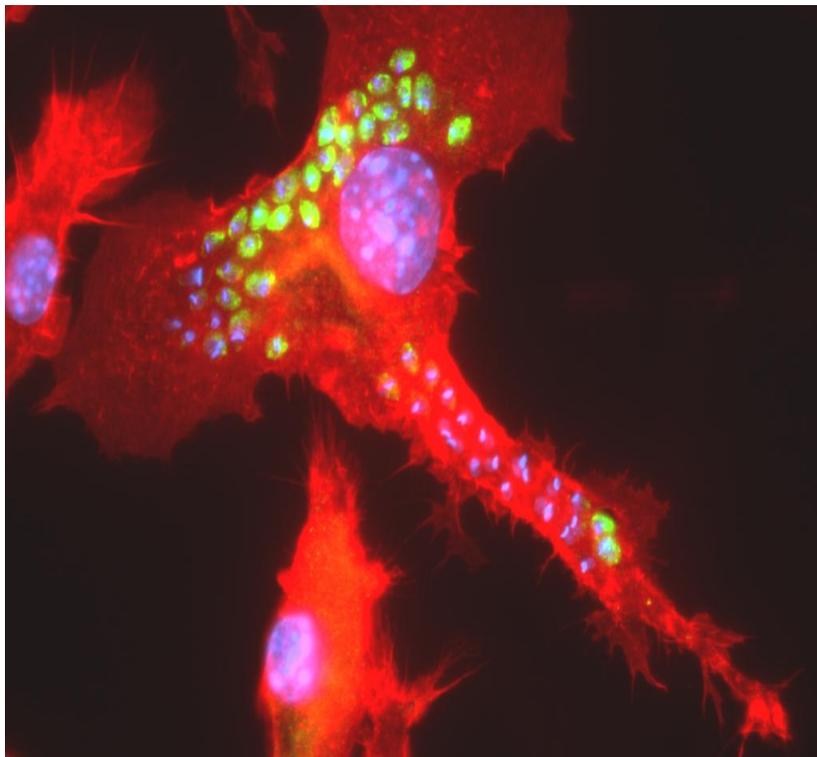




Charakterisierung der immunmodulatorischen Funktion von Siglec-E (Sialinsäure-bindendes-Ig-ähnliches-Lektin-E) im Modell der experimentellen Chagas-Krankheit



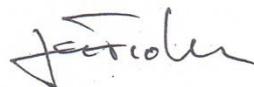
Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg
vorgelegt von

Anja Heins
aus Hamburg

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. T. JACOBS
Tag der Disputation: 07. Dezember 2012

Hamburg, den 22. November 2012

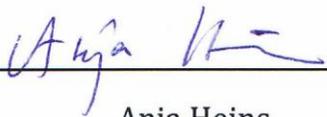


Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 01.10.2012


Anja Heins

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fleischer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin.

Frau Prof. Dr. Bruchhaus danke ich für die Bereitschaft diese Dissertation als Erstgutachterin zu lesen und zu bewerten.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Thomas Jacobs für die Bereitschaft diese Dissertation als Zweitgutachter zu lesen und zu bewerten. Zudem möchte ich mich für die Beantwortung jeglicher immunbiologischer Fragen und für das Vertrauen, dass ich weitestgehend selbstständig arbeiten konnte, bedanken.

Für die Finanzierung der Dissertation möchte ich mich bei der Vereinigung der Freunde des Tropeninstituts und beim DAAD für die finanzielle Unterstützung des Argentinien-Aufenthalts bedanken. Die Zeit in Buenos Aires im Labor von Vilma Duschak hat mir gezeigt was es heißt mit wenig finanziellen Mitteln aber mit viel Freude zu arbeiten. Ein besonderer Dank ist für Maxi bestimmt, der auch unser Labor in Hamburg mit südamerikanischer Energie aufgemischt hat. Luciana hingegen hat mir den Alltag im argentinischen Labor erleichtert und immer versucht mit spanischen und englischen Halbsätzen sowie mit Händen und Füßen mit mir zu kommunizieren.

Desweiteren bedanke ich mich bei Iris Gaworski und Christiane Steeg für den unermüdlichen Rat im Labor und die vielen netten Gespräche. Auch bei der gesamten Abteilung für Immunologie möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre, die gemeinsamen Ausflüge und den Spaß bei der Arbeit bedanken. Hierbei geht ein besonderes Dankeschön an Marthe, die mir bei den „gefährlichen“ S3 Arbeiten geholfen und meine Arbeit Korrektur gelesen hat. Aber auch Ina will ich aus tiefstem Herzen danken, nicht nur für die LEGO-Vektoren, sondern vor allem für so viel Menschlichkeit und seelische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, für die unentwegte Unterstützung während der Dissertation bedanken. Vielen Dank an die beste Korrekturleserin – irgendwann zahlt es sich aus eine Lehrerin zur Mutter zu haben!

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Amp	Ampicillin
APZ	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
ASM	<i>acid sphingomyelinase</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMDC	aus Knochenmark generierte dendritische Zelle (<i>bone marrow derived dendritic cell</i>)
BMDM	aus Knochenmark generierte Makrophagen (<i>bone marrow derived macrophages</i>)
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
B-Zellen	Lymphozyten-Zelle, benannt nach der Bursa Fabricii der Vögel
c	konstant (<i>constant</i>)
CBA	Zytometrische Bead Analyse (<i>Cytometric Bead Array</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
CHO	Chinesische-Hamster-Ovarzellen
CO ₂	Kohlendioxid
CPS	kapsuläres Polysaccharid (<i>capsular polysaccharide</i>)
CTL	Zytotoxische Killerzellen (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
Cy5	Cyanin-5
Cz	Cruzipain
DAP-12	DNA-assoziiertes Protein von 12 kDa (<i>DNAX-associated protein of 12 kDa</i>)
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DHR	Dihydrorhodamin 123

dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTU	<i>discrete typing units</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
Fc	Antikörperfragment (<i>crystallisable fragment</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1	Fluoreszenzlicht-1 (<i>fluorescence light-1</i>)
FSC	Vorwärtsscatter (<i>forward scatter</i>)
GBS	Gruppe B Streptokokken (<i>Group B streptococcus</i>)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Hg	Humanes Neuroblastom (<i>human glioblastoma</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOCL	Hypochlorige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase (<i>inducible NO-synthase</i>)
ITAM	Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren (<i>immunoreceptor tyrosine- based activation motif</i>)
ITIM	Tyrosininaktivierungssequenz von Immunrezeptoren (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark

L	Liter
Lamp-1	Lysosomen assoziiertes Membranprotein-1 (<i>Lysosome associated Membrane Protein-1</i>)
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
LEGO	Lentivirale Genontologie (<i>Lentiviral Gene Ontology</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M	molar
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein (<i>myelin-associated glycoprotein</i>)
Mal II	<i>Maackia amurensis</i> Lektin II
MASP	Mucin-assoziierte Oberflächenproteine
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histokompatibility complex</i>)
MOI	Viruspartikel pro Zelle (<i>Multiplicity of Infection</i>)
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NETs	Neutrophile extrazelluläre Netze (<i>neutrophil extracellular traps</i>)
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor, (<i>Nucleotide Oligomerization Domain-like receptor</i>)
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
OD	optische Dichte
PamCys	Pam3Cys-Ser-(Lys) ₄ , Hydrochlorid (C ₈₁ H ₁₅₆ N ₁₀ O ₁₃ S • 3 HCl)
PAMPs	Pathogen-assoziiertes-molekulares-Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
<i>pc</i>	Polyklonierung (<i>poly cloning</i>)
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMNs	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern-recognition receptor</i>)
Rag-1	Rekombination aktivierendes Gen-1 (<i>recombination activating gene-1</i>)
RBCs	rote Blutzellen (Erythrozyten, <i>red blood cells</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
SHP	SH2-Domäne enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase)
Sias	Sialinsäure (<i>sialic acid</i>)
Siglec	Sialinsäure-bindendes-Immunglobulin-ähnliches-Lektin (<i>sialic acid-binding-Ig-like-lectin</i>)
Sn	Sialoadhesin
SSC	Seitwärtsscatter (<i>side scatter</i>)
Syk	Milz-Tyrosinkinase (<i>Spleen tyrosine kinase</i>)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming growth factor</i>)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Drosophila</i> -Toll-Protein homologer Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor (<i>Tumor-necrosis-factor</i>)
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TRITC	Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanat
TS	<i>Trans</i> -Sialidase
T-Zelle	im Thymus generierte Lymphozyten-Zelle
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UV	ultraviolett
V	variabel
VERO	Verda Reno (<i>green kidney</i>)

Y

Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2	Zellen des angeborenen Immunsystems	2
1.2	Siglecs: Lektin-Rezeptoren, die Sialinsäuren erkennen	6
1.2.2	Inhibitorische Signalmotive charakterisieren die meisten Siglecs	8
1.2.3	Die Liganden für Siglecs sind Sialinsäuren (Sias)	9
1.2.4	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Bindungen der Siglecs	11
1.2.5	Die Funktion der Siglecs auf Immunzellen	12
1.2.6	Siglec-E wird auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert.....	13
1.2.7	Pathogene binden an Siglecs und modulieren die Immunantwort.....	15
1.3	Trypanosoma cruzi ist der Erreger der Chagas-Krankheit.....	16
1.3.1	Die Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomiasis).....	16
1.3.2	Der Lebenszyklus von <i>T. cruzi</i> gliedert sich in vier Entwicklungsstadien	18
1.3.3	Die Zellinvasion von <i>T. cruzi</i> findet über den Wundheilungsprozess statt	20
1.3.4	Die <i>T. cruzi</i> <i>Trans</i> -Sialidase (TS) ist ein einmaliges Enzym	22
1.3.5	<i>T. cruzi</i> kann sechs verschiedenen Klassen zugeordnet werden	23
1.3.6	Die Immunantwort gegen <i>T. cruzi</i>	25
1.4	Ziel der Arbeit	26
2	MATERIAL.....	27
2.1	Laborgeräte.....	27
2.2	Chemikalien	29
2.3	Material für molekularbiologische Arbeiten	29
2.4	Material für biochemische Arbeiten	30
2.5	Material für zellbiologische Arbeiten.....	30

3	METHODEN.....	34
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
3.1.2	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	34
3.1.3	Stabile Transduktion von CHO Zellen mit einem LEGO-Vektor für Siglec-E.....	34
3.2	Biochemische Methoden	35
3.2.1	Aufreinigung von Siglec-E-Ig.....	35
3.2.2	Messung der extrazellulären DNA NETs im Kulturüberstand	35
3.2.3	Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA).....	35
3.2.4	NO-Bestimmung aus BMDM Zellkulturüberständen (Griess-Assay)	36
3.3	Zellbiologische Methoden.....	36
3.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	36
3.3.2	Zellzählung.....	36
3.3.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	37
3.3.4	Kultur von Zelllinien	37
3.3.5	Überexpression von Siglec-E-Ig in CHO Zellen.....	37
3.3.6	Generierung von DCs und Makrophagen aus dem Knochenmark (KM).....	37
3.3.7	Präparation der Milz.....	38
3.3.8	Durchflusszytometrie.....	38
3.3.9	Immunfluoreszenzmikroskopie	39
3.3.10	Präparation und Aufreinigung von PMNs (aus Blut, Milz oder KM).....	40
3.3.11	Mikroskopische Analyse der NET-Produktion von PMNs.....	40
3.3.12	Messung der ROS Produktion	41
3.3.13	<i>T. cruzi</i> Tulahuen Infektion von CHO und CHO-Siglec-E Zellen.....	42
3.3.14	Auszählung der Parasitenanzahl der <i>in vitro</i> Infektionsexperimente	42
3.3.15	Darstellung der Lysosomenrekrutierung in einer <i>T. cruzi</i> Brazil Infektion.....	42
3.4	Parasiten und Infektionsmodell.....	43
3.4.1	<i>T. cruzi</i> Stammerhaltung.....	43
3.4.2	<i>T. cruzi</i> Zellkultur	43
3.4.3	Laktose-Behandlung von <i>T. cruzi</i>	43
3.4.4	Parasitämiebestimmung.....	43
3.4.5	Gr-1 Depletion in der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	44
3.4.6	Vergleich der <i>T. cruzi</i> Infektion von Wildtyp und MPO-defizienten Mäusen	44
3.4.7	Infektion mit <i>T. cruzi</i> Tulahuen aus der Zellkultur (Hg 39 und BMDC)	44
3.5	Statistische Analysen.....	44

4	ERGEBNISSE	45
4.1	Die Sialylierung von Trypanosomen ist sehr variabel	45
4.1.1	Das Lektin Mal II bindet an <i>T. cruzi</i> aus murinem Blut	45
4.1.2	<i>T. cruzi</i> ist nach BMDC Kultur transient sialyliert.....	47
4.1.3	Schwach sialylierte Kultur-Trypanosomen sind hoch infektiös	49
4.1.4	Kultur-Trypanosomen im argentinischen Labor binden an Siglec-E-Ig.....	51
4.1.5	Die Siglec-E Expression von Zellen hat keinen Einfluss auf die Infektionsrate	53
4.2	Siglec-E wird auf Neutrophilen (PMNs) hoch exprimiert	55
4.2.1	PMNs produzieren nach Stimulation DNA NETs.....	56
4.2.2	Trypanosomen sind mit den NETs assoziiert.....	58
4.2.3	Einfluss von anti-Siglec-E auf die NET-Produktion.....	58
4.2.4	Anti-Siglec-E hat keinen Einfluss auf ROS Produktion von PMNs	60
4.2.5	Die Depletion von PMNs hat keinen Einfluss auf die Parasitämie im Verlauf einer <i>T. cruzi</i> Infektion.....	62
4.2.6	Die Funktion der MPO ist irrelevant für den Verlauf der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	63
4.3	Einfluss von anti-Siglec-E auf <i>T. cruzi</i> infizierte Zellen	64
4.3.1	Funktionsnachweis des anti-Siglec-E Antikörpers	64
4.3.2	BMDCs und BMDMs exprimieren Siglec-E.....	66
4.3.3	BMDC und BMDM <i>in vitro</i> Infektion unter dem Einfluss von anti-Siglec-E.....	67
4.3.4	Anti-Siglec-E führt zu einer signifikanten Reduktion inflammatorischer Zytokine	77
4.3.5	Anti-Siglec-E hat keinen Einfluss auf die Lysosomen-Rekrutierung.....	82
5	DISKUSSION.....	85
5.1	Sialylierung von <i>T. cruzi</i>.....	86
5.2	Siglec-E auf Neutrophilen Granulozyten (PMNs).....	90
5.3	Siglec-E auf Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs)	93
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
7	ABSTRACT.....	100
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	102

