sowohl *in vivo* - als auch *in vitro* -Studien haben gezeigt, dass B7.2 der kostimulierende Haupt-Ligand für CD28 ist. Dieses Molekül ist infolgedessen wichtig für die klonale Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen und damit für die Initiierung von T-Zell-Antworten (Bluestone, 1995; Freeman *et al.*, 1993; Linsley *et al.*,

1991). Das wird unterstützt durch die in dieser Arbeit beobachteten starken inhibitorischen Effekte von anti-B7.2-Antikörpern (Abschnitt 3.4, Abb. 3.18).

Jüngste Daten von Alba Soto *et al.* weisen auf eine Verminderung der Expression von MHC-Klasse II und B7.1 sowie B7.2 auf murinen Milz-DC in der akuten Phase der *T. cruzi* -Infektion hin, die in der chronischen Phase nicht mehr festzustellen ist. Diese MHC-II-Inhibition war bei Infektion von C3H/HeN^k -Mäusen mit dem hochvirulenten pantropischen/retikulotropischen *T. cruzi* -Stamm RA nachweisbar, jedoch nicht bei Infektion mit dem weniger virulenten myotropischen *T. cruzi* -Stamm CA-I (Alba Soto *et al.*, 2003). Grundsätzlich scheinen die Ergebnisse demnach sowohl vom eingesetzten *T. cruzi* -Stamm als auch von den betrachteten Zellen abzuhängen.

Zusammenfassend konnte in dem hier genutzten *in vitro* -Testsystem mit dem *T. cruzi* -Stamm Tulahuén ein häufig vorkommender Mechanismus der Immunsuppression durch Krankheitserreger, nämlich die Beeinträchtigung der MHC-II- oder B7.2-Expression durch infizierte Wirtszellen, nicht festgestellt werden.

4.2 Effektor-Zytokine

Mit *T. cruzi* infizierte APC können ein Antigen-spezifisches Signal an naive T-Zellen vermitteln, das bei diesen zur Induktion der Zytokin-Sekretion führt. Die T-Zellen produzieren bei Stimulation durch infizierte PEC sehr hohe Mengen an IFN- γ (siehe Abb. 3.4 u. 3.6). Dies wird besonders deutlich in den hier beschriebenen Experimenten mit APC aus *in vivo* -infizierten Mäusen, die bis zu 9 mal höhere Mengen an IFN- γ in den mit ihnen interagierenden CD4⁺ T-Zellen induzierten als APC von nicht-infizierten Mäusen (siehe Abb. 3.8). Dabei ist die IFN- γ -Produktion in diesem System Antigen-abhängig, da dieses Zytokin in Abwesenheit von Ova-Peptid nicht nachgewiesen werden konnte. Das spricht dafür, dass das IFN- γ von T-Zellen - nicht aber von möglicherweise noch in den T-Zell-Fractionen enthaltenen NK-Zellen - produziert wird. Der Hauptgrund könnte in der höheren IL-12-Produktion der infizierten APC liegen (siehe Abb. 3.6).

Die *T. cruzi* -infizierten PEC sind potente Stimulatoren der IFN- γ -Produktion von naiven T-Zellen, aber supprimieren gleichzeitig deren IL-2-Produktion (siehe Abb. 3.8). Dabei ist die Reduktion von IL-2 unabhängig von einem Defekt in der Antigen-

Prozessierung der infizierten APC, da dieser Effekt auch bei der Nutzung von APC auftritt, die mit exogenem Peptid beladen wurden.

Diese verminderte IL-2-Sekretion könnte jedoch im Zusammenhang mit der hier beschriebenen Immunsuppression bedeutsam sein, da IL-2 als T-Zell-Wachstumsfaktor essentiell für die Immunantwort ist. Das Zytokin ist wichtig für die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen, die in dem hier untersuchten Infektionssystem erwartungsgemäß ebenfalls stark gehemmt wird (siehe Abb. 3.12). Ein Mangel an IL-2 würde auch die CD4⁺ T-Zell-Hilfe für CD8⁺ T-Zellen beeinträchtigen, was dem Immunsystem eine Bekämpfung der Trypanosomen zusätzlich erschweren würde. Überdies konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Antigen-spezifische IL-2-Sekretion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen - so wie die der CD4⁺ T-Helfer-Zellen - unmittelbar durch infizierte APC inhibiert wird (siehe Abb. 3.24).

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits früher mit anderen experimentellen Infektionssystemen unter Verwendung von anderen Maus- und Trypanosomen-Stämmen demonstrieren, dass die IL-2-Produktion während der akuten Phase einer *T. cruzi* - Infektion unterdrückt wird, und dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Immunantworten gegen Parasiten- sowie andere Antigene durch die Gabe von exogenem IL-2 verstärkt werden können (Tarleton und Kuhn, 1984; Harel-Bellan *et al.*, 1983 u. 1985; Reed *et al.*, 1984; Choromanski und Kuhn, 1985 u. 1987). Studien an menschlichen Patienten weisen auf einen Zusammenhang zwischen der IL-2-Produktion und dem Stadium der Infektion hin (Tarleton *et al.*, 1988). Vor allem die Tatsache, dass exogenes IL-2 die durch eine *T. cruzi* -Infektion bedingte Immunsuppression ganz oder teilweise wieder aufheben kann, deutet darauf hin, dass die Regulierung der Produktion von IL-2 ein wichtiger Mechanismus bei der Immunsuppression durch *T. cruzi* -Infektionen ist. Diese Unterdrückung der IL-2-Produktion ist kritisch für den Gesamtstatus der Immunität während einer *T. cruzi* -Infektion. Damit ist die Suppression der IL-2-Produktion wichtig für die Ermittlung des Immunstatus bei der Infektion und kann folglich als Indikator für die Immunsuppression angesehen werden.

Es konnte bereits von anderen gezeigt werden, dass die verminderte IL-2-Sekretion nicht das Resultat eines Fehlens von IL-1 ist (Harel-Bellan *et al.*, 1983; Beltz *et al.*, 1988). Ferner konnte durch mRNA-Studien ausgeschlossen werden, dass die Zellen nicht-funktionelles IL-2 produzieren, oder dass normale Mengen des Zytokins produziert, diese aber vermehrt verbraucht werden (Nabors und Tarleton, 1991). In Milzzellen infizierter Mäuse wurden z.B. entsprechend verringerte Mengen an IL-2-

mRNA detektiert, so dass von einer Regulation auf der Transkriptionsebene ausgegangen werden kann.

Hier wurde gezeigt, dass mit spezifischem Antigen aktivierte Milzzellen aus *T. cruzi*-infizierten Mäusen sehr viel (um den Faktor 15) höhere Mengen an IFN- γ produzieren als auf die gleiche Weise aktivierte Milzzellen von Kontrollmäusen (siehe Abb. 3.9). Das stimmt mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, die eine Steigerung der IFN- γ -Produktion bei mit Mitogen (ConA) stimulierten Milzzell-Kulturen aus infizierten C57BL/6- oder C3H-Mäusen zeigen konnten (Nabors und Tarleton, 1991; Abrahamsohn und Coffman, 1995; Goni *et al.*, 2002).

IFN- γ ist ein potenter Aktivator für Makrophagen, der die Tötung von protozoischen Parasiten inklusive *T. cruzi*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium sp.* durch diese Zellen verstärken kann (Sonnenfeld *et al.*, 1987). Im Fall von *T. cruzi* wurde festgestellt, dass von T_H1-Zellen stammendes IFN- γ *in vitro* die Entwicklung des Parasiten in Wirtszellen inhibieren kann (Plata *et al.*, 1984; Wirth *et al.*, 1985), und rekombinantes IFN- γ (Plata *et al.*, 1987; Reed, 1988) oder IFN- γ -Induktoren (James *et al.*, 1982) die Parasitämie verringern und die Überlebenszeit infizierter Mäuse erhöhen können. Dies könnte auch erklären, warum die Infektionsraten bei PEC, die im Rahmen dieser Arbeit aus *in vivo*-infizierten Mäusen gewonnen wurden, mit durchschnittlich 15% sehr viel geringer waren als bei *in vitro*-infizierten APC. Die hohen Mengen an IFN- γ in den infizierten Mäusen könnten hier zu einer partiellen Kontrolle der Parasiten in den infizierten Makrophagen beitragen.

Andererseits wurde inzwischen gezeigt, dass IFN- γ nicht nur eine protektive Rolle spielt, sondern dass z.B. die Inhibition der T-Zell-Proliferation bei *T. cruzi*-infizierten Mäusen durch IFN- γ - und NO-Sekretion bedingt werden könnte (Abrahamsohn und Coffman, 1995). Protozoische Parasiten wie *Trypanosoma brucei* und *Toxoplasma gondii* induzieren IFN- γ -abhängig Makrophagen, die die Proliferation von Milzzellen via NO unterdrücken (Candolfi *et al.*, 1994; Channon und Kasper, 1996).