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Mikroorganismen können Infektionskrankheiten verursachen, die durch das Immunsystem bekämpft werden. Gegen die jeweiligen Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten, hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes Abwehrsystem entwickelt. Dies besteht aus verschiedenen Immunzellen und löslichen Proteinen, die zur Abwehr gegen pathogene Erreger zusammenspielen, um diese zu eliminieren, die Verbreitung der Pathogene und somit die Ausbreitung einer Erkrankung zu verhindern. Das Immunsystem der Vertebraten lässt sich in zwei Abwehrsysteme einteilen: die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Eine klare Trennung dieser beiden Systeme ist jedoch nicht möglich, da die Zellen miteinander wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen, um eine optimale Abwehr gegen die jeweiligen Pathogene zu generieren. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Funktion der Zellen des angeborenen Immunsystems.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch älteste Teil der Immunabwehr und ist schon in primitiven Organismen (sowie Pflanzen, Pilzen und Insekten) vorzufinden. Zu Beginn einer Infektion setzt sich das angeborene Immunsystem als erstes mit dem Pathogen auseinander. Die primäre Abwehr setzt sich aus chemischen, mechanischen und biologischen Funktionen an den Oberflächenepithelien (Haut, Schleimhäute, respiratorische Organe) zusammen. Dies sind die Kontaktzonen, welche durch eine dicht verknüpfte Epithelschicht verhindern, dass das Pathogen in den Körper eindringt. Zusätzlich kommen Abwehrfunktionen wie ein niedriger pH-Wert, antimikrobielle Substanzen und eine Besiedlung mit kommensalen Bakterien, die eine Konkurrenz zu den Pathogenen darstellen, hinzu.

Wird diese erste Barriere dennoch von einem Pathogen überwunden, greifen die Zellen und humoralen Komponenten (Zytokine und Komplementfaktoren) des angeborenen Immunsystems ein. Zu diesen gehören hauptsächlich phagozytierende Zellen, welche über Erkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition receptors*, PRRs) konservierte Strukturen der Erreger (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen. Nach Aktivierung der Phagozyten über PRRs werden verschiedene inflammatorische

Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 und IL-6), sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies zur direkten Pathogenabwehr freigesetzt. Die am Entzündungsherd produzierten Zytokine und Chemokine führen zur erhöhten Durchlässigkeit des Endothels und zur Rekrutierung weiterer Zellen der angeborenen Immunabwehr.

Zu den zellulären Bestandteilen gehören die neutrophilen, basophilen sowie eosinophilen Granulozyten, natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs). Diese Zellen können nach Aktivierung durch Phagozytose opsonierte Pathogene aufnehmen und intrazellulär abtöten. NK-Zellen erkennen infizierte Zellen durch das Fehlen von MHC I, können diese direkt abtöten und somit zur Abwehr intrazellulärer Pathogene beitragen. Dendritische Zellen können die aufgenommenen Erreger prozessieren und deren Antigene auf MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) auf der Zelloberfläche präsentieren. Daher werden DCs auch als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Sie können in die nächstgelegenen Lymphorgane einwandern und die an MHC-Komplexe gebundenen Antigene dort vorzufindenden T-Zellen präsentieren. Die Aktivierung der T-Zellen führt zum Auslösen einer spezifischen adaptiven Immunantwort. Hierbei spielt die Aktivierung von B-Zellen und die Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern eine wichtige Rolle [1].

1.1.2 Zellen des angeborenen Immunsystems

1.1.2.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) gehören zu der Zellpopulation, die als erstes am Infektionsort vorzufinden ist. Charakteristisch sind die zahlreichen Granula (Sekretionsvesikel) und der stark segmentierte Zellkern; wodurch PMNs mikroskopisch gut zu erkennen und von anderen Granulozyten sowie Lymphozyten oder Monozyten zu unterscheiden sind. Im humanen System nehmen sie mit 65-75% aller peripheren Blutleukozyten einen großen Anteil ein. Da PMNs sehr kurzlebige Zellen sind (1-4 Tage, nach Aktivierung nur einige Stunden), werden sie bei einer Infektion oder Entzündung schnell aus dem Knochenmark generiert und über Chemokingradienten zum Infektionsherd rekrutiert.

Ihre Hauptaufgabe besteht in der Eliminierung von Pathogenen. Einerseits können PMNs durch Phagozytose Pathogene aufnehmen und intrazellulär durch das Verschmelzen von Phagosomen mit Lysosomen abbauen, andererseits können sie durch die Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS = *reactive oxygen*

species) Erreger abtöten. Die Produktion von ROS wird auch als *oxidativer Burst* bezeichnet, da die toxischen Oxidantien unter dem Verbrauch von Sauerstoff durch die NADPH-Oxidase generiert werden. Bei der Umsetzung von Sauerstoff entsteht durch Reduktion das Superoxidradikal-Anion ($O_2^{\cdot-}$). Aus diesem Sauerstoffradikal gehen weitere ROS hervor, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Ein weiteres für PMNs spezifisches Enzym ist die Myeloperoxidase (MPO), welche H_2O_2 zur Generierung von hypochloriger Säure (HOCl) nutzt [2, 3]. Desweiteren können Stickstoffradikale durch die Xanthin-Oxidase und die NO-Synthase produziert werden. All diese ROS können durch ihre zytotoxische Wirkung zur Bekämpfung von Pathogenen beitragen. Da die Freisetzung der Sauerstoff- und Stickradikale ungerichtet in der Entzündungsregion erfolgt, können auch körpereigene Zellen und Gewebe durch den oxidativen Burst der PMNs beschädigt werden [4].

Zu weiteren nicht oxidativen Abwehrmechanismen der PMNs gehören mikrobizide Peptide und Proteasen (Gelatinase, Elastase und Cathepsin G). Die jeweiligen Proteine werden in unterschiedlichen Granula (z.B. azurophilen Granula) gespeichert [5].

Erst vor einigen Jahren wurde bestätigt, dass PMNs zu einer weiteren Abwehrfunktion befähigt sind; die Ausbildung von extrazellulären DNA Netzen (NETs, *neutrophil extracellular Traps*) mit denen extrazelluläre Pathogene eingefangen werden können. Die sogenannten NETs bestehen hauptsächlich aus DNA und weiteren Bestandteilen, die intrazellulär in PMNs zu finden sind. So wurde von Brinkmann et al. beschrieben, dass die neutrophile Elastase, Cathepsin G und auch die Myeloperoxidase (MPO) an die NETs assoziiert vorliegen. Auch Lactoferrin und Gelatinase wurden in den NET Strukturen indentifiziert. Zytoplasmatische Proteine, wie Aktin oder Tubulin, konnten dagegen nicht in den NETs gefunden werden. Zudem konnten Histone (H1, H2A, H2B, H3 und H4) sowie ein Histonkomplex aus H2A-H2B in den NETs mit spezifischen Antikörpern angefärbt werden. Es wurde gezeigt, dass NETs durch DNase abgebaut werden können; dahingegen sind sie Proteasen gegenüber unempfindlich [6].

Die Aktivierung zur NET Bildung kann mit verschiedenen Agentien erfolgen. TLR-Agonisten (LPS), das Interleukin IL-8 oder auch PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) eignen sich zur Stimulation. Je nach Stärke des Stimulus kann die NET Bildung nach einigen Minuten oder auch Stunden ausgelöst werden. Das Opsonieren von verschiedenen gram-positiven, als auch gram-negativen Bakterien, sowie Pilzen durch NETs, konnte bereits beschrieben werden [6].

1.1.2.2 Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs)

Gewebsmakrophagen, Dendritische Zellen (DCs) und Osteoklasten haben alle gemeinsame Vorläuferzellen: zirkulierende Monozyten. Die Monozyten entstehen wiederum aus einer myeloiden Vorläuferzelle des Knochenmarks, aus der sich auch andere Zellen, wie z.B. PMNs, bilden können. Diese Zellen wandern in unterschiedlichen Reifungsstadien in das periphere Blut, wo sie einige Tage zirkulieren, um anschließend in den verschiedenen Geweben zu spezialisierten Zellen auszdifferenzieren [7]. Bei einer Entzündung oder Infektion werden unreife Monozyten über die lokal ausgeschütteten Zytokine und Chemokine an Hand eines Gradienten zusätzlich rekrutiert und differenzieren im Gewebe zu Makrophagen oder DCs aus [8, 9].

Makrophagen

Phagozytose und das Abtöten von Pathogenen sind die Hauptaufgaben von Makrophagen. Nicht nur Pathogene, sondern auch infizierte und tote körpereigene Zellen, sowie abgestorbene PMNs, werden von Makrophagen phagozytiert und somit steril ohne Entzündungserscheinung beseitigt [10].

Die Präsenz von Erregern in Geweben führt zur Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems. Diese Komplement-Faktoren opsonieren die Pathogene, was zu einer verbesserten Phagozytose durch Makrophagen führt [11].

Die Erkennung von PAMPs über PRRs, wozu der Mannoserezeptor, NLRs (*NOD-like receptors*) und auch TLRs (*Toll-like receptors*) gehören, löst die Aktivierung der Makrophagen aus. Dies führt zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- α und zur rezeptorvermittelten Phagozytose. Weitere Monozyten werden über einen Chemokingradienten zum Infektionsort rekrutiert.

Das Abtöten der phagozytierten Erreger erfolgt durch die Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen. Diese enthalten mikrobizide Proteine (Proteasen, Kollagenase, DNasen und Lipasen), sowie oben beschriebene ROS zum Abbau der aufgenommenen Pathogene. Ein weiteres wichtiges Enzym der Makrophagen ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche durch Bildung von Stickradikalen auch zum Abtöten von Pathogenen beiträgt [12].

Desweiteren können aufgenommene Peptid-Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert werden, um T-Zellen zu aktivieren. Wird von den Makrophagen das inflammatorische Zytokin IL-12 gebildet, wirkt sich dies auf die Differenzierung von T-Zellen zu

Th-1-Zellen aus. Als positiven Rückkopplungsmechanismus können Th-1-Zellen, aber auch NK-Zellen, das Zytokin IFN- γ produzieren, welches wiederum zu einer verbesserten Phagozytose und einem schnelleren Abtöten der Pathogene durch Makrophagen führt [13]. Andererseits führt ein Ausschütten von IL-4 und IL-13 von sogenannten Th-2-Zellen zur Ausbildung von alternativ aktivierten Makrophagen. Diese exprimieren Kollagenasen und weitere Enzyme, die an der Regeneration des Gewebes und an anti-inflammatorischen Prozessen beteiligt sind [14]. Diese Wechselwirkungen zwischen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zeigen wiederum, dass eine klare Trennung der Zugehörigkeit nicht möglich ist, da sie sich gegenseitig beeinflussen.

Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die bereits 1973 von Steinmann et al. beschrieben und charakterisiert wurden [15]. Sie dienen hauptsächlich der Aktivierung von T-Zellen und stellen eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. DCs sind Zellen, die einer sehr heterogenen und hochspezialisierten Zellpopulation angehören. Man unterscheidet myeloide (konventionelle) DCs von plasmazytoiden DCs (pDCs), welche aus lymphoiden oder myeloiden Vorläuferzellen entstehen können [16]. Die Hauptaufgabe der pDCs ist die Produktion von Typ-I Interferonen, welche zur Abwehr von viralen Pathogenen und zur Aktivierung von NK-Zellen wichtig sind [17, 18]. Konventionelle DCs hingegen werden je nach Gewebe unterschiedlich bezeichnet. So findet man in dem Epithel der Haut Langerhanszellen, welche als unreife Zellen ins Epithel migrieren und hier früh mit eindringenden Pathogenen in Kontakt kommen. Bei Aufnahme und Erkennung von Pathogenen über PRRs werden die DCs aktiviert und regulieren Rezeptoren hoch, die sie in die nächstgelegenen Lymphorgane leiten. Hier können sie durch die Freisetzung von IL-12 die Differenzierung von T-Zellen zu Th-1-Zellen fördern. Zusätzlich findet die Aktivierung der T-Zellen über das auf MHC präsentierte Antigen, sowie weitere kostimulatorische Moleküle (z.B. CD40, B7) statt. DCs sind auch in der Lage die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β zu produzieren. Dieses Zytokinmilieu führt entweder zur Anergie der T-Zellen oder zu der Induktion von regulatorischen T-Zellen [19, 20].

1.2 Siglecs: Lektin-Rezeptoren, die Sialinsäuren erkennen

Siglecs (*Sialic acid-binding-Ig-like-lectins*) sind Sialinsäure-bindende Lektine, die der Ig-Superfamilie angehören und hauptsächlich auf Immunzellen exprimiert werden. Auf Grund ihrer Struktur werden sie der Gruppe der Typ-I-Transmembranproteine zugeordnet. Charakteristisch ist der extrazelluläre aminoternale Teil, welcher aus einer V-artigen Ig-Domäne und ein bis sechzehn C2-artigen Domänen besteht. Die V-artige Domäne besitzt einen erforderlichen Argenin-Rest, sowie zwei weitere aromatische Aminosäuren, welche für die Sialinsäure-Bindung verantwortlich sind. Über einen kurzen Transmembranteil ist die extrazelluläre Domäne mit dem zytosolischen Carboxyterminus verbunden. Dieser intrazelluläre Teil besitzt bei den meisten Siglecs ein oder mehrere inhibitorische Tyrosin-Signalmotive [21].