In der vorliegenden Arbeit warf daher besonders die Kinetik von *in vivo*-Infektionen DO11.10-TCR-transgener Mäuse die Frage auf, ob in dem hier untersuchten System nicht die starke Induktion von Effektor-Zytokinen zur Suppression der IL-2-Produktion führen könnte. Mit fortschreitendem Infektionsverlauf *in vivo* fiel nämlich die IL-2-Produktion von Milzzellen ab, die den infizierten Tieren entnommenen worden waren, während es bei Antigen-spezifischer Aktivierung zu einem parallelen Anstieg der IFN- γ -Produktion kam (siehe Abb. 3.10).

Die Blockade von IFN- γ durch spezifische Antikörper konnte jedoch keinen erneuten Anstieg der IL-2-Produktion bewirken (siehe Abb. 3.11).

Ferner wurden auch NO (siehe Abb. 3.8) sowie der potente T_H1 -Induktor IL-12 (siehe Abb. 3.6) in hohem Maße von infizierten APC sezerniert. Die Beteiligung von NO an einer Suppression der T-Zell-Aktivierung konnte in einer Anzahl anderer parasitischer Infektionen dokumentiert werden (James, 1995). Einige Studien haben zudem gezeigt, dass die NO-Produktion von Makrophagen aus der Milz die T-Zell-Proliferation in *T. cruzi*-infizierten Mäusen stört (Abrahamsohn und Coffman, 1995).

Doch auch die Blockade der NO-Produktion von APC durch Aminoguanidin, einen spezifischen Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS), konnte die Hemmung der IL-2-Produktion in infizierten Kulturen nicht aufheben (siehe Abb. 3.11). Ferner führten weder die Neutralisation von IL-12 durch blockierende Antikörper (siehe Abb. 3.11) noch die Nutzung von APC aus IL-12-defizienten Mäusen (siehe Abb. 3.12) zu einer Verringerung der beobachteten Immunsuppression. Daher können die genannten Effektor-Zytokine als Mediatoren der IL-2-Suppression in diesem System ausgeschlossen werden.

Die Erzeugung von NO sowie die Freisetzung von IL-12, das wiederum $CD4^+$ T-Zellen zur IFN- γ -Sekretion veranlasst, können ausgelöst werden durch Signalgebung über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) wie den Toll-ähnlichen Rezeptor (*Toll-like receptor*) TLR-2. GPI-Anker und Glykoinositolphospholipide von *T. cruzi* sollen starke Aktivatoren von humanem und murinem TLR-2 sein. Campos *et al.* (2001) konnten anhand von Experimenten mit Makrophagen von TLR-2-defizienten Mäusen zeigen, dass die TLR-2-Expression essentiell für die Induktion von IL-12, TNF- α und NO durch GPI-Anker von Trypomastigoten ist. Bereits in früheren Studien wurde den GPI-Ankern von Trypomastigoten eine große Rolle bei der Auslösung verschiedenster proinflammatorischer und Effektor-Funktionen von Makrophagen via Induktion der Synthese proinflammatorischer Zytokine zugesprochen (Camargo *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2000). Diese scheint demnach vornehmlich auf einer Aktivierung über TLR-2 zu beruhen.

Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass ein von *T. cruzi* freigesetztes Protein mit der Bezeichnung *Tc52* ebenfalls zu einer TLR-2-Aktivierung bei der Wirtszelle führt (Ouaissi *et al.*, 2002). Dieses Protein gehört zur Thiol-Disulfid Oxidoreduktase-Familie und bindet an DC und Makrophagen, nicht aber an T-Zellen. Dabei induziert die TLR-2-Aktivierung hier abweichend vom klassischen Profil, das im Fall von LPS u.a. verwandten Molekülen wie GPI und GIPLs festzustellen ist, die Produktion inflammatorischer Chemokine und Monokine wie IL-8, MCP-1 und MCP-1 α . Kürzlich wurde allerdings auch gezeigt, dass Moleküle von Pathogenen eine spezifische Immunsuppression durch Bindung an TLR induzieren können (Sing *et al.*, 2002).

Um eine Signalgebung über TLR-2 und deren Folgen als Ursache für die infektionsbedingte IL-2-Suppression der T-Zellen auszuschließen, wurden Experimente mit PEC aus TLR-2-defizienten Mäusen durchgeführt, die *in vivo* infiziert worden waren. Bei dem Einsatz dieser Makrophagen für die Stimulation von T-Zellen wurden IL-2-Produktion und Proliferation der Zellen im selben Maße gehemmt wie bei Stimulation durch infizierte Makrophagen von Wildtyp-Mäusen (Abschnitt 3.9, Abb. 3.25). Daher scheint eine Beteiligung des TLR-2-Signalweges in diesem System nicht mit der Immunsuppression assoziiert zu sein.

Im vergangenen Jahr wurde von Goni *et al.* erstmals beschrieben, dass die Unterdrückung der Proliferation *T. cruzi*-infizierter Milzzellen durch eine heterogene Population myeloider Zellen, die Ly-6G (Gr1) und CD11b exprimieren, verursacht wird. Dieser Suppressionsmechanismus ist IFN- γ -abhängig und wird durch NO-Sekretion vermittelt (Goni *et al.*, 2002). Die genannten Zellen inhibierten eine durch Mitogene induzierte T-Zell-Proliferation, wohingegen die Depletion CD11b-positiver Zellen die NO-Produktion beseitigte und eine ConA-induzierte Proliferation - nicht jedoch die IL-2-Synthese - von Milzzellen infizierter Mäuse wieder herstellte. Die beschriebene Zell-Population ist damit vermutlich nicht verantwortlich für die bei der *T. cruzi*-Infektion auftretende Verminderung von IL-2. Außerdem werden die IL-2-Produktion und die Expression von IL-2-Rezeptor α (CD25) bei IFN- γ -Rezeptor-defizienten Mäusen, die die betreffenden Zellen nicht enthalten, und bei iNOS-defizienten Mäusen, die kein NO produzieren können, genauso stark beeinträchtigt wie bei Kontroll-Mäusen (Goni *et al.*, 2002). Das deutet darauf hin, dass die Inhibition der IL-2-Sekretion sowie die Inhibition der IL-2-Rezeptor α -Expression unabhängig sind von NO-Produktion und IFN- γ -Signalgebung, was die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde bestätigt. Diese Ergebnisse weisen auf die Existenz mehrerer alternativer Mechanismen der Immunsuppression hin, die sowohl die Proliferation als auch die IL-2-Produktion unabhängig voneinander hemmen können. Außerdem deutet es darauf hin, dass schon geringe Mengen an IL-2 und IL-2-Rezeptor α bereits für die Induktion einer effizienten T-Zell-Proliferation ausreichen können (Goni *et al.*, 2002). Dies stimmt mit den hier gewonnenen Ergebnissen der T-Zell-Übertragungsversuche (Transfer-Experimente, vgl. Schema/Abb. 3.19) überein, bei denen T-Zellen, nachdem sie von den infizierten PEC abgenommen und zur Restimulation auf nicht-infizierte PEC gegeben worden waren, wieder deutlich proliferieren konnten, während die IL-2-Produktion weiterhin gehemmt war (Abschnitt 3.5, Abb. 3.20). Demnach lagen die von Goni beschriebenen Proliferations-supprimierenden Faktoren (infizierte Makrophagen, IFN- γ , NO) nach dem Transfer nicht mehr vor, der davon unabhängige Einfluss auf die

IL-2-Produktion wirkte jedoch weiter. Werden T-Zellen einmal von *T. cruzi* -infizierten Zellen stimuliert, so weisen sie einen lang anhaltenden Defekt auf, der sie auch bei späteren Antigen-spezifischen Stimulationen noch hemmt.

4.3 Anti-inflammatorische Zytokine

Da die hier betrachtete Hemmung der T-Zell-Antwort weder durch eine Inhibierung der Antigen-Präsentation noch durch die starke Produktion von T_H1 -Zytokinen oder NO verursacht wird, wurden weitere potentielle Mechanismen untersucht. Die Immunsuppression, die in Anwesenheit *T. cruzi* -infizierter APC beobachtet wird, könnte auch über andere gut charakterisierte lösliche Mediatoren induziert werden. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF- β können T-Zell-Antworten unterdrücken (Akdis und Blaser, 2001; Moustakas *et al.*, 2002). IL-10 wirkt dabei, indem es die Freisetzung von Lymphokinen durch T_H1 -Zellen via Störung der Antigen-Prozessierung und Präsentation inhibiert (Fiorentino *et al.*, 1989) sowie die notwendige Kostimulation der T-Zellen über CD28 verhindert (Akdis und Blaser, 2001; Akdis *et al.*, 2001). Und TGF- β als das zweite wirksame immunsuppressorische Zytokin inhibiert die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, T-Zellen und DC sowie deren Aktivierung durch andere Zytokine (Moustakas *et al.*, 2002).

Bei der *T. cruzi* -Infektion wurde IL-10 in einigen Mausmodellen mit einer verstärkten Suszeptibilität assoziiert, denn in suszeptiblen Mäusen wurde verglichen mit resistenteren Stämmen eine gesteigerte IL-10-Produktion festgestellt, und die Gabe von anti-IL-10-Antikörpern erhöhte die Resistenz in einem Mausstamm mit normaler Suszeptibilität (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994). Andererseits wurde mit Hilfe IL-10-defizienter Mäuse demonstriert, dass IL-10 benötigt wird, um der Entwicklung der Pathologie bei Infektion mit dem virulenten *T. cruzi* -Stamm Tulahuén vorzubeugen (Hunter *et al.*, 1997). Studien mit SCID-Mäusen legten dar, dass IL-10 während der experimentellen *T. cruzi* -Infektion sowohl von Makrophagen als auch B- und T-Zellen produziert wird (Reed, 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Infektion von Milzzellen mit *T. cruzi* in dem hier genutzten System keine erhöhte IL-10-Sekretion nach sich zieht (siehe Abb. 3.13).

Auf eine Rolle von TGF- β bei der Vermittlung der Suszeptibilität gegenüber der *T. cruzi* -Infektion haben Befunde anderer Arbeitsgruppen hingedeutet. Makrophagen,

die *in vitro* infiziert worden waren, setzten biologisch aktives TGF- β 1 frei, und die Gabe von rekombinantem TGF- β konnte bei B6D2-Mäusen sowohl die Parasitämie als auch die Mortalität erhöhen (Reed, 1998).

In dem hier untersuchten System wurde bei der Infektion von PEC mit *T. cruzi* die Freisetzung des immunsuppressiven Zytokins TGF- β 1 jedoch nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 3.13). Zusätzlich deutet die *in vitro* -Neutralisation von TGF- β 1 darauf hin, dass dieses Zytokin keine Rolle bei der IL-2-Hemmung spielt (siehe Abb. 3.11).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass T_H1 -Zytokine in infizierten Kulturen induziert, inhibitorische Zytokine aber nicht verstärkt sezerniert werden. Damit scheint die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine in den hier durchgeführten Experimenten nicht an der Vermittlung der auftretenden Suppression der T-Zell-Antwort beteiligt zu sein.

Neben den bisher in dieser Arbeit untersuchten Mediatoren wurden noch andere lösliche Substanzen wie IL-4 und Prostaglandine, die bei Kontakt mit Parasiten-Antigenen freigesetzt werden, als Ursache für die *T. cruzi* -induzierte Immunsuppression vorgeschlagen (Kierszenbaum, 1982; Tarleton, 1988a; Pinge-Filho *et al.*, 1999).

Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit in Transfer-Experimenten mit den Überständen von infizierten PEC insgesamt keine signifikanten Effekte löslicher Mediatoren gezeigt werden. Die Stimulation naiver Milzzellen in Anwesenheit von Kultur-Überständen infizierter PEC kann zumindest die starke Immunsuppression (bis hin zu einer 90%-igen IL-2-Reduktion) nicht erklären, die bei dem direkten Kontakt infizierter PEC mit T-Zellen beobachtet wurde (siehe Abb. 3.14). Generell konnte daher in den hier durchgeführten Experimenten ausgeschlossen werden, dass lösliche Faktoren hauptverantwortlich für die durch Infektion verminderte IL-2-Produktion und damit Hauptursache der beobachteten Immunsuppression sind.

Gestützt werden diese Ergebnisse durch Experimente, in denen der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen den infizierten APC und den T-Zellen blockiert wurde (Abschnitt 3.2.5). Dazu wurde ein Transwell-Membran-System eingesetzt, bei dem mit Hilfe einer Membran eine zweite Kammer innerhalb desselben Zellkulturgefäßes geschaffen wird (siehe Abb. 3.15). Auf diese Weise befanden sich beide Zellpopulationen zwar in demselben Medium, und lösliche Proteine wie Antigene, Zytokine oder andere lösliche Faktoren konnten die Membran passieren, aber die infizierten Zellen wurden durch die Membran an einem direkten Kontakt mit den Antigen-spezifisch stimulierten Milzzellen gehindert. Diese Experimente belegen, dass die Suppression der IL-2-Produktion von

T-Zellen durch infizierte APC kontaktabhängig ist (siehe Abb. 3.16) und sprechen damit für eine Kontaktabhängigkeit der Immunsuppression im vorliegenden Modell der *T. cruzi*-Infektion. Zusätzlich unterstreichen die Transwell-Experimente die Befunde, dass bei der Infektion mit *T. cruzi* ein dominanter Effekt der IL-2-Suppression vorliegt, denn wenige infizierte PEC können die IL-2-Produktion naiver nicht-infizierter Milzzellen in Gegenwart eines großen Überschusses nicht-infizierter APC inhibieren. FACS-Analysen von Gesamtmilzzellen zeigten nämlich, dass in der Milz lediglich etwa 30% der Zellen T-Zellen sind, der Rest setzt sich aus B-Zellen (fast 60%), Makrophagen, DC u.a. Zelltypen zusammen, die auch in der Lage sind, Antigen zu präsentieren (siehe Abb. 3.17 u. Tab. 3.2). Einige wenige infizierte Makrophagen sind daher in der Lage, in Gegenwart eines großen Überschusses an nicht-infizierten APC T-Zellen zu supprimieren. So konnten z.B. APC aus infizierten Mäusen die Menge an produziertem IL-2 von Gesamtmilzzellen bei direktem Kontakt hemmen (siehe Abb. 3.16, ohne Transwell). In Kulturen, in denen die PEC aus infizierten Mäusen durch eine Membran am direkten Kontakt mit Milzzellen gehindert wurden, war hingegen sogar eine höhere IL-2-Konzentration detektierbar als in den entsprechenden Kulturen mit PEC aus nicht-infizierten Mäusen (siehe Abb. 3.16, Transwell-System). Das könnte damit zusammenhängen, dass die Blockade des direkten Zellkontaktes eine Suppression unterbindet, aber lösliche Faktoren wie IL-12, das von den infizierten Makrophagen sezerniert wird, T-Zellen stimuliert und ihre IL-2-Produktion möglicherweise verstärkt. Ein solcher Effekt würde wahrscheinlich im Fall des direkten Zellkontaktes von der starken Suppression überlagert.

Die IL-2-Suppression scheint demnach durch Zell-assoziierte Mechanismen ausgelöst zu werden, da infizierte Zellen in direktem Zellkontakt zu den T-Zellen stehen müssen, um diese zu hemmen. Daher sollen im Folgenden mögliche kontaktabhängige Mechanismen diskutiert werden.

4.4 Kontakt-abhängige Mechanismen

Um die Mechanismen der kontaktabhängigen Immunsuppression näher zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob *T. cruzi*-infizierte APC die Expression membranständiger Faktoren auf den T-Zellen induzieren können, die eine Immunsuppression erklären könnten. Eine Hypothese war dabei, dass T-Zellen durch infizierte Antigen-präsentierende Zellen ein verstärktes Signal erhalten und so möglicherweise abgeschaltet werden könnten, da beispielsweise B7.2 bei Infektion auf der APC-Oberfläche vermehrt exprimiert wird (siehe Abb. 3.3 u. Tab. 3.1). Daher wurde die Funktion dieser

Kostimulatoren näher untersucht. Zum Beispiel verstärkt die Infektion von Mäusen mit *T. cruzi* die Expression des negativen Regulators CTLA-4 auf T-Zellen (vgl. Abschnitt 3.4). Da ein Engagement von CTLA-4 über B7 die Proliferation von T-Zellen hemmt, indem die Expression des IL-2-Rezeptors reduziert, die IL-2-Produktion vermindert und der Zellzyklus arretiert werden (Krummel und Allison, 1996; Greenwald *et al.*, 2002), war dieses Molekül ein nahe liegender Kandidat als potentieller Verursacher der infektionsbedingten Immunsuppression.

Durch eine Blockade von CTLA-4 in Stimulationsexperimenten konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass eine verstärkte CTLA-4-Expression während der Infektion die Suppression der IL-2-Produktion bedingt (siehe Abschnitt 3.4, Abb. 3.18). Somit kann in diesem System eine erhöhte CTLA-4-Expression als Hauptursache für die beobachtete Immunsuppression ausgeschlossen werden.

Außerdem spricht gegen eine Beteiligung der kostimulatorischen Moleküle, dass auch MHC-II-transfizierte Fibroblasten, die keine kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, nach Infektion mit *T. cruzi* die T-Zell-Antwort supprimieren (Abschnitt 3.11.1, Abb. 3.27).

Eine andere Möglichkeit der Immunsuppression besteht darin, dass T-Zellen durch infizierte APC aktiviert und dann durch Apoptose deletiert werden. Von verschiedenen Gruppen wurde eine erhöhte TCR-induzierte Apoptose von CD4⁺ T-Zellen *T. cruzi*-infizierter Mäuse beschrieben (Abrahamsohn und Coffman, 1995; Nunes *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998).