Siglecs lassen sich grundsätzlich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Die evolutionär konservierten Siglecs, Sialoadhesin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), MAG (myelin-associated glycoprotein, Siglec-4) und Siglec-15 lassen sich mit einer geringen Sequenzidentität von nur 25-30%, aber einer hoch konservierten Struktur, zu einer Gruppe zusammenfassen. Direkte Orthologe lassen sich in den verschiedenen Vertebraten wiederfinden. Die zweite Gruppe der Siglecs setzt sich aus CD33 (Siglec-3) und den CD33-verwandten Siglecs zusammen. Im humanen System setzen sich diese Siglecs aus Siglec-3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 und -16 zusammen; im murinen System gehören Siglec-E, -F, -G und -H den CD33-ähnlichen Siglecs an. Die CD33-verwandten Siglecs charakterisiert eine hohe Sequenzidentität der extrazellulären Domäne von 50-85%. Es wird vermutet, dass im Laufe der Evolution der Säugetiere schätzungsweise vor 180 Millionen Jahren durch Genduplikation, -umlagerung und -konversion der Siglec-Cluster, die einzelnen Siglecs entstanden sind. Diese These wird durch das Vorhandensein vieler nicht-funktionaler Siglec-Pseudogene, sowie die Gen-Anordnung in entgegengesetzter Orientierung, unterstützt [22]. Zusätzlich geht man von einer Expansion des Genclusters bei Primaten und einer Deletion verschiedener Siglec-Gene bei Nagetieren aus. [23]. Diese schnelle konvergente Evolution der Siglec-Gene erklärt, dass man in verschiedenen Säugetierspezies keine direkten Orthologe, sondern Paraloge der CD33-verwandten Siglecs findet.

1.2.1 Die Expression von Siglecs auf Zellen des Immunsystems

Mit Ausnahme von Siglec-4 und Siglec-6, welche auf Gliazellen bzw. auf Trophoblasten exprimiert werden, sind Siglecs auf Zellen des Immunsystems vorzufinden. Einige Siglecs werden auf mehreren Immunzellen exprimiert, allerdings ist das Expressionsprofil der einzelnen Zelltypen hoch spezifisch. So wird Siglec-2 nur auf B-Zellen, dahingegen z.B. Siglec-9 auf verschiedenen Immunzellen (Makrophagen, DCs etc.) exprimiert [24]. Im Allgemeinen fällt auf, dass Siglecs vorwiegend auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden [25]. Eine schematische Darstellung der Expression von Siglecs auf Immunzellen ist in Abb. 1 dargestellt.

	Maus		Mensch
Eosinophile	Siglec-F		Siglec-8, Siglec-10 (wenig)
Mastzellen	Siglec-F		CD33, Siglec-5, -6, 8, -10 (wenig)
Basophile	Siglec-F (wenig)		CD33, Siglec-3, -5, -6, -8
Neutrophile	CD33, Siglec-E		Siglec-5, -9, -14
Monozyten	Siglec-E		CD33, Siglec-5, -7, -9, -10, -11, -14
Makrophagen	Siglec-E, -F		CD33, Siglec-5, -11, -15, -16
DCs	Siglec-E, Siglec-G pDCs (Siglec-H)		CD33, Siglec-7, -9, -10, -15 pDCs (Siglec-5, -14)
Mikroglia	Siglec-F		Siglec-11 (-16?)
T-Zellen	Siglec-F (aktivierte T-Zellen)		Siglec-7, -9
NK-Zellen	Siglec-E		Siglec-7, -9, -10
B-Zellen	Siglec-G		Siglec-5, -6, -10

Abb. 1: Darstellung der murinen und humanen Siglec-Expression auf Immunzellen

Die Expression von Siglecs auf den unterschiedlichen Zelltypen ist schematisch dargestellt. Hierbei ist vergleichend die Expression der murinen und der humanen Siglecs gezeigt. Die Darstellung zeigt, dass einige Siglecs von mehreren Immunzellen exprimiert werden, andere sind dahingegen exklusiv auf bestimmten Zelltypen zu finden. Modifiziert nach Crocker et al. 2012 [26].

1.2.2 Inhibitorische Signalmotive charakterisieren die meisten Siglecs

Siglecs lassen sich nach neusten Erkenntnissen in drei Untergruppen aufteilen. Zur ersten Gruppe gehören Siglec-1 (Sialoadhesin) und Siglec-4 (MAG). Diese Siglecs besitzen kein inhibitorisches Signalmotiv (bzw. im Fall von MAG nur ein ITIM-ähnliches Motiv) in der intrazellulären Domäne, zudem ist der Transmembranteil durch neutrale Aminosäuren charakterisiert. Diesen Siglecs wird eine primäre Rolle bei der Zelladhäsion zugeordnet. Der zweiten und größten Gruppe werden die Siglecs zugeordnet, die ein charakteristisches ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) und in einigen Fällen zusätzlich ein ITIM-ähnliches Motiv besitzen. Das ITIM Motiv mit der Konsensussequenz (I/V/L/SxYxxL/V) und das ITIM-ähnliche Motiv (D/ExYxEV/IK/R) enthalten die zur Signalweiterleitung essentiellen Tyrosin-Reste (Y). Das am besten beschriebene Siglec dieser inhibitorischen Kategorie ist CD22 (Siglec-2); zudem gehören die humanen Siglecs-2, -3 und 5-12, sowie die murinen Siglecs-E, -F und -G der ITIM-besitzenden Gruppe an [27-33].

Eine Ligation der Siglec-Bindungsstelle führt zu einer Konformationsänderung und in Folge dazu, dass die Tyrosin-Reste der ITIMs für Kinasen der Src-Familie (z.B. Lyn) zugänglich sind. Nach Phosphorylierung der Tyrosin-Reste können Phosphatasen wie SHP-1 oder SHP-2 rekrutiert werden. Diese Rekrutierung von Phosphatasen kann zu einer Inhibierung von Aktivierungssignalen der Zelle führen [34-43]. Zum anderen können ITIMs mit der μ -Untereinheit des AP2-Komplexes interagieren, welcher bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielt [44]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Antikörperkomplexierung von Siglecs (z.B. Siglec-2, -3 und -5) eine gesteuerte Endozytose induziert werden kann [45, 46].

Der dritten Gruppe lassen sich Siglecs zuordnen, die positiv geladene Aminosäuren in der transmembranen Region besitzen. Diese Siglecs können mit dem Homodimer DAP-12 (*DNAX-associated protein of 12 kDa*), welches ein aktivierendes ITAM-Motif besitzt, assoziieren. Zu den humanen Siglecs dieser Gruppe gehören Siglec-14, -15 und -16; zu den murinen Siglecs gehören Siglec-15 und Siglec-H [22, 47, 48]. Die Assoziation mit dem Adapterprotein DAP-12 kann zur Rekrutierung von Syk-Kinasen und zur Aktivierung von Zellen führen. Dennoch ist die Rekrutierung von DAP-12 an Siglec-H, welches nur von plasmazytoiden DCs exprimiert wird, mit der Inhibierung von Typ-I Interferonen assoziiert. Obwohl Siglec-H mit dem aktivierenden ITAM-enthaltenden Adaptorprotein interagiert, geht eine inhibitorische Wirkung von der Ligation von Siglec-H mit einem Antikörper aus [47].

Die humanen Siglecs (Siglec-14 und -16) sind möglicherweise die aktivierenden Gegenspieler der inhibitorischen Siglecs (Siglec-5 und -11). Die Bindungsstellen scheinen sehr ähnlich zu sein, da eine Kreuzreaktivität von spezifischen Antikörpern beobachtet werden konnte [22, 23, 49, 50].

1.2.3 Die Liganden für Siglecs sind Sialinsäuren (Sias)

Sialinsäuren (Sias) sind N- und O-Derivate der Neuraminsäure, welche aus neun C-Atomen zusammengesetzt sind. Sias bilden häufig den terminalen Zucker auf Glykokonjugaten, welche in großer Anzahl auf Zellmembranen exprimiert werden. Die terminalen Sias der Glykoproteine und -sphingolipide sowie der Mucine tragen zur negativen Ladung der Zellmembran bei [51]. Über das C2-Atom des endständigen Zuckers ist die Sialinsäure verknüpft; bei Glukose oder Galaktose kann die Bindung über das C3- und das C6-Atom erfolgen. Desweiteren bietet das C8-Atom einer anderen Sialinsäure eine Verknüpfungsstelle. Die häufigsten Sias der Säugetiere sind *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Auf Grund einer Punktmutation im Gen der CMP-*N*-Acetylneuraminsäurehydroxylase, dem Enzym, das aus CMP-Neu5Ac CMP-Neu5Gc synthetisiert, bildet das humane System eine Ausnahme und kann die bei Säugetieren sonst verbreitete Sialinsäure Neu5Gc nicht exprimieren. Somit wird auf humanen Zellen Neu5Ac häufig exprimiert [51, 52].

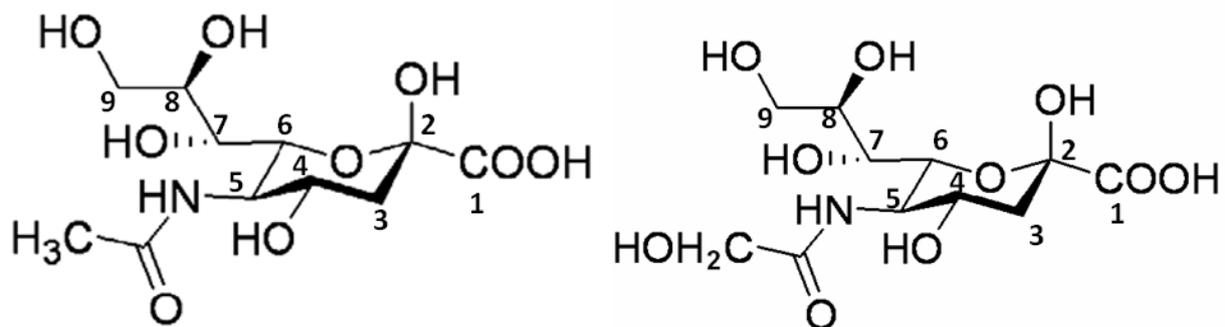


Abb. 2: Schematische Strukturen der *N*-Acetylneuraminsäure und der *N*-Glycolylneuraminsäure. Darstellung der bei Säugetieren am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren. Die Nummerierung der C-Atome zeigt an, an welchen Positionen die Verknüpfung zu anderen Zuckern erfolgen kann. C2-Atom: Verknüpfung zu C3 oder C6 von preterminalen Zuckern (α -2,3- oder α -2,6-Verknüpfung). An Position C4, -7, -8, und -9 können die Hydroxylgruppen durch Acetylierung, Sulfidierung, Methylierung oder Phosphorylierung modifiziert werden [53].

Die verschiedenen Sias werden von Siglecs mit einer spezifischen Bindungsaffinität erkannt und ligiert. Dabei fällt auf, dass einige Siglecs ein breites Sialinsäure-Spektrum haben, dahingegen andere nur hoch spezifisch an bestimmte Sias binden. Auch die Verknüpfung der Sias zu den darauffolgenden Zuckern hat einen Einfluss auf die

Bindungsaffinität zu den entsprechenden Siglecs [54]. Die Bindungsaffinität wird durch den Sialinsäuretyp, die Verknüpfungsposition und die Art des sich anschließenden Zuckers bestimmt. Die Bindung zwischen Siglec und Sias erfolgt durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem konservierten Arginin-Restes in der V-Domäne des Siglecs und der Carboxylgruppe der Sialinsäure. Durch eine Punktmutation dieser zur Bindung benötigten Aminosäure kommt es zum Verlust der Siglec-Sias-Interaktion [40]. Trotz der hohen Bindungsspezifität von Siglecs, ist die Bindung zwischen Siglecs und Sias eine niederaffine Interaktion. Es handelt sich um eine Lektinbindung, welche viel schwächer als eine Protein-Protein-Wechselwirkung einzuordnen ist [54].

Tabelle 1: Darstellung der humanen und murinen Siglecs und ihrer Bindungsspezifität

Die jeweiligen Siglecs (human/murin) und ihre bevorzugte Bindung an verschieden verknüpfte Sialinsäuren sind aufgeführt. *Bei Siglec-12 handelt es sich um ein humanes Pseudogen. Die Bindungsstelle enthält am kritischen Arginin-Rest eine Mutation zu Cystein, was eine Sialinsäure-Bindung verhindert. Primaten exprimieren ein ähnliches funktionsfähiges Siglec [28, 55].

Siglecs (human / murin)	Alternativbezeichnung	Bindungsspezifität (Sialinsäureverknüpfung)
Siglec-1 / Siglec-1	Sialoadhesin, CD169	α 2,3>2,6>2,8
Siglec-2 / Siglec-2	CD22	α 2,6
Siglec-4 / Siglec-4	MAG	α 2,3>>2,6
Siglec-15 / -	-	α 2,6
Siglec-3 / -	CD33	α 2,6>2,3
Siglec-5 / -	CD170	α 2,3=2,6>2,8
Siglec-6/ -	CD327	α 2,6
Siglec-7 / -	CD328	α 2,8>>2,6>2,3
Siglec-9 / Siglec-E	-	α 2,3=2,6
Siglec-8 / Siglec-F	-	α 2,3=2,6>2,8
Siglec-10 / Siglec-G	-	α 2,3=2,6
Siglec-11 / -	-	α 2,8
Siglec-12 / ...-	Pseudogen*	-
Siglec-14 / -	-	α 2,3=2,6>2,8
Siglec-16 / -	-	-
- / Siglec-H	-	unbekannt

1.2.4 *cis*- und *trans*-Bindungen der Siglecs

Die hohe Dichte an Sialinsäuren auf der Oberfläche von Immunzellen ermöglicht, dass viele Siglecs Liganden derselben Zelle binden können, auf der sie exprimiert werden. In dem Fall, dass Siglecs und Sias auf derselben Zelloberfläche eine Bindung eingehen, spricht man von einer *cis*-Interaktion. Diese *cis*-Bindung maskiert die Siglec-Bindungsstelle für Liganden auf anderen Zellen [24, 56]. Dahingegen kann Sialoadhesin keine Interaktion mit Liganden derselben Zelle eingehen, da es mit 17 Ig-Domänen weit über die Zelloberfläche und dort exprimierte Sias hinausragt [24, 57]. Eine weitere Möglichkeit der Siglec-Sias-Interaktion ist die *trans*-Bindung, wenn Siglec und Sialinsäure auf unterschiedlichen Zellen exprimiert werden.