Färbungen mit Trypanblau belegten jedoch, dass die Zellen in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nach Stimulation durch infizierte APC noch lebten. Wie bereits erwähnt konnten die T-Zellen, die einmal durch *T. cruzi*-infizierte PEC stimuliert wurden, auf eine zweite Stimulation durch nicht-infizierte Zellen hin wieder deutlich proliferieren, obwohl ihre Proliferation während der ersten Stimulation durch die infizierten APC inhibiert worden war (Abschnitt 3.5, Abb. 3.20). Auch das spricht dafür, dass die T-Zellen prinzipiell viabel sind. Des weiteren scheint die Suppression nicht den Tod der entsprechenden T-Zellen zu verursachen, da die IFN- γ -Produktion der Zellen infolge der Stimulation ansteigt. Außerdem lassen sich Milzzellen trotz *T. cruzi*-Infektion durch Antigen-unabhängige Stimuli polyklonal über den CD3-Komplex aktivieren (Abschnitt 3.6, Abb. 3.21). In diesem Fall tritt sogar das Gegenteil einer IL-2-Reduktion auf, die bei der Antigen-spezifischen Stimulation zu beobachten ist. In diesem Fall sezernieren infizierte Kulturen mehr IL-2 als nicht-infizierte Kulturen. Der inhibitorische Effekt tritt demnach im vorliegenden System nur auf, wenn T-Zellen über das Antigen-spezifische Signal aktiviert werden.

Als Beleg für die Viabilität der infizierten APC selber kann die Tatsache herangezogen werden, dass IL-12 und NO von ihnen produziert werden. Außerdem schließen die Experimente mit Gesamtmilzzellen aus, dass die verringerte IL-2-Produktion darauf beruht, dass die T-Zellen im Stimulationsexperiment nur noch auf tote APC treffen, durch die sie nicht mehr aktiviert werden können. In diesen Experimenten kommt es trotz Anwesenheit eines großen Überschusses nicht-infizierter und viabler APC zur Inhibition der T-Zell-Antwort (vgl. Abb. 3.16, ohne Transwell). La Flamme *et al.* (1997) konnten mit der murinen Makrophagen-Linie J774 ebenfalls eine verminderte Lebensfähigkeit der infizierten APC ausschließen.

Des weiteren wird die Immunsuppression nicht durch subtile Veränderungen an der immunologischen Synapse bedingt, die durch die Infektion der APC induziert werden könnten, denn - wie bereits erwähnt - hemmt auch die Infektion von Fibroblasten, die lediglich mit MHC-II-kodierenden Konstrukten transfiziert wurden, die IL-2-Produktion von T-Zellen, denen ihr spezifisches Antigen präsentiert wird (Abschnitt 3.11.1, Abb. 3.27).

Außerdem wird die Immunsuppression auch bei nicht-passendem MHC-Haplotyp durch infizierte APC vermittelt. So supprimieren die BALB/c-PEC während der Antigen-spezifischen Stimulation die IL-2-Produktion von BALB/c-T-Zellen in gleichem Maße wie PEC aus C57BL/6-Mäusen, die über ihre MHC-Moleküle nicht Antigen-spezifisch mit den T-Zellen interagieren können (Abschnitt 3.10, Abb. 3.26). Offensichtlich reicht der Kontakt zu infizierten APC - ohne eine direkte Interaktion mit dem spezifischen Antigen - bereits aus, um eine Unterdrückung der von den infizierten Zellen unabhängigen Antigen-spezifischen Stimulation hervorzurufen.

Daher scheinen die besonderen Eigenschaften oder Fähigkeiten professioneller APC zur Induktion der beschriebenen Immunsuppression nicht vonnöten zu sein. Für den Parasiten-induzierten Effekt der T-Zell-Suppression ist deshalb unwahrscheinlich, dass in infizierten Zellen immunregulatorische Faktoren induziert werden, da diese in den mit MHC transfizierten Fibroblasten nicht vorhanden sind. Die Zellen bewirken die T-Zell-Suppression demnach offenbar nicht durch eine Induktion von spezifischen immunregulatorischen Mechanismen infolge ihrer Infektion.

Dass dieser inhibitorische Effekt auf freien Trypanosomen beruht, ist aufgrund der kurzen Infektionsdauer sehr unwahrscheinlich. Zudem konnten in den durchgeführten mikroskopischen Kontrollen keine freien Trypomastigoten entdeckt werden.

Ferner konnte ausgeschlossen werden, dass veränderte Membranfluiditäten oder veränderte Lipidstrukturen von infizierten Zellen für die durch diese infizierten Zellen verursachte T-Zell-Inhibition verantwortlich sind. Das belegen Experimente mit Zellen, die nach ihrer Infektion fixiert wurden. Diese fixierten Zellen bewirkten eine ebenso starke Immunsuppression wie nicht-fixierte Zellen (Abschnitt 3.11.2, Abb. 3.28). Es ist folglich auch nicht notwendig, dass infizierte Zellen noch stoffwechselaktiv sind, um die IL-2-Produktion der T-Zellen zu inhibieren.

Die geschilderten Versuchsergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch die *T. cruzi* -Infektion entweder die Expression eines Proteins der Wirtszelle induziert wird, oder aber ein Faktor der Trypanosomen auf die Oberfläche der Zelle gelangt, der die Immunsuppression vermittelt.

Als ein Kandidat für die bei der Infektion mit *T. cruzi* auftretende Immunpathologie gilt die *trans*-Sialidase (TS) des Parasiten. Dieses Molekül ist auf der Trypanosomen-Membran GPI-verankert und katalysiert den Transfer von Sialinsäureresten von Wirts-Donor-Molekülen auf Parasiten- oder Wirtszell -Glykoproteine. Es kann während der akuten Infektion des Menschen in relativ hohen Mengen ins Serum freigesetzt werden. Während die Oberflächen-TS für die Invasion des Parasiten in Säugerzellen benötigt wird, scheint die lösliche TS ein Virulenzfaktor zu sein, der zur Verstärkung der Parasitämie und Mortalität von *T. cruzi* -infizierten Mäusen beiträgt (Todeschini *et al.*, 2002). Die TS bindet auf der T-Zell-Oberfläche an CD43, einen negativen Regulator der T-Zell-Aktivierung.

Ein CD43-Engagement durch die TS des Parasiten konnte in der vorliegenden Arbeit als Ursache für die beobachtete Immunsuppression ausgeschlossen werden, indem mögliche Effekte des Moleküls auf zwei Wegen aufgehoben wurden. Zum einen wurde das Oberflächen-Antigen CD43 auf den Zellen durch die Gabe von anti-CD43-Antikörpern maskiert und zum anderen wurden alle Sialinsäurereste enzymatisch von der Oberfläche der naiven T-Zellen abgespalten, um eine denkbare Interaktion mit CD43 zu verhindern (Abschnitt 3.7). In beiden Fällen wurden die IL-2-Produktion und die Proliferation der Zellen genauso stark unterdrückt wie in den Kontrollen (siehe Abb. 3.22 und 3.23).

Die Experimente mit infizierten Fibroblasten-Linien deuten darauf hin, dass möglicherweise verschiedenste Arten von Zellen die auftretenden immunsuppressiven Effekte induzieren können (Abschnitt 3.11.3, Abb. 3.29). Nicht die unmittelbar an der Antigen-spezifischen Stimulation von T-Zellen beteiligten professionellen APC müssen

notwendigerweise mit Trypanosomen infiziert sein, sondern der Kontakt der an einer APC-T-Zell-Interaktion beteiligten Zellen mit gewöhnlichen *T. cruzi*-infizierten Körperzellen reicht aus, um die Immunantwort zu beeinträchtigen. Keine der Immunzellen muss dazu selbst infiziert sein. Die Infektion mit den Parasiten führt - wie schon erwähnt - möglicherweise zu der Induktion eines Faktors auf der Oberfläche von Wirtszellen, der in einem Kontakt-abhängigen Mechanismus inhibitorisch auf T-Zellen wirken kann.

Dieser Befund könnte eine kürzlich erschienene Arbeit von Leavey u. Tarleton (2003) erklären, die gezeigt hat, dass in Muskelgewebe eingewanderte T-Zellen nicht funktionell sind. Vor allem CD8⁺ T-Zellen wandern während der chronischen Infektion mit *T. cruzi* in großer Zahl in Muskelgewebe ein. Bisher wurde allgemein angenommen, dass die krankheitsbedingten Gewebeschäden ein Resultat der eingewanderten Lymphozyten seien. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die in den Muskeln lokalisierten CD8⁺ T-Zellen chronisch aktiviert seien und dadurch Schaden verursachen. Die Untersuchungen von Leavey u. Tarleton belegen jedoch, dass diese T-Zellen - trotz der Expression von Oberflächenmolekülen, die mit einem Effektor- oder Gedächtniszell-Phänotyp assoziiert werden - kaum Effektor-Aktivitäten aufweisen, sondern vielmehr nicht funktionell sind. Dabei sind sie weder apoptotisch noch scheinen sie im klassischen Sinne anerg zu sein. Die Forscher spekulieren, dass der Defekt dieser Zellen durch die Persistenz des Parasiten direkt vor Ort (und eine damit verbundene andauernde Stimulierung), durch inhibitorische Komponenten des Muskelgewebes selbst oder eine Kombination von beidem bedingt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Mechanismen der Immunsuppression könnten einen sehr großen Einfluss für die Fähigkeit der Trypanosomen haben, im Wirt zu persistieren. Während der chronischen Phase der Chagas-Krankheit können die Parasiten vor allem in Muskelgeweben überdauern. Das könnte möglicherweise dadurch erleichtert werden, dass T-Zellen zwar in diese Gewebe einwandern können, dort aber durch Kontakt mit infizierten Muskelzellen abgeschaltet werden. In der akuten Phase einer *T. cruzi*-Infektion hingegen findet man vor allem infizierte Antigen-präsentierende Zellen. Daher hat man möglicherweise bisher hauptsächlich diesen Immunzellen selber die suppressiven Effekte zugeschrieben, die im Verlauf der Infektion beobachtet wurden. In der chronischen Phase sind dann aber auch andere Zellen von einer direkten Infektion betroffen und können dann womöglich ebenso zur Persistenz des Krankheitserregers beitragen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung durch einen Mangel an Antigen-präsentierenden oder kostimulierenden

Molekülen auf der Oberfläche der APC ausgeschlossen werden kann. Immunsuppressive Effekte können in den durchgeführten Experimenten nicht durch eine ausbleibende T-Zell-Aktivierung über die Antigen-präsentierenden und kostimulatorischen Moleküle MHC-II und B7.2 durch infizierte APC induziert werden. Zudem üben infizierte Zellen ihre suppressiven Effekte nicht über die Sezernierung gut bekannter löslicher Mediatoren wie IL-10 und TGF- β aus. Stattdessen wird ein immunsuppressiver Effekt durch direkten zellulären Kontakt vermittelt und kann nicht durch Fixierung der infizierten Zellen aufgehoben werden. Die exakte Natur des Zelloberflächenmoleküls, das an dieser Inhibition beteiligt ist, muss noch aufgeklärt werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus. Ein ähnlicher Effekt wurde für Nematoden-Infektionen mit dem Parasiten *Brugia malayi* beschrieben. Die Infektion von Mäusen mit diesem Nematoden führt zu einer IL-4-abhängigen Aktivierung von Makrophagen, die die Proliferation zahlreicher Zellen blockieren können, wobei hier ebenfalls ein direkter Zellkontakt notwendig ist (Loke *et al.*, 2000).

Bei der vermittelten Immunsuppression handelt es sich um einen sehr dominanten, lang anhaltenden Effekt, der sowohl die Aktivitäten von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen beeinträchtigt und der nicht nur durch professionelle APC induziert werden kann, sondern auch durch gewöhnliche Körperzellen wie z.B. Fibroblasten, die von *T. cruzi* infiziert werden. Diese Inhibition könnte dazu beitragen, dass *T. cruzi*-spezifische T-Zellen nicht dazu in der Lage sind, den Parasiten effizient im infizierten Wirt zu vernichten.

Die von *T. cruzi* induzierte Immunsuppression gegenüber homologen und heterologen Antigenen wird als eine Konsequenz der unspezifischen mikrobiellen Mitogenität und damit der polyklonalen Aktivierung des Immunsystems interpretiert (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). Da aber beispielsweise die starke Induktion von T_H1-Zytokinen wie IFN- γ etc. laut der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht die Reduktion der IL-2-Produktion bedingen, könnten dies folglich Prozesse sein, die mechanistisch nicht (kausal) miteinander verknüpft sind. Zumindest die IL-2-Suppression scheint keine Konsequenz der polyklonalen Aktivierung zu sein. Es handelt sich eher um zwei voneinander unabhängige Vorgänge. Einerseits tritt durch Parasiten-stämmige Moleküle eine starke polyklonale Aktivierung auf, bei der Antigen-unspezifisch IL-12 produziert und die IFN- γ -Produktion induziert wird. Andererseits kommt es durch einen Parasiten-induzierten Faktor auf infizierten Zellen zu einer kontaktabhängigen Suppression, die bei Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten zu einer Reduktion der IL-2-Produktion führt.

Unabhängig von der IL-2-Suppression können die hohen Mengen von IFN- γ zusammen mit dem bei Infektion ebenfalls vermehrt freigesetzten TNF- α (Tarleton, 1988b) möglicherweise eine Immunsuppression via Proliferationshemmung durch die von Goni *et al.* (2002) beschriebenen CD11b-positiven Zellen fördern. Daher treten bei der Infektion mit *T. cruzi* offenbar noch mehr parallel wirkende Mechanismen zur Unterdrückung der Wirts-Immunantwort auf, als bisher ohnehin schon angenommen wurde. Zudem gibt es offensichtlich nicht nur zwei Populationen von Suppressor-Zellen, nämlich die genannten adhärennten Makrophagen-ähnlichen und die von Tarleton u.a. beschriebenen T-Suppressor-Zellen, sondern eine Infektion mit *T. cruzi* verändert außerdem eine beliebige infizierte Zelle so, dass deren Kontakt eine inhibitorische Wirkung auf T-Zellen hat. Das führt mit der IL-2-Inhibition zu einem Verlust von T-Zell-Effektorfunktionen, der die Persistenz von *T. cruzi* während der akuten Phase der Infektion begünstigt.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde versucht, die Mechanismen näher zu analysieren, die für die Immunsuppression, welche bei der *T. cruzi* -Infektion beobachtet wird, verantwortlich sind. Die Resultate deuten auf die Existenz eines Mechanismus der Immunsuppression hin, der von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig ist. Hierauf aufbauend müsste in einem nächsten Schritt die Identifikation der beteiligten Moleküle erfolgen, was dann insgesamt zu einem besseren Verständnis der Immunologie der *T. cruzi* -Infektion führen würde.

5 Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Protozoon *Trypanosoma cruzi* (Chagas-Krankheit) stellt eine der bedeutendsten Tropenparasitosen des Menschen dar, die häufig zu chronischen Krankheitsverläufen führt, welche aufgrund von Organversagen tödlich enden können. Die Hauptursache dieser schweren Krankheitsverläufe liegt in der unzureichenden Bekämpfung des Parasiten durch das Immunsystem. Zwar ruft die Infektion mit *T. cruzi* im Verlauf der akuten Phase eine starke Aktivierung des Immunsystems hervor, aber die Immunantworten des Wirtes reichen in der Regel nicht aus, um den Körper vollständig von den Parasiten zu befreien. Während der Infektion tritt nach einer polyklonalen Aktivierung von T- und B-Lymphozyten sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen eine Immunsuppression auf, bei der Immunantworten gegen Mitogene sowie Parasiten-spezifische und Parasiten-unspezifische Antigene unterdrückt werden. Diese Immunsuppression wird für die Disseminierung und Persistenz des Parasiten im infizierten Wirt verantwortlich gemacht.

Obwohl das Auftreten einer Immunsuppression bei *T. cruzi*-Infektionen bereits umfassend belegt worden ist, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt. Daher wurde in dieser Arbeit näher untersucht, welche Mechanismen für die durch *T. cruzi* induzierte Immunsuppression verantwortlich sein können. Dazu wurde überprüft, wie eine *T. cruzi*-Infektion muriner Zellen die Stimulation von ruhenden T-Zellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Infektions- und Stimulationssystem etabliert. Da *T. cruzi* in der akuten Phase überwiegend Makrophagen infiziert, wurde zunächst vornehmlich eine Infektion dieser Zellen betrachtet. Für Stimulationsexperimente wurden T-Zellen verwendet, die einen transgenen T-Zell-Rezeptor mit definierter Spezifität für Ovalbumin-Peptide tragen. Um diese naiven T-Zellen zu stimulieren, wurden adhärente peritoneale Exsudat-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC) eingesetzt, die entweder *in vitro* mit *T. cruzi* infiziert oder aus infizierten Mäusen gewonnen worden waren. Auch in dem etablierten *in vitro*-System führte die Infektion mit *T. cruzi* zu einer starken Suppression der T-Zell-Antwort.

T. cruzi-infizierte APC erwiesen sich dabei in Gegenwart von Antigen zwar als potente Stimulatoren der IFN- γ -Produktion naiver T-Zellen, gleichzeitig supprimierten sie jedoch die Sezernierung des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 sowie die Proliferation der T-Zellen. Dadurch werden wichtige T-Zell-Effektorfunktionen inhibiert, was *in vivo* die Persistenz von *T. cruzi* während der akuten Phase der Infektion begünstigen könnte.

Bei den infizierten APC selber kam es zu einer starken IL-12-Sekretion sowie einer hohen Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Letzteres sowie auch die genannten Effektor-Zytokine konnten in diesem System als Mediatoren der IL-2-Suppression ausgeschlossen werden, denn weder die Blockade der NO-Produktion noch die Neutralisation von IL-12 oder IFN- γ konnten die Hemmung der IL-2-Sekretion in infizierten Kulturen aufheben.