Generell geht man davon aus, dass *cis*-Liganden überwiegen und dass eine *trans*-Bindung zustande kommt, wenn die Bindungsstellen der Siglecs vorher durch Desialylierung, z.B. nach Zellaktivierung, freigelegt werden [56, 58]. Jedoch wurde beschrieben, dass eine *cis*-Interaktion von CD22 durch einen hochaffinen *trans*-Liganden verdrängt werden kann [59]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung des sialylierten kapsulären Polysaccharids (CPS) der Gruppe B Streptokokken (GBS) an Siglec-9 die *cis*-Interaktionen auf PMNs verdrängen kann [60, 61]. Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass *trans*-Liganden Siglecs aus *cis*-Interaktionen lösen können, wenn sie eine höhere Bindungsaffinität aufweisen. Zum anderen ist durch Abspaltung von Sialinsäuren durch Sialidasen eine Freilegung der Siglecs aus *cis*-Bindungen möglich, um die jeweiligen Siglec-Bindungsstellen für *trans*-Liganden zugänglich zu machen. Ein Mechanismus, der von einigen Pathogenen zur Interaktion mit Siglecs und möglicherweise zur Zellinvasion genutzt wird [62, 63].

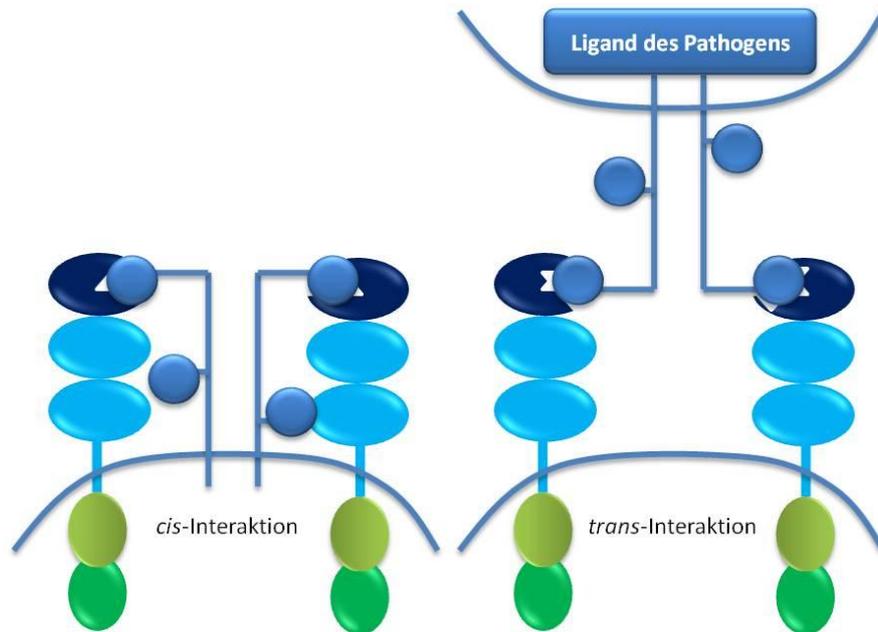


Abb. 3 Schematische Darstellung der *cis*- und *trans*-Interaktionen von Siglecs

Links ist zu erkennen, dass bei einer *cis*-Interaktion die Siglec-Bindungsstelle durch eine Sialinsäure auf der eigenen Zelloberfläche besetzt ist. Dahingegen ist in der rechten Abbildung dargestellt, wie eine *trans*-Interaktion mit einem Liganden auf der Oberfläche eines Pathogens aussehen kann.

In Abb. 3 ist ein schematisches Beispiel einer *cis*- und einer *trans*-Interaktion dargestellt. Bei der *cis*-Bindung befinden sich Siglec und Sias auf derselben Zelle, die *trans*-Interaktion zeigt die Bindung an einen sialylierten Liganden auf einem Pathogen.

1.2.5 Die Funktion der Siglecs auf Immunzellen

Da die meisten Siglecs ein inhibitorisches Signalmotiv in ihrer intrazellulären Domäne besitzen und sie vorwiegend auf Immunzellen vorzufinden sind, geht man von einer immunmodulatorischen Funktion der Siglecs aus. Um die Regulation durch Siglecs genauer zu analysieren, wurden in der Vergangenheit einige Studien mit Siglec-defizienten Mäusen gemacht. Die Verwendung von CD22-defizienten Mäusen zeigte, dass ein Anstieg von hochaffinen autoreaktiven Antikörpern die Folge der CD22-Defizienz war. Zudem führte das Fehlen von CD22 auf B-Zellen zu einer chronischen Aktivierung und einer Erhöhung des Ca^{2+} Spiegels nach B-Zell-Rezeptor Stimulation [64, 65]. Ein anderes Mausmodell zeigte, dass das Fehlen von Siglec-F im Modell des allergischen Asthmas zu einer Eosinophilie führt. Somit kann Siglec-F eine besondere Rolle in der Regulierung der Zellexpansion zugesprochen werden [66]. Bei Siglec-G defizienten Mäusen konnte eine starke Expansion der B-Zellen, sowie eine erhöhte Produktion von IgM Antikörpern beobachtet werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die inhibitorische Funktion von Siglec-G [67].

Eine weitere Möglichkeit, die immunologische Funktion der Siglecs zu untersuchen, ist die Verwendung von anti-Siglec-Antikörpern. Diese können die Ligandenbindung nachahmen und erlauben somit eine Analyse der Siglec-Funktion nach Ligation und Aktivierung. So konnte mittels Ligation von Siglec-9 durch einen spezifischen Antikörper bei PMNs Apoptose induziert werden [68]. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Ligation von Siglec-8 auf Eosinophilen, welche auch einen apoptotischen Phänotyp nach anti-Siglec-8 Inkubation zeigten [69]. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben führt die Ligation von Siglec-H mit spezifischen Antikörpern zu einer verringerten Typ-I Interferon Produktion. Somit kann die Ligation von Siglec-H die Ausschüttung dieser bei Virusinfektionen produzierten Zytokine hemmen [47]. Ein weiteres Phänomen, das unter der Verwendung von Antikörpern beobachtet werden konnte, ist die durch Antikörper induzierte Endozytose von Siglecs. Nach Ligation wurden die Siglecs mit dem gebundenen Antikörper internalisiert [45, 46, 70]. Nach Aktivierung von TLR-Signalwegen, konnte gezeigt werden, dass die Siglec-E-Expression anstieg. Die erhöhte Siglec-Expression wiederum hatte einen inhibitorischen Effekt auf die durch die TLR-Aktivierung ausgelöste Zytokin-Produktion [71].

Die Verwendung von transfizierten Zelllinien und der Einsatz von anti-Siglec-Antikörpern sind ein gutes Hilfsmittel, um die Funktion von Siglecs zu charakterisieren. Allerdings wird durch einen Antikörper die Bindung an den Rezeptor (Ligation oder Blockade) imitiert; die ausgelöste Wirkung auf das entsprechende Siglec kann von einer Ligation durch einen natürlichen Liganden abweichen. So wird die Bindung eines Antikörpers an Siglecs viel stärker eingeschätzt als die Ligation durch eine natürlich vorkommende Sialinsäure.

1.2.6 Siglec-E wird auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert

Siglec-E ist ein Mitglied der CD33-verwandten Siglecs, welches auf Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, DCs und NK-Zellen exprimiert wird [33]. Es ist ein aus 467 Aminosäuren aufgebautes Lektin, das aus drei extrazellulären Ig-Domänen, einem Transmembranteil und einer darauffolgenden intrazellulären Domäne besteht. Die N-terminale V-artige Ig-Domäne ist für die Sialinsäurebindung verantwortlich. Sie enthält den für Siglecs charakteristischen Arginin-Rest, der zur Ausbildung einer Salzbrücke zur Carboxylgruppe der Sias benötigt wird. Der in 1.2.2 beschriebenen zweiten Gruppe der Siglecs angehörig, besitzt Siglec-E intrazellulär zwei inhibitorische Signalmotive (ITIM und ITIM-ähnliches Motiv). Nach Aktivierung von Siglec-E und

anschließender Phosphorylierung der konservierten Tyrosin-Reste der ITIMs können die inhibitorischen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutiert werden [72].

Das Expressionsprofil des murinen Siglec-E ähnelt dem der humanen Siglecs-7 und -9. Zudem besitzt Siglec-E eine Sequenzidentität von 53 bzw. 52% zu den humanen Siglecs-7 und -9. [72].

Die in Tabelle 1 (S. 10) beschriebene Bindungsspezifität für α -2, 3 verknüpfte Neu5Ac ist zudem für das murine Siglec-E und die humanen Siglecs gleich. Diese gemeinsamen Eigenschaften sprechen dafür, dass es sich um Paraloge handelt, die sich im Laufe der schnellen Evolution der Siglecs konvergent entwickelt haben [53]. Neuste Ergebnisse haben gezeigt, dass die Komplexierung von Siglec-E auf dendritischen Zellen zu einer verringerten Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS führt [73]. Zudem wurde beschrieben, dass die Expression von Siglec-E nach TLR-Stimulation ansteigt. Dies spricht für einen negativen Rückkopplungsmechanismus, um die TLR-induzierte Zytokinproduktion zu hemmen [71].

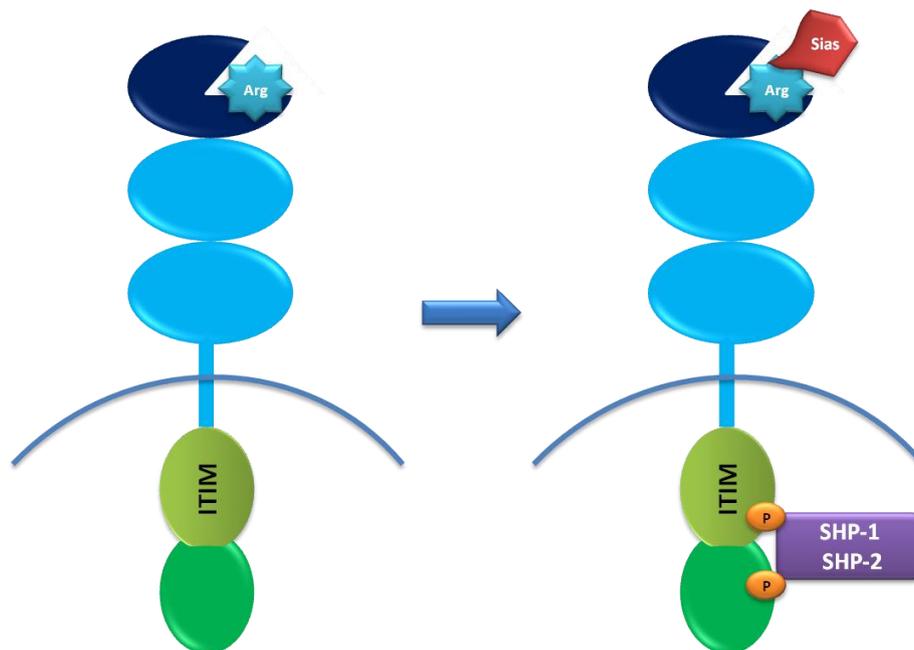


Abb. 4: Schematische Darstellung des murinen Siglec-E

Siglec-E besitzt zwei C2-Ig-Domänen und eine variable Ig-Domäne, die den charakteristischen Arginin-Rest enthält, der für die Sialinsäurebindung verantwortlich ist. Im zytoplasmatischen Teil befinden sich das ITIM und das ITIM-ähnliche Motiv, welche durch Src-Kinasen phosphoryliert werden können und dann die Rekrutierungsstelle für die inhibitorischen Phosphatasen SHP-1 / SHP-2 bilden.

In Abb. 4 ist schematisch dargestellt, wie das murine Siglec-E aufgebaut ist. Die V-artige Ig-Domäne enthält die Bindungsstelle für Sias und ist gekennzeichnet durch den konservierten Arginin-Rest. Nach Bindung einer α -2, 3 verknüpfte Sialinsäure, wird Siglec-E aktiviert und die intrazellulären ITIMs phosphoryliert. Dies führt zur

Rekrutierung der inhibitorischen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. Anschließend können z.B. TLR-induzierte Aktivierungskaskaden der Zelle durch Dephosphorylierung von intrazellulären Proteinen gehemmt werden.

1.2.7 Pathogene binden an Siglecs und modulieren die Immunantwort

Einige Pathogene haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt Sias zu exprimieren oder sie mittels enzymatischer Spaltung von Wirtszellen abzuspalten und auf die eigene Oberfläche zu übertragen [74]. Das Vorhandensein von Sias auf der pathogenen Oberfläche führt zu einer Maskierung der Antigene und somit ist die Erkennung des Erregers durch das Immunsystem erschwert. Zudem kann durch die Sias eine Bindung des Komplementfaktors C3b und somit die Bildung der C3-Konvertase verhindert werden. So wurde beschrieben, dass das sialylierte kapsuläre Polysaccharids (CPS) der Gruppe B Streptokokken (GBS) oder auch Sias auf der *T. cruzi* Oberfläche die Bindung von C3b inhibieren [75, 76].

Die Expression oder das Abspalten von Sias bietet jedoch eine weitere Möglichkeit das Immunsystem zu beeinflussen. So wird in neueren Studien die direkte Interaktion mit Siglecs und die folgende Immunmodulation diskutiert. Auch Mechanismen zur Zellinvasion über Siglecs sind Themen der aktuellen Forschung. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von HIV-1 an Siglec-1 (Sialoadhesin) auf Makrophagen zu einer gesteigerten Infektionsrate führt [77]. Auch die sialylierten Lipopolysaccharide (LPS) des gram-negativen Bakteriums *Neisseria meningitidis* werden von Sialoadhesin erkannt und fördern die Phagozytose [62]. Die direkte Interaktion von CPS der GBS mit dem auf Neutrophilen exprimierten Siglec-9 führte zu einer Unterdrückung der Abwehrfunktionen dieser Immunzellen [61]. Die Interaktion von *T. cruzi* mit Sialoadhesin wurde von Monteiro et al. beschrieben [63]. Durch die Blockade der Bindung mit Sialoadhesin spezifischen Antikörpern, verringerten sich die Infektionsraten. Erdmann et al. beschrieben, dass die Wechselwirkung von hoch-sialylierten Trypanosomen mit dem auf DCs exprimierten Siglec-E zu einer Verringerung der Zytokinproduktion und einer Verminderung der Stimulationsfähigkeit von T-Zellen führt [78].

Diese Beispiele zeigen, dass molekulares Mimikry, in diesem Fall die Imitation von Sialinsäurestrukturen, ein häufig genutzter Mechanismus von Pathogenen ist, um die Immunantwort zu modulieren.

1.3 *Trypanosoma cruzi* ist der Erreger der Chagas-Krankheit

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) ist ein einzelliger Parasit, der in Süd- und Mittelamerika die Chagas-Krankheit verursacht. Dies ist eine chronische Infektionserkrankung, an der im Jahr 2008 mehr als 10.000 Menschen starben und vermutlich über 10 Millionen infiziert sind; WHO 2010 [79]. Die natürliche Übertragung von *T. cruzi* erfolgt bei der Blutmahlzeit von ca. 3-4 cm großen Raubwanzen (Reduviiden) der Unterfamilie der Triatominae. In den Endemiegebieten von Süd- und Mittelamerika sind Raubwanzen der Gattung *Triatoma*, vorwiegend *Triatoma infestans*, als wichtigster Zwischenwirt zu benennen.

Bereits 1909 gelang es dem brasilianischen Arzt Dr. Carlos Chagas in einer umfassenden Arbeit die Raubwanze als Überträger von begeißelten, einzelligen Parasiten bei Gleisbauarbeitern, die vermeintlich an Malaria litten, zu identifizieren. In umfangreichen Studien gelang es ihm den vollständigen Lebenszyklus des Parasiten zu beschreiben und benannte den Erreger der Chagas-Krankheit nach seinem Mentor Oswaldo Cruz, *Trypanosoma cruzi*. Carlos Chagas gelang es die Hauptaspekte dieser neuen tropischen Krankheit vollständig zu beschreiben: Die Raubwanze als Vektor, die verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten, die Tiere, die als Reservoir dienen, den Wirt und schließlich auch die Epidemiologie der Erkrankung [80].

Die systematische Einordnung von *T. cruzi* ist wie folgt:

- **System:** Protozoa
- **Stamm:** Sarcomastigophora
- **Unterstamm:** Flagellata
- **Klasse:** Zoomastigophora
- **Ordnung:** Kinetoplastida
- **Familie:** Trypanosomatidae

1.3.1 Die Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomiasis)

Bei der Chagas-Krankheit handelt es sich um eine lebenslang persistierende Infektionserkrankung durch den Parasiten *T. cruzi*. Laut Weltgesundheitsorganisation sind ca. 10 Millionen Menschen infiziert und über 25 Millionen Menschen in Süd- und Mittelamerika dem Risiko einer Infektion ausgesetzt; WHO 2010 [79].

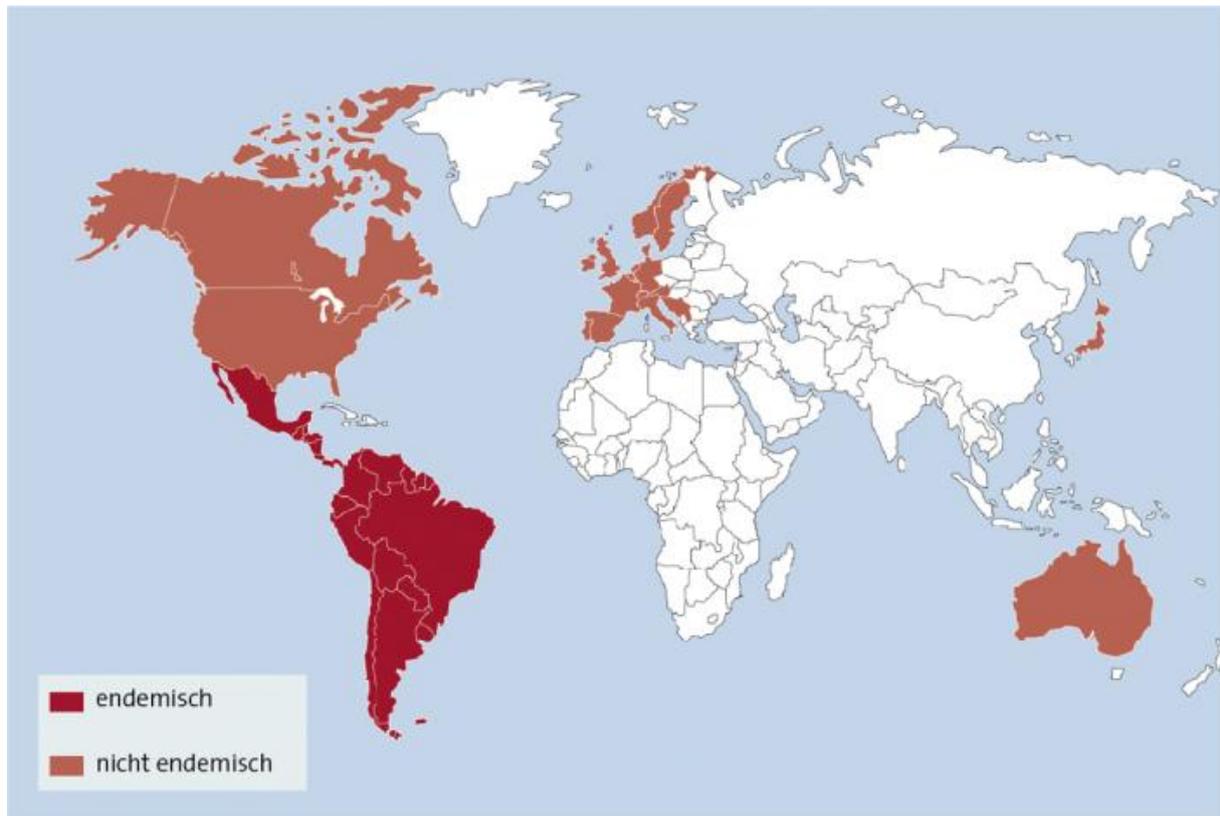


Abb. 5: Verbreitungsgebiet der Chagas-Krankheit

Die Weltkarte zeigt das Verbreitungsgebiet der Chagas-Krankheit mit den endemischen und nicht endemischen Regionen. Endemische Gebiete sind in Süd- und Mittelamerika zu finden. Darstellung von ©DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) [81].

Die Chagas-Krankheit ist durch drei verschiedene Phasen charakterisiert. Zu Beginn der Erkrankung, der akuten Phase, können milde Symptome wie leichtes Fieber, Übelkeit oder auch Erbrechen auftreten. Diese ca. vier bis acht Wochen lange akute Phase kann jedoch auch symptomfrei ablaufen und erschwert somit eine rechtzeitige Diagnose und Behandlung. Durch den Stich der Raubwanze kann eine Schwellung (Chagom) am Infektionsort entstehen. Die Blutmahlzeit wird bevorzugt an der weichen Haut des Auges beim schlafenden Wirt eingenommen. Die lokale Schwellung am Auge ist ein typisches Merkmal der *T. cruzi* Infektion, das sogenannte *Romaña* Zeichen. In den ersten Monaten einer *T. cruzi* Infektion sind die Parasiten in Blutaussstrichen detektierbar. Es kommt zu einer schnellen Infektion verschiedener Wirtszellen. Alle Zellkern-haltigen Zellen verschiedener Gewebe können durch die rapide Replikation und Verbreitung infiziert werden [82], bevorzugt jedoch Skelett- und Herzmuskelzellen, sowie enterische Nervenzellen und Adipozyten [83-87]. Hierbei wird durch die Parasiten-induzierte Zytolyse eine Entzündungsreaktion in den verschiedenen Geweben hervorgerufen [88]. Sobald eine adaptive Immunantwort gegen *T. cruzi* etabliert wurde, kommt es zu einer

Reduktion der Parasitämie und einer Abnahme der Anzahl an infizierten Zellen. Diese symptomfreie Phase, in der Patienten zwar seropositiv für *T. cruzi* sind, jedoch keine Beschwerden haben, nennt man intermediäre Phase.

Bei ca. 30-40% der infizierten Personen entwickelt sich etwa 10 bis 30 Jahre nach der ursprünglichen Infektion die chronische Phase. Diese ist gekennzeichnet durch eine schwerwiegende Erkrankung des Herzmuskels und eine starke Vergrößerung des Herzens, welches in epidemischen Regionen Lateinamerikas immer noch die vorwiegende Ursache für eine infektiöse Kardiomyopathie mit tödlichen Folgen ist. Andere Symptome der chronischen Phase der Chagas-Krankheit sind Vergrößerungen des Darms oder der Speiseröhre (Megakolon, Megaösophagus).

Warum nur einige Patienten in die chronische Phase der Chagas-Krankheit eintreten und welcher Natur die nach Jahren auftretenden Entzündungen sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Ob die in Herzmuskelzellen persistierenden Parasiten die Entzündungsreaktion hervorrufen oder ob es sich um eine autoimmune Kreuzreaktion [89, 90] handelt, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass während der Chagas-Krankheit gebildete Antikörper, sowie autoreaktive T-Zellen, körpereigene Proteine erkennen [91, 92]. Klinische Studien zeigen, dass eine frühe medikamentöse Behandlung infizierter Patienten das Auftreten von pathologischen Symptomen verhindern kann, so dass die Präsenz von Parasiten in entzündeten Regionen eine notwendige Voraussetzung für die Gewebsinflammation ist [93-95].

1.3.2 Der Lebenszyklus von *T. cruzi* gliedert sich in vier Entwicklungsstadien

T. cruzi vollzieht in seinem Lebenszyklus einen Wirtswechsel zwischen Insekt und Säugetier. Im Verdauungstrakt der Raubwanze entwickeln sich Trypomastigote, die bei einer Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt aufgenommen wurden, zu Epimastigoten und vermehren sich durch einfache Zweiteilung. Nach der Darmpassage vollziehen die Epimastigote einen weiteren Entwicklungsschritt zu metazyklischen Trypomastigoten. Diese sich im Enddarm der Raubwanze befindlichen infektiösen Stadien können bei einer erneuten Blutmahlzeit über den Kot und Urin auf die Haut des Säugetierwirtes gelangen. Da die Raubwanze bis zu 2 mL Blut saugt und somit ein Vielfaches ihres Körpergewichts aufnimmt, kommt es immer zur Absonderung von Fäzes während des schnellen Metabolisierens des aufgenommenen Blutes. Die metazyklischen Trypomastigoten gelangen über die verletzte Haut (Jucken, Kratzen) oder über Schleimhäute in den Blutstrom des Wirts und können verschiedene Wirtszellen

infizieren. Nach der Zellinvasion befindet sich der Parasit in der parasitophoren Vakuole, aus der er ins Zytosol ausbricht und sich anschließend zur intrazellulären Form, den Amastigoten, entwickelt. Es beginnt ein Prozess einer starken Replikation durch Zweiteilung. Am Ende der Vermehrungsphase entwickeln sich die Amastigote wieder in die Trypomastigote Form und können nach dem Zerstören der Zellmembran in den Blutstrom gelangen und dort disseminieren bzw. weitere Zellen infizieren. Die im Blutstrom vorhandenen Trypomastigoten können von einer Raubwanze aufgenommen werden, um den Lebenszyklus von *T. cruzi* zu schließen [96]. In Abb. 6 ist der Lebenszyklus mit den vier verschiedenen Entwicklungsstadien von *T. cruzi* dargestellt.

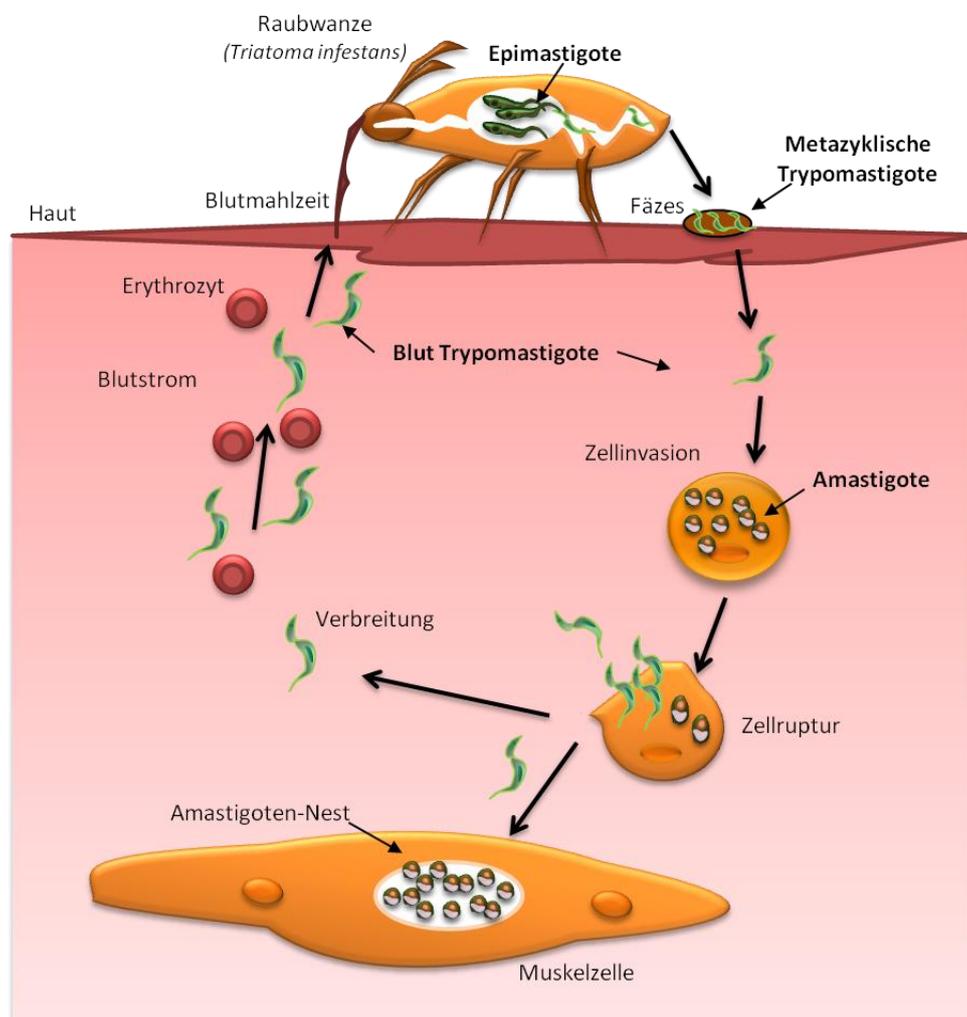


Abb. 6: Der Lebenszyklus von *T. cruzi* beinhaltet vier Entwicklungsstadien

Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. In der Raubwanze entwickeln sich Epimastigote, die über den Kot als metazyklische Trypomastigote ausgeschieden werden. Diese gelangen über die verletzte Haut oder Schleimhäute in den Säugetierwirt, wo sie Zellen infizieren und sich zu intrazellulären Amastigoten verwandeln. Durch die starke Replikation reißt die Zellmembran und Blut-Trypomastigote werden in den Blutstrom freigelassen. Diese können weitere Zellen infizieren, so dass Amastigoten-Nester entstehen können. Bei einer zweiten Blutmahlzeit können Trypomastigote vom blutsaugenden Insekt wieder aufgenommen werden. Modifiziert nach *Expert Reviews in Molecular Medicine* © Cambridge University Press.