Die Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung durch einen Mangel an Antigen-präsentierenden MHC-Molekülen oder kostimulierenden B7-Molekülen auf der Oberfläche der infizierten APC konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Zudem übten infizierte Zellen ihre suppressiven Effekte nicht über die Sezernierung gut charakterisierter löslicher Mediatoren wie IL-10 und TGF- β aus. Stattdessen wurde der immunsuppressive Effekt durch direkten zellulären Kontakt vermittelt und konnte nicht durch Fixierung der infizierten Zellen aufgehoben werden. Von anderen Gruppen wurde gezeigt, dass Moleküle von Pathogenen eine spezifische Immunsuppression durch Bindung an „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) induzieren können. Eine Beteiligung des TLR-2-Signalweges konnte in dem vorliegenden System aber ausgeschlossen werden. Auch die *trans*-Sialidase des Parasiten, die als ein Kandidat für die bei der *T. cruzi*-Infektion auftretende Immunpathologie gilt, war nicht die Ursache für die beobachtete Immunsuppression. Bei der vermittelten Immunsuppression handelte es sich um einen sehr dominanten, lang anhaltenden Effekt, da dieser sogar in Gegenwart eines großen Überschusses an nicht-infizierten APC auftrat und die einmal betroffenen T-Zellen auch bei einer Restimulation durch nicht-infizierte Zellen weiterhin in ihren Funktionen inhibierte. Die Immunsuppression betraf sowohl die Aktivitäten von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen und konnte nicht nur durch professionelle APC induziert werden, sondern auch durch gewöhnliche Körperzellen wie z.B. Fibroblasten, die mit *T. cruzi* infiziert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Kontakt-abhängiger Mechanismus der Immunsuppression nachgewiesen werden, der von *T. cruzi*-infizierten Zellen ausgeübt wird. Dabei ist dieser Effekt nicht nur auf Antigen-präsentierende Zellen begrenzt, sondern kann wahrscheinlich von allen infizierten Zellen induziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsohn IA, Coffman RL. 1995.** Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **155**: 3955-63.
- Abramson S, Miller RG, Phillips RA. 1977.** The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* **145**: 1567-79.
- Akdis CA, Blaser K. 2001.** Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* **103**: 131-6.
- Akdis CA, Joss A, Akdis M, Blaser K. 2001.** Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int Arch Allergy Immunol* **124**: 180-2.
- Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, Gonzalez Cappa SM. 2003.** *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun* **71**: 1194-9.
- Aliberti JC, Cardoso MA, 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. *Infect Immun* **64**: 1961-7.
- Aliberti JC, Machado FS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Silva JS. 1999.** Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun* **67**: 2810-4.
- Almeida DR, Carvalho AC, Branco JN, Pereira AP, Correa L, Vianna PV, Buffolo E, Martinez EE. 1996.** Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant* **15**: 988-92.
- Almeida IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA. 2000.** Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J* **19**: 1476-85.
- Almeida IC, Gazzinelli RT. 2001.** Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* **70**: 467-77.
- Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. 1985.** Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res* **18**: 499-506.
- Andrade ZA. 1999.** Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**: 71-80.
- Andrews NW. 1993.** Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol Res* **26**: 65-7.
- Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. 1987.** Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **64**: 474-84.
- Andrews NW, Whitlow MB. 1989.** Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol* **33**: 249-56.
- Araujo FG. 1989.** Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun* **57**: 2246-8.

- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* **48**: 211-21.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* **317**: 359-61.
- Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi M L, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F. 1996. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* **131**: 301-7.
- Beltz LA, Szein MB, Kierszenbaum F. 1988. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. *J Immunol* **141**: 289-94.
- Ben Younes-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G. 1988. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**: 77-83.
- Bilzer T, Stavrou D, Dahme E, Keiditsch E, Burring KF, Anzil AP, Wechsler W. 1991. Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **418**: 281-93.
- Bluestone JA. 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* **2**: 555-9.
- Bluestone JA. 1997. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol* **158**: 1989-93.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. 1988. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol* **106**: 1349-58.
- Buckner FS, Wipke BT, Van Voorhis WC. 1997. *Trypanosoma cruzi* infection does not impair major histocompatibility complex class I presentation of antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* **27**: 2541-8.
- Buckner FS, Wilson AJ, Van Voorhis WC. 1999. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun* **67**: 403-9.
- Burleigh BA, Woolsey AM. 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol* **4**: 701-11.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, 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**: 5890-901.
- Cammarota G, Scheirle A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, Sinigaglia F. 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**: 799-801.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**: 416-23.
- Cancado JR. 2002. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **44**: 29-37.

- Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. 1994.** Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* **62**: 1995-2001.
- Cardillo F, Nomizo A, Mengel J. 1998.** The role of the thymus in modulating gammadelta T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol* **10**: 107-16.
- Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. 2000.** Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* **1**: 305-10.
- Cerrone MC, Ritter DM, Kuhn RE. 1992.** Effect of antigen-specific T helper cells or interleukin-2 on suppressive ability of macrophage subsets detected in spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice as determined by limiting dilution- partition analysis. *Infect Immun* **60**: 1489-98.
- Cetron MS, Basilio FP, Moraes AP, Sousa AQ, Paes JN, Kahn SJ, Wener MH, Van Voorhis WC. 1993.** Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg* **49**: 370-82.
- Chagas C. 1909.** Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**: 159-218.
- Channon JY, Kasper LH. 1996.** *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Infect Immun* **64**: 1181-9.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. 1994.** Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**: 1237-40.
- Chesnut RW, Grey HM. 1985.** Antigen presenting cells and mechanisms of antigen presentation. *Crit Rev Immunol* **5**: 263-316.
- Choromanski L, Kuhn RE. 1985.** Interleukin 2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* **50**: 354-7.
- Choromanski L, Kuhn RE. 1987.** Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* **55**: 403-8.
- Chouaib S, Chehimi J, Bani L, Genetet N, Tursz T, Gay F, Trinchieri G, Mami-Chouaib F. 1994.** Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12659-63.
- Croft M, Dubey C. 1997.** Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev Immunol* **17**: 89-118.
- Cunha-Neto E, Kalil J. 1995.** Autoimmunity in Chagas' heart disease. *Rev Paul Med* **113**: 757-66.
- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. 1995.** Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3541-5.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. 1996.** Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* **98**: 1709-12.
- DeFranco AL. 1987.** Molecular aspects of B-lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* **3**: 143-78.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. 2002.** The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**: 603-12.

- Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. 1992.** An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* **46**: 616-23.
- Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A. 2000.** Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* **12**: 623-30.
- Doherty PC, Zinkernagel RM. 1975.** H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* **141**: 502-7.
- dos Santos RR, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. 1992.** Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* **175**: 29-39.
- Dvorak JA, Howe CL. 1976.** The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells in vitro. *J Protozool* **23**: 534-7.
- Fernandez-Gomez R, Esteban S, Gomez-Corvera R, Zoulika K, Ouaisi A. 1998.** *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J Immunol* **160**: 3471-9.
- Ferreira MS, Nishioka Sde A, Rocha A, Silva AM, Ferreira RG, Olivier W, Tostes Junior S. 1991.** Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *Am J Trop Med Hyg* **45**: 723-7.
- Figueiredo JF, Martinez R, da Costa JC, Moyses Neto M, Suaid HJ, Ferraz AS. 1990.** Transmission of Chagas disease through renal transplantation: report of a case. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**: 61-2.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**: 2081-95.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. 1998.** The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **10**: 363-72.
- Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G, et al. 1993.** Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* **178**: 2185-92.
- Fresno M, Kopf M, Rivas L. 1997.** Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today* **18**: 56-8.
- Frosch S, Kraus S, Fleischer B. 1996.** *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **185**: 189-93.
- Frosch S, Kuntzlin D, Fleischer B. 1997.** Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. *Infect Immun* **65**: 971-7.
- Fruth U, Solioz N, Louis JA. 1993.** *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* **150**: 1857-64.
- Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. 1996.** Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* **98**: 70-7.
- Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR. 1990.** Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* **43**: 159-66.

- Gao GF, Tormo J, Gerth UC, Wyer JR, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JL, Jones EY, Jakobsen BK. 1997. Crystal structure of the complex between human CD8(alpha) and HLA- A2. *Nature* **387**: 630-4.
- Garba ML, Pilcher CD, Bingham AL, Eron J, Frelinger JA. 2002. HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J Immunol* **168**: 2247-54.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 1992. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* **22**: 2501-6.
- Gilliet M, Liu YJ. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **195**: 695-704.
- Girones N, Fresno M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol* **19**: 19-22.
- Girones N, Rodriguez CI, Carrasco-Marin E, Hernaez RF, de Rego JL, Fresno M. 2001. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest* **107**: 985-93.
- Goni O, Alcaide P, Fresno M. 2002. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* **14**: 1125-34.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and. *Anal Biochem* **126**: 131-8.
- Greenwald RJ, Oosterwegel MA, van der Woude D, Kubal A, Mandelbrot DA, Boussiotis VA, Sharpe AH. 2002. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol* **32**: 366-73.
- Grewal IS, Flavell RA. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **16**: 111-35.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737-42.
- Guevara AG, Guilvard E, Borges MM, Cordeiro da Silva A, Ouaissi A. 2000. N-Acetylcysteine and glutathione modulate the behaviour of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. *Immunol Lett* **71**: 79-83.
- Gurtler RE, Cecere MC, Petersen RM, Rubel DN, Schweigmann NJ. 1993. Chagas disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**: 12-5.
- Gurtler RE, Petersen RM, Cecere MC, Schweigmann NJ, Chuit R, Gualtieri JM, Wisnivesky-Colli C. 1994. Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of deltamethrin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 27-30.
- Gurtler RE, Segura EL, Cohen JE. 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis* **9**: 29-32.
- Hagar JM, Rahimtoola SH. 1991. Chagas' heart disease in the United States. *N Engl J Med* **325**: 763-8.
- Hansen DS, Villacres-Eriksson M, Akerblom L, Hellman U, Segura E, Carlomagno M, Morein B. 1998. An immunoaffinity-purified *Trypanosoma cruzi* antigen suppresses cellular proliferation through a TGF-beta-mediated mechanism. *Scand J Immunol* **47**: 509-16.