1.3.3 Die Zellinvasion von *T. cruzi* findet über den Wundheilungsprozess statt

Grundsätzlich ist vorweg zu nehmen, dass sich die Zellinvasionsmechanismen von metazyklischen oder auch Blut Trypanosomen sowie die Invasion von Amastigoten unterscheiden [97, 98]. Im Folgenden wird der Invasionsmechanismus von Blut-Trypomastigoten detaillierter beschrieben. Die Zellinvasion ist für *T. cruzi* überlebenswichtig, da intrazellulär die Replikation als Amastigote Form stattfindet. *T. cruzi* kann phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen infizieren, wobei sich die Invasionsmechanismen unterscheiden. So können Trypanosomen als Amastigote oder auch Trypomastigote Form von Phagozyten über Phagozytose aufgenommen werden; aber *T. cruzi* besitzt im Gegensatz zu anderen Parasiten (z.B. Leishmanien) auch die Fähigkeit nicht-phagozytierende Zellen zu infizieren [99-102]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang unabhängig von der Polymerisierung des Aktins der Wirtszelle ist [103]. Tardieux et al. fanden heraus, dass Lysosomen kurz nach dem Kontakt mit *T. cruzi* zur Invasionsseite rekrutiert werden. Die Assoziation von Lamp-1, einem Lysosomenmarker, mit den gerade eindringenden Trypomastigoten konnte nachgewiesen werden [104]. Desweiteren wurde beschrieben, dass die schnelle Rekrutierung der Lysosomen zur Parasiten-Eintrittsstelle durch die *de novo* Polymerisation von Mikrotubuli möglich ist [105].

Die Rekrutierung und die Exozytose von Lysosomen ist ein Ca^{2+} abhängiger Prozess, welcher bei der Invasion von *T. cruzi*, aber auch beim Heilungsprozess nach Membranschädigung, stattfindet [101, 104, 106-108]. Die Exozytose von Lysosomen hat zur Folge, dass ein endozytotischer Prozess zum Verschließen der Zellmembran und dem Entfernen der Läsionen in Gang gesetzt wird [109]. Durch die Exozytose von Lysosomen wird das lysosomale Enzym ASM (*acid sphingomyelinase*) extrazellulär sekretiert [102]. Dieses Enzym generiert Ceramid-angereicherte Regionen in der äußeren Zellmembran, welche schnell endozytiert werden können [110]. Die von Fernandes et al. veröffentlichten Daten bestärken die Theorie, dass *T. cruzi* den durch Lysosomen-Exozytose gesteuerten Endozytose-Prozess ausnutzt, um in die Zelle zu gelangen [111]. So wird vermutet, dass *T. cruzi* bei der Invasion die Zelle verletzt und die Zellmembran bei der Invasion deformiert, um den Wundheilungsprozess zu induzieren. *T. cruzi* kann über die Ceramid-haltigen Regionen leichter internalisiert werden. Die internalisierten Parasiten sind umgeben von Ceramid-haltigen Membranen, welche mit zusätzlich fusionierenden Lysosomen die parasitophore Vakuole bilden [111]. Die Ausnutzung dieses hoch konservierten Wundheilungsmechanismus kann

möglicherweise den Tropismus [83] von *T. cruzi* für Muskelzellen erklären, da diese häufiger Verletzungen aufweisen [112, 113].

Für die Initiierung dieses Invasionsprozesses werden verschiedene Proteasen und andere Oberflächen-Glykoproteine von *T. cruzi* benötigt. So sind die Serin-Endopeptidase Oligopeptidase B [108, 114] und die Cystein-Protease Cruzipain (Cz) [82, 115] für den Invasionsprozess entscheidend. Beide Proteine induzieren die Ca^{2+} -abhängige Rekrutierung von Lysosomen in der Wirtszelle [104, 116].

Nach der Zellinvasion befindet sich *T. cruzi* in der parasitophoren Vakuole, welche mit weiteren Lysosomen fusioniert. Dieser Prozess führt zu einem Absinken des pH-Werts, was die Aktivierung des *T. cruzi* Proteins TcTox (*T. cruzi* Hemolysin) auslöst und die Zerstörung der Vakuolenmembran induziert [117]. Die Ansäuerung der Vakuole induziert zusätzlich die Transformation in das Amastigoten Stadium [118].

Dies sind nur einige Moleküle, die für den Invasionsprozess und die Virulenz von *T. cruzi* verantwortlich sind. Zu einer weiteren Gruppe gehören die Proteine der gp85/*Trans*-Sialidase-Superfamilie [98, 119]. Die *Trans*-Sialidase (TS) ist ein Mitglied dieser Familie, welches ein ausschlaggebender Virulenzfaktor von *T. cruzi* ist [120]. Die Expression der TS ermöglicht es zum Beispiel metazyklischen Trypomastigoten schneller die parasitophore Vakuole ins Zytosol zu verlassen [119].

1.3.4 Die *T. cruzi* Trans-Sialidase (TS) ist ein einmaliges Enzym

Auf der Parasitenoberfläche von Trypanosomen befinden sich viele Mucin-artige Strukturen, an die Sias gekoppelt sind. Schauer et al. postulierten, dass das Vorhandensein von Sias auf der Oberfläche von *T. cruzi* für das Überleben im Wirt Voraussetzung ist [121]. Da Trypanosomen nicht in der Lage sind Sias selbst zu synthetisieren [122], exprimieren sie ein einzigartiges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS). Dieses Enzym ist ein entscheidender Virulenzfaktor, da die TS fähig ist Sias von Wirtszellen abzuspalten und auf die Parasitenoberfläche zu übertragen [78, 123-126]. Über 1430 Gene kodieren für die TS, was deutlich macht, dass die Expression der TS essentiell für den Parasiten ist [127]. Auch wenn einige der Gene als Pseudogene beschrieben wurden, wird über die Vielzahl an Genen eine Expression der TS sichergestellt. Ebenso ist die Klasse der Mucine, welches die Akzeptorstrukturen für die zu übertragenden Sias darstellen, durch eine große Anzahl an Genen (863) charakterisiert. Zusätzlich kodieren 1377 Gene für so genannte Mucin-assoziierten Oberflächenproteine (MASP) [127].

Die TS ist Mitglied der gp85-Superfamilie. Sie besitzt eine katalytische Domäne, welche drei Aktivitäten koordiniert. Sie spaltet Sias ab (Sialidase-Aktivität) und überträgt sie auf Glykokonjugate (Transferase-Aktivität). Die Lektin-artige Domäne bindet an terminale Galaktose-Reste, auf die die Sias transferiert werden. Nur α -2,3-verknüpfte Sias werden von der TS übertragen [126, 128].

Die TS ist in zwei Formen vorzufinden; die sezernierte Form, die im extrazellulären Milieu lokalisiert ist und die GPI-verankerte Form auf der *T. cruzi*-Membran [129].

Die sezernierte TS verteilt sich im Blutstrom des Wirtes und kann somit nicht nur lokal sondern im ganzen Körper wirken. Durch die lösliche TS wird die Immunantwort in der akuten Phase der Infektion unterdrückt. So wurde sie mit der Depletion von Thymozyten sowie der polyklonalen Aktivierung von Lymphozyten in Verbindung gebracht [130, 131].

Die auf der Oberfläche verankerte TS ist zur Übertragung von Sias auf Mucin-ähnliche Strukturen nötig. Dieser Mechanismus ist schematisch in Abb. 7 dargestellt.

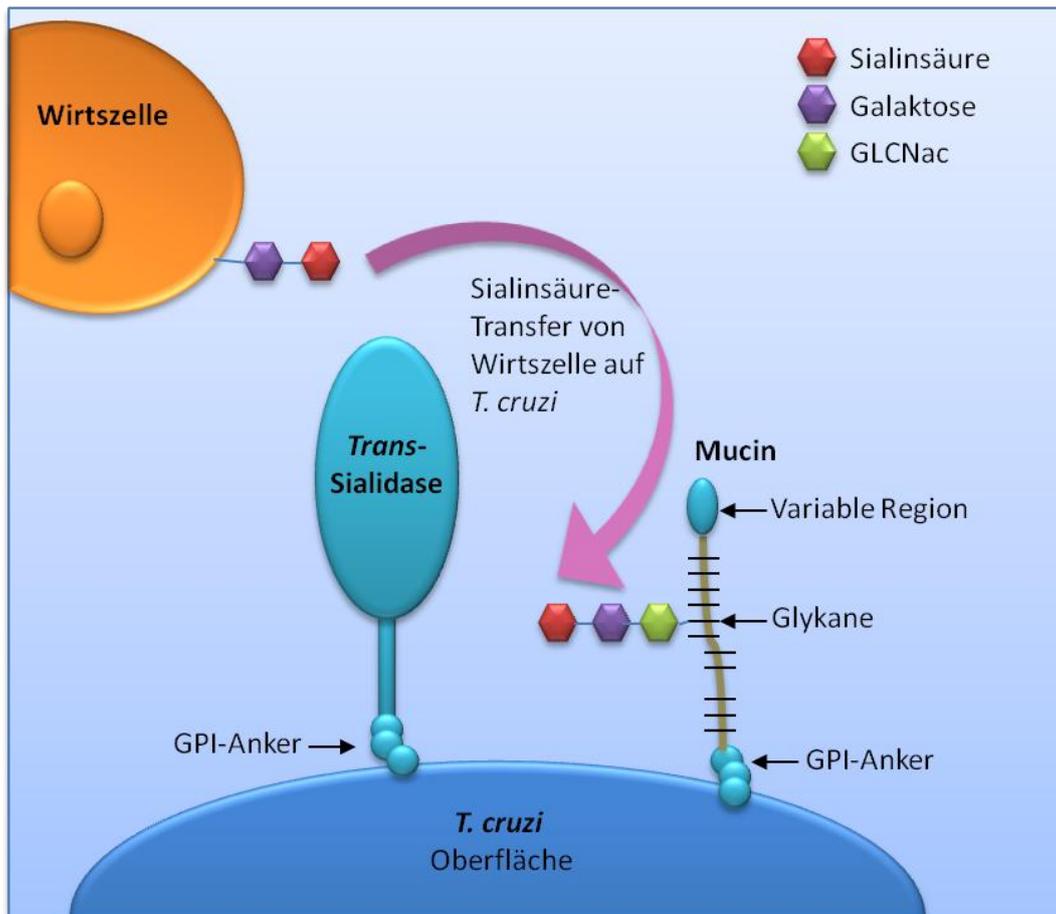


Abb. 7: Darstellung der Übertragung von Sialinsäuren durch die *T. cruzi* Trans-Sialidase (TS)

Die auf der Trypanosomenoberfläche verankerte Form der TS ist in der Lage Sias von Wirtszellglykanen abzuspalten und auf Mucin-artige Akzeptorstrukturen auf der Parasitenoberfläche zu übertragen. Der Transfer hat α -2,3-verknüpfte Sias zur Folge. Modifiziert nach Jacobs et al. [132].

Die Sias werden von Wirtszellen abgespalten und mittels der Transferase-Aktivität der TS auf Mucin-artige Strukturen der Parasitenoberfläche übertragen. Hierbei werden nur α -2,3-verknüpfte Sias auf Glykoproteine des Parasiten transferiert. Die Übertragung von Sias durch die TS ist ungerichtet, so dass auch Sias von der Parasitenoberfläche wieder abgespalten werden können.

1.3.5 *T. cruzi* kann sechs verschiedenen Klassen zugeordnet werden

Nur ca. 30-40% der *T. cruzi* positiven Patienten entwickeln die chronische Form der Chagas-Krankheit. Ein Grund hierfür kann die hohe Heterogenität der *T. cruzi* Stämme sein [133]. Lange Zeit wurden die einzelnen *T. cruzi* Stämme zwei verschiedenen phylogenetischen Hauptgruppen zugeordnet, TcI und TcII [134]. Diese Einteilung basierte auf der Analyse von rRNA-Promotoren, Mikrosatelliten-Markern und Mini-Exon-Sequenzen und so genannten DTUs (*discrete typing units*) [135]. Viele der neu charakterisierten Stämme, ließen sich dieser einfachen Aufteilung nicht zuordnen, so

dass die DTU II (TcII) Gruppe in fünf weitere Untergruppen eingeteilt wurde (DTU IIa-e). In der folgenden Tabelle 2 sind einige *T. cruzi* Stämme und ihre Zugehörigkeit zur Gruppe TcI – TcVI dargestellt. Eine ausführliche Zusammenfassung der neusten Erkenntnisse zur Klassifizierung und geografischen Verteilung der *T. cruzi* Stämme wurde von Zingales et al. in 2012 veröffentlicht [136].