- Harding CV, Unanue ER. 1990.** Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell Regul* **1**: 499-509.
- Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. 1983.** Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3466-9.
- Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. 1985.** T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. *Eur J Immunol* **15**: 438-42.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. 2000.** CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* **18**: 275-308.
- Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. 1994.** Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* **180**: 631-40.
- Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. 1997.** Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **159**: 635-43.
- Herrera L, Urdaneta-Morales S. 1992.** *Didelphis marsupialis*: a primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* **86**: 607-12.
- Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. 1993.** Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**: 157-60.
- Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. 1997.** Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* **56**: 485-9.
- Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM. 1994.** Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* **179**: 1539-49.
- Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. 1994.** T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**: 17-27.
- Holscher C, Kohler G, Muller 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 synthase. *Infect Immun* **66**: 1208-15.
- Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A. 1995.** The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* **182**: 1579-84.
- Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. 1997.** IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **158**: 3311-6.
- James SL. 1995.** Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* **59**: 533-47.
- James SL, Kipnis TL, Sher A, Hoff R. 1982.** Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infect Immun* **35**: 588-93.
- Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE, Scripture-Adams DD, Giorgi JV, Marelli D, Koup RA, Zack JA. 1999.** Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**: 569-75.
- Janeway CA Jr. 1992.** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from non-infectious self. *Immunol Today* **13**: 11-6.

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002.** Immunologie, 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jardim E, Takayanagui OM. 1994.** Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *J Trop Med Hyg* **97**: 367-70.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. 1993.** Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* **48**: 348-57.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. 1994.** The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* **15**: 321-31.
- Junqueira Jr. LF, Beraldo PS, Chapadeiro E, Jesus PC. 1992.** Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas' disease. *Cardiovasc Res* **26**: 324-9.
- Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. 1981.** Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med* **153**: 1198-214.
- Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ, Scott JC. 1994.** Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *Eur J Immunol* **24**: 2850-4.
- Kierszenbaum F. 1981.** On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology* **44**: 641-8.
- Kierszenbaum F. 1982.** Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells. *J Immunol* **129**: 2202-5.
- Kierszenbaum F, Lopez HM, Szein MB. 1994.** Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by T. cruzi in the course of Chagas' disease. *Immunology* **81**: 462-7.
- Kierszenbaum F, de Diego JL, Fresno M, Szein MB. 1999.** Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **29**: 1684-91.
- Kierszenbaum F, Fresno M, Szein MB. 2002.** The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits. *Mol Biochem Parasitol* **125**: 91-101.
- Kirchhoff LV. 1993.** American trypanosomiasis (Chagas' disease)-a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* **329**: 639-44.
- Kirchhoff LV, Neva FA. 1985.** Chagas' disease in Latin American immigrants. *JAMA* **254**: 3058-60.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. 1996.** Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* **34**: 1171-5.
- 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 Eukaryot Microbiol* **45**: 548-55.
- Knecher LM, Rojkin LF, Capriotti GA, Lorenzo LE. 1994.** Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int J Parasitol* **24**: 207-11.
- Knobloch J. 1996.** Tropen- und Reisemedizin. Jena: Gustav Fischer Verlag.

- Kollien AH, Schaub GA. 2000.** The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* **16**: 381-7.
- Kruisbeek AM. 1999.** Introduction: regulation of T cell development by the thymic microenvironment. *Semin Immunol* **11**: 1-2.
- Krummel MF, Allison JP. 1996.** CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* **183**: 2533-40.
- Kumar S, Tarleton RL. 1998.** The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* **20**: 207-16.
- La Flamme AC, Kahn SJ, Rudensky AY, Van Voorhis WC. 1997.** *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Eur J Immunol* **27**: 3085-94.
- Lane JE, Olivares-Villagomez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. 1997.** Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* **56**: 588-95.
- Lang W, Löscher T. 2000.** Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Leavey JK, Tarleton RL. 2003.** Cutting Edge: Dysfunctional CD8(+) T Cells Reside in Nonlymphoid Tissues During Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* **170**: 2264-8.
- Lechler RI, Norcross MA, Germain RN. 1985.** Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function by using I-A-expressing L cells. *J Immunol* **135**: 2914-22.
- Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. 1986.** Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* **45**: 917-27.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996.** CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**: 233-58.
- Leon JS, Engman DM. 2001.** Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol* **31**: 555-61.
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. 1988.** Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med* **168**: 649-59.
- Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P. 1997.** Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* **65**: 457-65.
- Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. 1991.** Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* **173**: 721-30.
- Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE. 2000.** Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur J Immunol* **30**: 2669-78.
- Lopes MF, DosReis GA. 1994.** *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: blockade of costimulatory T-cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor-CD3 functioning. *Infect Immun* **62**: 1484-8.

- Lopes MF, DosReis GA. 1996.** Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: selective triggering of CD4⁺ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infect Immun* **64**: 1559-64.
- Lopez Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. 2001.** Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J* **15**: 2602-12.
- Lopez HM, Tanner MK, Kierszenbaum F, Szein MB. 1993.** Alterations induced by Trypanosoma cruzi in activated mouse lymphocytes. *Parasite Immunol* **15**: 273-80.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999.** An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**: 77-92.
- Lytton SD, Mozes E, Jaffe CL. 1993.** Effect of macrophage infection by Leishmania on the proliferation of an antigen-specific T-cell line, TPB1, to a non-parasite antigen. *Parasite Immunol* **15**: 489-92.
- MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. 2002.** CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* **185**: 720-7.
- Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. 1996.** IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**: 471-81.
- Maguire JH, Hoff R, Sherlock I, Guimaraes AC, Sleight AC, Ramos NB, Mott KE, Weller TH. 1987.** Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation* **75**: 1140-5.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. 1995.** Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* **377**: 535-8.
- Marovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. 2000.** IL-12p70 production by Leishmania major-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol* **164**: 5858-65.
- Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS. 1998.** Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Immunol Lett* **63**: 113-20.
- Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida NA, Pedrosa RC, Ferrari I, Hoebeke J, Campos de Carvalho AC. 1998.** Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens. *FASEB J* **12**: 1551-8.
- McCormick TS, Rowland EC. 1989.** Trypanosoma cruzi: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Exp Parasitol* **69**: 393-401.
- McGuirk P, Mills KH. 2002.** Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* **23**: 450-5.
- McGuirk P, McCann C, Mills KH. 2002.** Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates IL-10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. *J Exp Med* **195**: 221-31.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000.** Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338-44.

- Mehlhorn H, Piekarski G. 2002. Grundriß der Parasitenkunde, 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mehrotra PT, Donnelly RP, Wong S, Kanegane H, Geremew A, Mostowski HS, Furuke K, Siegel JP, Bloom ET. 1998. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* **160**: 2637-44.
- Meyer CG. 2001. Tropenmedizin-Infektionskrankheiten. Landsberg: ecomed verlagsgesellschaft AG & Co. KG.
- Meyer DJ, Muimo R, Thomas M, Coates D, Isaac RE. 1996. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem J* **313** (Pt 1): 223-7.
- Millar AE, Kahn SJ. 2000. Trypanosoma cruzi: the effect of nitric oxide synthesis inhibition on the CD4 T cell response to the trans-sialidase superfamily. *Exp Parasitol* **94**: 84-91.
- Ming M, Chuenkova M, Ortega-Barria E, Pereira ME. 1993. Mediation of Trypanosoma cruzi invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol* **59**: 243-52.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. 1989. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* **112**: 183-207.
- Miyahira Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Kamiyama T, Nara T, Nakajima-Shimada J, Aoki T. 1999. Induction of CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against Trypanosoma cruzi. *Int Immunol* **11**: 133-41.
- Mortara RA, da Silva S, Patricio FR, Higuchi ML, Lopes ER, Gabbai AA, Carnevale P, Rocha A, Ferreira MS, Souza MM, de Franco MF, Turcato G Jr, Ferraz Neto BH. 1999. Imaging Trypanosoma cruzi within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res* **85**: 800-8.
- Moser M, Murphy KM. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* **1**: 199-205.
- Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**: 138-46.
- Motran C, Gruppi A, Vullo CM, Pistoiresi-Palencia MC, Serra HM. 1996. Involvement of accessory cells in the Trypanosoma cruzi-induced inhibition of the polyclonal response of T lymphocytes. *Parasite Immunol* **18**: 43-8.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. 2002. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* **82**: 85-91.
- Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. 1992. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* **22**: 301-7.
- Murphy ML, Cotterell SE, Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. 1998. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, Leishmania donovani. *J Immunol* **161**: 4153-60.
- Nabors GS, Tarleton RL. 1991. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* **146**: 3591-8.