Tabelle 2: Darstellung ausgewählter *T. cruzi* Stämme und ihrer Zuordnung in DTU Klassen.

Es wurden einige gängige *T. cruzi* Stämme ausgewählt, um die Zuordnung in verschiedene DTU Klassen zu verdeutlichen. Zusätzlich sind der Ort und der Wirt bzw. Vektor angegeben, woher die Trypanosomen stammen. Modifiziert nach der Tabelle von Zingales et al. 2009 [137].

Stamm	DTU Klasse	Land	Wirt/Vektor
4167	TcIV	Amazonas, Brasilien	Rhodnius brethesi
CL Brener	TcVI	Rio Grande do Sul, Brasilien	Triatoma infestans
CM17	TcIII	Meta, Kolumbien	Dasypus sp.
Dm28c	TcI	Carabobo, Venezuela	Didelphis masupialis
G	TcI	Amazonas, Brasilien	Opossum
NR c13	TcV	Salvador, Chile	Homo sapiens
RA	TcVI	Argentinien	Homo sapiens
Sylvio X10 c11	TcI	Pará, Brasilien	Homo sapiens
Tu18 c11	TcII	Tupiza, Brasilien	Triatoma infestans
Tulahuen	TcVI	Tulahuen, Chile	Homo sapiens
Y	Tc II	Sao Paulo, Brasilien	Homo sapiens

Grundsätzlich kommen die verschiedenen *T. cruzi* Stämme in zwei verschiedenen Infektionszyklen vor: dem sylvatischen und dem domestischen Infektionszyklus. TcI Stämme sind dem sylvatischen Zyklus zugehörig, welcher zwischen Beuteltieren und anderen wildlebenden Tieren und Raubwanzen abläuft. TcI Infektionen wurden hauptsächlich in endemischen Regionen nördlich des Amazonasgebietes beobachtet [138-140].

Die Stämme der DTU II (TcII – TcVI) sind dem domestischen Infektionszyklus zuzuordnen und werden mit den chronischen Symptomen der Chagas-Krankheit in Verbindung gebracht [141, 142]. Der domestische Zyklus ist durch die Transmission der Parasiten von domestischen Raubwanzen (*Triatoma infestans*) und Menschen bzw. Haus- und Nutztieren gekennzeichnet.

Die Stämme der TcI und der TcII - TcVI Gruppen sind durch biologische Unterschiede im Bezug auf die Zellinvasion und die Persistenz der Parasiten charakterisiert. Die TS ist ein entscheidender Virulenzfaktor, der diese beiden Gruppen unterscheidet. So wird die hohe Expression und Sezernierung der TS bei den Stämmen der DTU II (TcII - TcVI) mit einer erhöhten Pathogenität assoziiert [120].

1.3.6 Die Immunantwort gegen *T. cruzi*

Die Immunantwort gegen eine *T. cruzi* Infektion ist durch die Aktivierung von CD4⁺ Th1-Zellen, CD8⁺ CTLs (Zytotoxischen Killerzellen, *cytotoxic T-lymphocytes*) und die Aktivierung von NK-Zellen charakterisiert. Diese Abwehrmechanismen der adaptiven Immunantwort werden durch die angeborene Immunantwort induziert und kontrolliert [143]. So kommt es nach der Infektion mit *T. cruzi* zu einer schnellen Aktivierung von DCs und Makrophagen über PRRs. Die Aktivierung über TLR-2 und TLR-9, welche GPI-verankerte Proteine bzw. CpG-DNA-Motive erkennen, ist ausschlaggebend für die Produktion des inflammatorischen Zytokins IL-12 [144, 145]. Dieses Zytokin aktiviert NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen [146, 147]. Zusätzlich wird die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen induziert. Die Th1-Immunantwort ist essentiell für die Immunabwehr gegen *T. cruzi* [148]. Als Rückkopplungsmechanismus wird von den Zellen des adaptiven Immunsystems (Th1-Zellen, CTLs) das Zytokin IFN- γ gebildet, welches Makrophagen und DCs aktiviert internalisierte Parasiten abzutöten. Dies geschieht durch die Induktion der iNOS zur Produktion von Stickradikalen [149-152]. NK-Zellen können nach Aktivierung auch extrazelluläre Trypanosomen lysieren [153].

Die Verwendung TLR-2 oder TLR-9 defizienter Mäuse zeigte, dass diese Erkennungssignalwege entscheidend für die Induktion einer Immunantwort gegen *T. cruzi* sind, denn sie wiesen eine verringerte Zytokinproduktion und eine erhöhte Suszeptibilität auf [144, 154]. Die Analyse von IL-12 oder IFN- γ defizienten Mäusen zeigte ähnliche Ergebnisse [155]. Das Fehlen der iNOS oder auch die Depletion von NK-Zellen führt *in vivo* zu erhöhten Parasitämien und höheren Sterberaten *T. cruzi* infizierter Mäuse [152, 153, 156].

Die Produktion der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12 durch Makrophagen und DCs nach Aktivierung durch TLRs steht am Anfang der *T. cruzi* Infektion und ist entscheidend für den folgenden Ablauf der Immunantwort und die Begrenzung des Parasitenwachstums in der akuten Phase der Infektion. Erdmann et al. konnten zeigen, dass ein hoch-sialylierter *T. cruzi* Stamm diese anfängliche Zytokinproduktion unterdrücken kann. Dafür bindet er, mit den von der TS transferierten Sialinsäuren, an das von DCs exprimierte Molekül Siglec-E. Durch diese Ligation wird Siglec-E aktiviert, was zu einer Inhibierung von Aktivierungskaskaden führt. Die inhibitorische Wirkung der Siglec-E-Ligation durch *T. cruzi* führt zur Reduktion der IL-12 Produktion von DCs und einer schlechteren Stimulationsfähigkeit von Th1-Zellen, welche im Gegenzug weniger protektives IFN- γ produzieren [78].

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung zwischen *T. cruzi* und dem inhibitorischen Molekül Siglec-E genauer analysiert werden. Zunächst sollte in einer Kollaboration mit dem argentinischen Labor des *Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fátala Chaben"* die Analyse verschiedener *T. cruzi* Stämme erfolgen, um einen Zusammenhang zwischen dem Sialyierungsgrad der Parasiten und der Bindung an Siglec-E herzustellen. Die Kultivierung und immunologische Analyse der Parasiten Stämme sollte im argentinischen und nach Versendung der Trypanosomen auch im deutschen Labor erfolgen.

Zusätzlich sollten verschiedene Zellpopulationen der angeborenen Immunabwehr, die Siglec-E exprimieren, im Zusammenhang mit der *T. cruzi* Infektion untersucht werden. Die Rolle von PMNs, den Zellen, die als erstes am Infektionsort vorzufinden sind, stand im anfänglichen Fokus der Analyse. Da diese Zellen am meisten Siglec-E exprimieren, sollte geprüft werden, ob durch die Interaktion von *T. cruzi* mit Siglec-E Abwehrmechanismen dieser Zellpopulation reguliert werden.

Desweiteren sollte der Einfluss eines anti-Siglec-E-Antikörpers untersucht werden. Zunächst sollte analysiert werden, ob dieser Antikörper die Bindungsstelle von Siglec-E nur blockiert oder eine Ligation von *T. cruzi* imitiert werden kann. Ob die Antikörper Ligation die Zytokinproduktion von APZ (DCs und Makrophagen) oder auch die Infektionsraten bzw. intrazelluläre Vermehrung der Parasiten inhibiert, sollte in *in vitro* Studien analysiert werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Analysenwaage	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Biophotometer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Brutschrank	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
CO ₂ -Inkubator	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Cytospin-Zentrifuge	<i>„Cytospin 3“ Shandon Scientific, Runcorn, UK</i>
Durchflusszytometer	<i>„FACScalibur“ Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer	<i>„Accuri C6“ BD Bioscience, Heidelberg</i>
ELISA-Photometer MRX-II	<i>Dynex Technologies, Berlin</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>„Axioskop 2 plus“ Zeiss, Oberkochen</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>„Nikon A1 confocal laser microscopy systems“, Nikon, Amsterdam, Niederlande</i>
Fluoreszenzmikroskopkamera	<i>C4742-95 Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee</i>
Invers-Mikroskop	<i>„Nikon TMS“ Nikon Instruments, Badhoevedorp, Niederlande</i>
IVC	<i>„Blue Line IVC Sealsafe“ Tecniplast, Valencia, Italien</i>
Magnetrührer IKAMAG RCT	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mikroplatten-Leser	<i>Infinite®, TECAN, Männedorf, Schweiz</i>
Mikroskop „Olympus CK2“	<i>Olympus, Hamburg</i>
Mikroskop Axiostar plus	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Einfrierbehältnis (<i>Mr. Frosty</i>)	<i>Nalgene®, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)</i>
Nano-drop Photometer 2000 c	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
pH-Meter (WTW pH537)	<i>Labotec, Wiesbaden</i>
Pipetten	<i>Eppendorf, Hamburg u. Gilson, Middleton, USA</i>
Schüttelinkubator „CertomatBS-T“	<i>B.Braun Biotech International, Melsungen</i>
Schüttler Duomax 2030	<i>Heidolph Instruments, Schwalbach</i>
Schüttler Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Sterile Arbeitsbank „B-[MaxPro] ³ -130“	<i>Berner Flow Safe®, BERNER, Elmshorn</i>

Tischzentrifuge „Centrifuge 5415C“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Vortexer „Vortex Genie 2“	<i>Bender & Hobein, Zürich, Schweiz</i>
Vortexer „MS1 Minishaker“	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Wasserbad „Thermomix MM“	<i>B. Braun, Melsungen</i>
Wasserdeionisierungsanlage	<i>SG Clear, Barsbüttel</i>
Zentrifuge „5810R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge „Biofuge fresco“	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>

Glas- und Kunststoffverbrauchsmittel

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Chamberslides (8-well)	„Lab-Tek™ Chamber Slides™“, <i>Thermo Fisher Scientific, Langenselbold</i>
Chamberslides (4-well)	„X-well Zellkulturkammern“ <i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Chirurgische Einmal-Skalpelle	<i>Braun, Melsungen</i>
Deckgläschen (24 × 46 mm)	<i>Superior Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen</i>
Dialyseschläuche	<i>Roth, Darmstadt</i>
Einfrierröhrchen für Zellen (1.8 mL)	<i>Nunc, Roskilde, Dänemark</i>
Einmal-Injektionskanülen (0.4 x 20 mm)	<i>Braun, Melsungen</i>
Einwegpipetten (5, 10 und 25 mL)	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Eppendorf Reaktionsgefäße	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
FACS-Röhrchen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Glaspipetten	<i>Brand, Wertheim</i>
MACS-Seperationssäulen MS	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>
Mikrotiterplatte, 96-Well (Flachboden)	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Neubauer Zählkammern	<i>Hecht-Assistent, Sondheim</i>
Objektträger (76 × 26 mm)	<i>Engelbrecht, Edermünde</i>
Petrischalen für Zellkultur	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Photometrie Kunststoffkuvetten	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettenspitzen	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Säulen (leer, für Protein G)	<i>MoBiTec, Göttingen</i>
Spritzen (5, 10 und 20 mL)	<i>Braun, Melsungen</i>
Sterilfilter (0.2 µm)	<i>GDX-13, Whatman®, GE Healthcare, Schweden</i>

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Säulen (Vivaspin 2)	<i>Sartorius stedim (biotech)</i> , Göttingen
Zellkulturflasche „CELLSTAR“	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen
Zellkulturplatten 6-/24-/96-Well	<i>Greiner bio-one</i> , Frickenhausen
Zellsiebe „Cell strainer“ (70 µm)	<i>BD Biosciences</i> , Bedford, USA

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Material für molekularbiologische Arbeiten

Plasmide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
<i>pcDNA3.1(+)</i>	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
<i>LeGO-iC2</i>	B. Fehse, UKE, Hamburg
<i>LeGO-Siglec-E</i>	I. Siekmann, BNI, Hamburg

Agenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Deisenhofen
Plasmidisolationskit „MAXI Plus“	<i>QIAGEN</i> , Hilden

Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung
25 mg/mL, sterilfiltriert

LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration: 50 µg/mL)

LB-Medium

20 g LB-Broth

ad 1 L mit ddH₂O, Sterilisation im Autoklav

2.4 Material für biochemische Arbeiten

Agenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Bradford-Test Lösung 'Coomassie Plus'	<i>Pierce Biotechnology</i> , Rockford, USA
CBA Flex-Set (IL-12, IL-6, TNF- α)	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Protein G Sepharose	„4 Fast Flow“, <i>GE Healthcare</i> , Uppsala, Schweden
<i>Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA</i>	<i>Molecular Probes®</i> , <i>Invitrogen</i> , Karlsruhe

Puffer und verwendete Stammlösungen

Griess-Assay

Standard: 12.5 mM NaNO₂

Griess 1: 1% Sulfanilamid in 1M HCl

Griess 2: 0.3% N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin in H₂O

2.5 Material für zellbiologische Arbeiten

Agenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
DAPI	<i>Molecular Probes®</i> , <i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
DHR (Dihydrorhodamin 123)	<i>AAT Bioquest®</i> , Sunnyvale, CA, USA
Dimethylsulfoxid	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Gentamicin-Lösung	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
Histopaque® 1077 RT	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Incidin Liquid	<i>Ecolab</i> , Düsseldorf
IMDM	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
L-Glutamin	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
MACS-Kit „Anti-Ly-6G MicroBead Kit“	<i>Miltenyi Biotec</i> , Bergisch Gladbach
Phalloidin Rhodamin	<i>Molecular Probes®</i> , <i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
PMA (Phorbol-Myristat-Acetat)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>Serva Feinbiochemika</i> , Heidelberg
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
<i>SYTOX Orange</i>	<i>Molecular Probes®</i> , <i>Invitrogen</i> , Karlsruhe