- Nickell SP, Keane M, So M. 1993. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4⁺ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. *Infect Immun* **61**: 3250-8.
- Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, Sekla L, Johnston JB. 1989. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med* **111**: 851-3.
- Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis GA. 1998. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol* **160**: 1313-9.
- Ouaissi A, Da Silva AC, Guevara AG, Borges M, Guilvard E. 2001. *Trypanosoma cruzi*-Induced Host Immune System Dysfunction: A Rationale for Parasite Immunosuppressive Factor(s) Encoding Gene Targeting. *J Biomed Biotechnol* **1**: 11-17.
- Ouaissi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* **168**: 6366-74.
- Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. 2000. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol* **94**: 571-9.
- Paul WE, Seder RA. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**: 241-51.
- Pedras-Vasconcelos JA, Chapdelaine Y, Dudani R, van Faassen H, Smith DK, Sad S. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice are more susceptible to staphylococcal enterotoxin B-mediated toxic shock than uninfected mice despite reduced in vitro splenocyte responses to superantigens. *Infect Immun* **70**: 4148-57.
- Pelletier M, Forget A, Bourassa D, Gros P, Skamene E. 1982. Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains. *J Immunol* **129**: 2179-85.
- Petray PB, Rottenberg ME, Bertot G, Corral RS, Diaz A, Orn A, Grinstein S. 1993. Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett* **35**: 77-80.
- Piekarski G. 1987. Medical Parasitology. Berlin: Springer-Verlag.
- Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* **193**: 90-8.
- Plata F, Wietzerbin J, Pons FG, Falcoff E, Eisen H. 1984. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Eur J Immunol* **14**: 930-5.
- Plata F, Garcia-Pons F, Wietzerbin J. 1987. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann Inst Pasteur Immunol* **138**: 397-415.
- Poljak RJ. 1991. Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol Immunol* **28**: 1341-5.
- Pontes-de-Carvalho L, Santana CC, Soares MB, Oliveira GG, Cunha-Neto E, Ribeiro-dos-Santos R. 2002. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J Autoimmun* **18**: 131-8.
- Prina E, Jouanne C, de Souza Lao S, Szabo A, Guillet JG, Antoine JC. 1993. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol* **151**: 2050-61.

- Rammensee HG. 1995.** Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**: 85-96.
- Reed SG. 1980.** Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. *Infect Immun* **28**: 404-10.
- Reed SG. 1988.** In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* **140**: 4342-7.
- Reed SG. 1998.** Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem Immunol* **70**: 124-43.
- Reed SG, Inverso JA, Roters SB. 1984.** Heterologous antibody responses in mice with chronic T. cruzi infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J Immunol* **133**: 1558-63.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. 1994.** IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **153**: 3135-40.
- Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. 2000.** Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today* **16**: 62-7.
- Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG. 1993a.** Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *J Immunol* **150**: 1611-8.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. 1993b.** Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* **48**: 637-44.
- Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. 1997.** An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL- 2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* **83**: 165-72.
- Ribeiro dos Santos R, Marquez JO, Von Gal Furtado CC, Ramos de Oliveira JC, Martins AR, Koberle F. 1979.** Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol* **30**: 19-23.
- Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. 1989.** Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **57**: 2640-4.
- Rocha A, de Meneses AC, da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, Almeida E, Turcato Junior G, Metze K, Lopes ER. 1994.** Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* **50**: 261-8.
- Rodrigues MM, Ribeirao M, Pereira-Chioccolla V, Renia L, Costa F. 1999.** Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun* **67**: 3855-63.
- Rodriguez A, Martinez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. 1999.** cAMP regulates Ca2+-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem* **274**: 16754-9.
- Rosenberg N, Kincade PW. 1994.** B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. *Curr Opin Immunol* **6**: 203-11.

- Ruiz Rde C, Rigoni VL, Gonzalez J, Yoshida N . 1993.** The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol* **15**: 121-5.
- Sagerstrom CG, Kerr EM, Allison JP, Davis MM. 1993.** Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8987-91.
- Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC. 1994.** Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on Mycobacterium-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur J Immunol* **24**: 2618-24.
- Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC. 1995.** Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* **25**: 2492-8.
- Sanderson CJ, Thomas JA, Twomey CE. 1980.** The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes. *Parasitology* **80**: 153-62.
- Sanford KK. 1948.** The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* **9**: 229-246.
- Sartori AM, Lopes MH, Caramelli B, Duarte MI, Pinto PL, Neto V, Amato Shikanai-Yasuda M. 1995.** Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* **21**: 1297-9.
- Schenkman RP, Vandekerckhove F, Schenkman S. 1993.** Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **61**: 898-902.
- Schmidt J, Kleffmann T, Schaub GA. 1998.** Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. *Parasitol Res* **84**: 527-36.
- Schofield CJ, Dias JC. 1999.** The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* **42**: 1-27.
- Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. 1991.** Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**: 621-4.
- Schwartz RH. 1990.** A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**: 1349-56.
- Sher A, Coffman RL. 1992.** Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* **10**: 385-409.
- Shevach EM. 2000.** Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* **18**: 423-49.
- Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, Norimine J, Brown WC. 2001.** DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun* **69**: 2162-71.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. 1992.** Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* **175**: 169-74.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2002.** Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **196**: 1017-24.

- Smith KA. 1980.** T-cell growth factor. *Immunol Rev* **51**: 337-57.
- Smith KA. 1984.** Interleukin 2. *Annu Rev Immunol* **2**: 319-33.
- Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. 2001.** Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol* **159**: 703-9.
- Sonnenfeld GF, Kierszenbaum F, Gould C, DeGee ALW, Mansfield J. 1987.** Interferons and protozoal infections. In: Baron S, ed. *The Interferon System*. Austin, TX: University of Texas Press, 355.
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA, Thompson CB. 1995.** CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med* **182**: 139-46.
- Squier MK, Cohen JJ. 1994.** Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* **6**: 447-52.
- Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, von Andrian UH. 1998.** Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* **8**: 373-81.
- 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. *Exp Parasitol* **81**: 564-73.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-51.
- Tanowitz HB, Minato N, Lalonde R, Wittner M. 1981.** Trypanosoma cruzi: correlation of resistance and susceptibility in infected bred mice with the in vivo primary antibody response to sheep red blood cells. *Exp Parasitol* **52**: 233-42.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. 1992.** Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* **5**: 400-19.
- Tarleton RL. 1988a.** Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol* **140**: 2769-73.
- Tarleton RL. 1988b.** Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* **73**: 186-90.
- Tarleton RL. 1990.** Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine- induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. *J Immunol* **144**: 717-24.
- Tarleton RL. 1991.** The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res Immunol* **142**: 130-3.
- Tarleton RL. 2001.** Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* **31**: 550-4.
- Tarleton RL, Kuhn RE. 1984.** Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin 2. *J Immunol* **133**: 1570-5.
- Tarleton RL, de Andrade PP, de Andrade CR. 1988.** Interleukin 2 production in patients with Chagas' disease: correlation with anti-parasite antibody responses. *Immunol Lett* **17**: 229-34.

- Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. 1997.** "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3932-7.
- Thurman EC, Walker J, Jayaraman S, Manjunath N, Ardman B, Green JM. 1998.** Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43. *Int Immunol* **10**: 691-701.
- Todeschini AR, Nunes MP, Pires RS, Lopes MF, Previato JO, Mendonca-Previato L, DosReis GA. 2002.** Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J Immunol* **168**: 5192-8.
- Tonegawa S. 1983.** Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-81.
- Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. 1991.** Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **146**: 3626-32.
- Trinchieri G. 1994.** Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* **84**: 4008-27.
- Tyler KM, Engman DM. 2001.** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* **31**: 472-81.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R. 1996.** PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* **348**: 891-2.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B. 1999.** *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* **67**: 4033-40.
- Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruysse V, Goldman M, Hosmalin A, Vray B. 2002.** *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* **14**: 1135-44.
- Van Voorhis WC, Eisen H. 1989.** Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med* **169**: 641-52.
- Velupillai P, Harn DA. 1994.** Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 18-22.
- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. 1994.** Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* **62**: 5177-82.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. 1994.** Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* **127**: 151-62.
- Waterhouse P, Marengere LE, Mittrucker HW, Mak TW. 1996.** CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* **153**: 183-207.
- Watson J, Mochizuki D. 1980.** Interleukin 2: a class of T cell growth factors. *Immunol Rev* **51**: 257-78.
- Weiss A, Littman DR. 1994.** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-74.

Weltgesundheitsbericht. 2002. World Health Report 2002.
<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>.

WHO. 2003a. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>.

WHO. 2003b. <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>.

WHO. 2003c. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>.

Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Williams RE, Hafler DA. 1996. IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. *J Immunol* **157**: 1127-31.

Wirth JJ, Kierszenbaum F, Sonnenfeld G, Zlotnik A. 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **49**: 61-6.

Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M. 1997. Involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide in the expression of non-specific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice induced by viable but not killed *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb Pathog* **22**: 79-88.