Transfektionsreagenz "TurboFect"	<i>MBI Fermentas, St. Leon-Roth</i>
Triton™ X-100	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Trypanblau	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Trypsin-EDTA	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Einbettmedium (<i>Permaflour™</i>)	<i>Immunotech, Marseille, Frankreich</i>
Einbettmedium (<i>Roti®-Mount-FlourCare</i>)	<i>Roth, Karlsruhe</i>

Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

DAPI-Stammlösung

640 ng/mL 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in Methanol

Einfriermedium (RPMI)

50% FCS

40% RPMI mit 10% FCS

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Erythrozyten-Lyse-Puffer

10% 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)

90% 0.16 M Ammoniumchlorid

FACS-Puffer

1% FCS

0.1% Natriumazid (NaN₃) in PBS

Fötale Kälberserum

Inkubation bei 56°C für 45 min. (Komplement-Inaktivierung)

MACS-Puffer

2 mM EDTA

0.5% BSA in 1x PBS

pH 7.2 (sterilfiltriert und entgast)

Triton X-100-Lösung

0.1 % Triton X-100 in PBS

Trypanblau-Lösung

2 mg in 100 mL PBS

RPMI Medium

500 mL RPMI 1640

5-10% FCS

50 mg/mL Gentamycin

5 mL Glutamin (200 mM)

IMDM Medium

500 mL IMDM

5-10% FCS

50 mg/mL Gentamycin

5 mL Glutamin (200 mM)

Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller/Herkunft</u>
Esel α -Kaninchen-AlexaFlour488	2 mg/mL	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Esel α -Mensch IgG-PE	0.5 mg/mL	<i>Jackson IR</i> , West Grove, PA USA
Esel α -Ratte-AlexaFlour488	2 mg/mL	<i>MoBiTec</i> , Göttingen
Hamster α -Maus CD11c-Biotin	0.5 mg/mL	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Kaninchen α -Maus Siglec-E	0.5 mg/mL	Hergestellt am UKE
Kaninchen α - <i>T. cruzi</i> Serum		BNI, Hamburg
Kaninchen-IgG Serum	1 mg/mL	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Ratte α -Maus CD11b-PerCP-Cy5.5	0.2 mg/mL	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Ratte α -Maus Gr-1 (RB6-8C5)	2.5 mg/mL	BNI, Hamburg
Ratte α -Maus Gr-1-APC	0.2 mg/mL	<i>BioLegend</i> , San Diego, CA, USA
Ratte α -Maus Lamp-1 (CD107a)	0.5 mg/mL	<i>Southern Biotech</i> , Birmingham, Alabama, USA
Ratte α -Maus Siglec-E	1 mg/mL	<i>MBL, Biozol</i> , Eching
Ratte α -Maus Ter119-FITC		<i>MiltenyiBiotec</i> , Bergisch Gladbach
Streptavidin-APC	0.2 mg/mL	<i>BioLegend</i> , San Diego, CA, USA

Lektin

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Mal II (<i>Maackia amurensis lectin II</i>) (Biotin-markiert)	1 mg/mL	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Bakterienstämme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
<i>E. coli</i> DH5 α IQ'	BNI, Hamburg

Eukaryotische Zelllinien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
CHO	BNI, Hamburg
L929	BNI, Hamburg (ATCC, Rockville Maryland, USA)
Hg 39 (86-Hg-39)	BNI, Hamburg

Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme wurden im Tierhaus des BNI oder des UKE gezüchtet. Experimente wurden mit Mäusen im Alter zwischen 8 und 10 Wochen durchgeführt.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6	BNI, Hamburg
<i>Mus musculus</i> mpo ^{tm1Lus}	UKE, Hamburg
<i>Mus musculus</i> Rag1 ^{tm1Mom}	UKE, Hamburg

Parasitenstämme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>
<i>T. cruzi</i> Tulahuen	BNI, Hamburg (vom MPI für Immunbiologie, Freiburg)
<i>T. cruzi</i> Brazil	Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentinien
<i>T. cruzi</i> CL Brener	Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentinien
<i>T. cruzi</i> RA	Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentinien
<i>T. cruzi</i> Tulahuen	Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentinien

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am Spektralphotometer oder am Nano-drop und wurde bei einer Absorption von 260 ($A_{260\text{nm}}$) gemessen. Die Absorption von 1.0 entspricht 40 $\mu\text{g/mL}$ einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 50 $\mu\text{g/mL}$ doppelsträngiger DNA.

3.1.2 Plasmidpräparation aus Bakterien

Um das Siglec-E-Ig enthaltende Plasmid aus Bakterien zu präparieren, wurde eine alkalische Lyse durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA, Proteine und Membranreste in einer neutralisierenden Salzlösung. Die weitere Maxipräparation wurde mit dem EndotoxFree-Plasmid-Kit (*QIAGEN*) durchgeführt.

3.1.3 Stabile Transduktion von CHO Zellen mit einem LEGO-Vektor für Siglec-E

In einer Projektstudie von Ina Siekmann wurde ein LEGO-Vektor erzeugt, der für das Siglec-E Konstrukt kodiert. Der gewählte LEGO-Vektor (LeGO-iC2) enthält zusätzlich ein Reportergen (mCherry), welches zytosolisch exprimiert wird und in der Immunfluoreszenz rot detektierbar ist. Bei LEGO-Vektoren handelt es sich um ein lentivirales Transduktionssystem mit dem zunächst Viruspartikel hergestellt werden, die das Plasmid mit dem Zielgen (Siglec-E) enthalten. Diese Viruspartikel werden zur Infektion von verschiedenen Zellen genutzt. Die Herstellung der Viruspartikel erfolgte nach den Angaben des Herstellers (www.lentigo-vectors.de) [157].

Für die Infektion mittels lentiviraler Partikel wurden zunächst $5 \cdot 10^4$ CHO Zellen in 500 μL Medium in einer 24-well Platte ausgesät und diese für 2 bis 5 h im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen adhärent waren. Anschließend wurden jeweils 8 $\mu\text{g/mL}$ Polybren und die gewünschte Menge des filtrierten Virusüberstandes (MOI 10) zu den Zellen gegeben. Danach wurde die Platte für 1 h bei Raumtemperatur und $1000 \times g$ zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 1 mL frisches Medium auf die Zellen gegeben. Abschließend wurden die Zellen nach der Infektion gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression des Zielgens und auch des Reportergens untersucht. Als Kontrolle wurden CHO Zellen mit einem Kontroll-LEGO-Vektor, der lediglich das Reportergen mCherry enthielt, transduziert.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von Siglec-E-Ig

Transient transfizierte CHO-Zellen, welche das Fusionsmolekül Siglec-E-Ig in den Kulturüberstand sezernierten, wurden über fünf Tage in RPMI-Vollmedium, welches zuvor IgG-depletiert wurde, kultiviert. Das Fusionsmolekül wurde mittels einer HiTrap Protein G Säule (*GE Healthcare*) durch die Bindung des Ig-Teils affinitätschromatografisch aufgereinigt. Anschließend wurde die proteinhaltige Lösung zweimal für vier Stunden dialysiert. Bei zu geringer Proteinkonzentration erfolgte eine Aufkonzentrierung mittels einer Vivaspin Säule (*Sartorius*).

3.2.2 Messung der extrazellulären DNA NETs im Kulturüberstand

Für die Bestimmung der DNA-NETs im Zellkulturüberstand der PMNs wurde die Analyse mittels *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen)* gewählt. Mit dieser Methode lassen sich sehr geringe DNA-Konzentrationen (pg) bestimmen. PMNs wurden in 96-well-Platten ausgesät ($5 \cdot 10^4$ /well) und für 1, 6 oder 16 Stunden mit PMA (100 nM) stimuliert. Zusätzlich wurde einigen Proben anti-Siglec-E (5 µg/well) hinzugefügt. Die Zellkulturüberstände der PMA stimulierten und unstimulierten PMNs wurden nach Angaben des Herstellers mit der *dsDNA pico green* Lösung in einer schwarzen 96-well-Platte verdünnt und anschließend die Fluoreszenz mit Hilfe des Mikroplatten-Lesers (*TECAN*) gemessen. An Hand einer DNA-Standardkurve wurde die Konzentration der dsDNA in den einzelnen Proben in Excel bestimmt. Als positive Kontrolle wurden PMNs mit Triton-X 100 (0.02%) lysiert, so dass die Zellkern-DNA im Zellkulturüberstand vorhanden war.

3.2.3 Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Das Prinzip der Cytometric Bead Array-Analyse basiert auf der spezifischen Immobilisierung des Zytokins auf Beads, die mit einem für das Zytokin spezifischen Antikörper beschichtet sind. Nach Inkubation mit einem zweiten zytokinspezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörper kann die Menge des immobilisierten Zytokins auf den Beads durch Messung der Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert werden. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Messung mit Ansätzen bekannter Zytokinkonzentration verglichen und quantifiziert. Dadurch, dass Beadpopulationen unterschiedlicher Zytokinspezifität durchflusszytometrisch abgegrenzt werden können, kann der Nachweis unterschiedlicher Zytokine gleichzeitig in einem Ansatz

durchgeführt werden. Durch die Verwendung eines *CBA Flex Sets* konnten die zu analysierenden Zytokine frei kombiniert werden, so dass in dieser Arbeit drei Zytokine (IL-12, IL-6 und TNF- α) gleichzeitig gemessen wurden. Die Verwendung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (*BD Bioscience*). Die anschließende Analyse erfolgte mittels der *FCAP Array* Software bzw. einer Excel-Auswertung.

3.2.4 NO-Bestimmung aus BMDM Zellkulturüberständen (Griess-Assay)

Die Zellkulturüberstände von *T. cruzi* infizierten BMDCs wurden nach 72 h sterilfiltriert und anschließend die NO-Produktion durch die Verwendung des Griess-Assays bestimmt. NO entsteht bei der Oxidation von Stickstoffmolekülen und hat nur eine sehr kurze Halbwertszeit. In der Gegenwart von Wasser und Sauerstoff reagiert NO mit sich selbst und bildet Nitrat (NO₂). Nitrat kann mit dem Griess-Reagenz nachgewiesen werden und stellt somit einen quantitativen Marker der NO-Produktion dar.

Die Proben wurden mit PBS verdünnt (1:2) oder konzentriert eingesetzt und jeweils in Triplikaten analysiert. Jeweils 100 μ L der Probe wurden in einer Mikrotiter-Flachbodenplatte vorgelegt und mit 100 μ L der gleichteiligen Griess-Lösung (Griess 1 und Griess 2) gemischt. Der Farbumschlag wurde bei 560 nm im ELISA-Reader bestimmt und mit einer Standardkurve verglichen. Die Proben des Standards (125 μ M-2 μ M), sowie die negativ Kontrolle (nur PBS), wurden in PBS verdünnt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Eukaryotische Zellen wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter der Sterilbank ausgeführt. Dabei verwendete Glasgeräte wurden 3 Stunden bei 180°C sterilisiert. Lösungen wurden 20 Minuten bei 135°C und 2.2 bar autoklaviert. Die Zentrifugation eukaryotischer Zellen erfolgte für 7 Minuten bei 4°C und 1200 rpm in der 5810R *Eppendorf* Zentrifuge.

3.3.2 Zellzählung

Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (0.1 \times 0.0025 mm²) bestimmt. Hierfür wurden 10 μ L der Zellsuspension 1:1 mit 10 μ L der Trypanblau-Lösung versetzt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ausgezählt. Da dieser Farbstoff nur die toten Zellen blau anfärbt, konnte zwischen toten und lebenden Zellen eindeutig unterschieden werden.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung können eukaryotische Zellen unter Zugabe von DMSO über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Zum Einfrieren wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen pelletiert, in 1 mL vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und im Einfrierbehälter *Mr. Frosty* (*Nalgene*[®]) zunächst für 24 Stunden bei -70°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen war zu beachten, dass das toxische DMSO schnell quantitativ entfernt wurde. Die Zellen wurden in 10 mL Medium aufgenommen und zweimal gewaschen, bevor sie kultiviert oder für ein Experiment verwendet wurden.

3.3.4 Kultur von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden mit Vollmedium (RPMI oder IMDM) in 6-well-Gewebekulturplatten bzw. kleinen Gewebekulturflaschen kultiviert. Sie wurden je nach Zellwachstum zwei- bis dreimal in der Woche verdünnt.

3.3.5 Überexpression von Siglec-E-Ig in CHO Zellen

Ein Siglec-E-Ig enthaltendes Plasmid (*pcDNA3.1+*) wurde von Hanna Erdmann in ihrer Dissertation angefertigt und zum Herstellen des Siglec-E-Ig-Fusionsmoleküls zur Verfügung gestellt [73]. CHO Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen kultiviert. Das 10% FCS-haltige Kulturmedium wurde vor der Transfektion IgG-depletiert, um eine Verunreinigung bei der anschließenden Aufreinigung von Siglec-E-Ig zu vermeiden. Die Transfektion erfolgte mit dem *Turbofect*-Reagenz (*MBI Fermentas*), dies ist ein Transfektionsreagenz, das kationische Polymere mit der DNA bildet, welche von Zellen endozytiert werden. Die hohe Ladung der Polymere führt zum Aufbrechen der Endosomen, so dass die DNA-Polymere in den Zellkern migrieren können.

Für die Transfektion wurden in einem sterilen Falcon jeweils 7.5 mL Medium mit 110 μL *Turbofect* und 75 μg DNA gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 7.5 mL des Transfektionsgemisches tropfenweise zu den Zellen zugegeben. Nach 5 Tagen wurde der Siglec-E-Ig enthaltende Zellkulturüberstand für die Aufreinigung des Siglec-E-Ig Fusionsmoleküls verwendet.

3.3.6 Generierung von DCs und Makrophagen aus dem Knochenmark (KM)

Zur Generierung von DCs und Makrophagen aus dem Knochenmark (KM) wurden die Unterschenkelknochen (Tibia) einer Maus steril entnommen. Anschließend wurden sie in 70% Isopropanol desinfiziert und getrocknet. Beide Enden der Knochen wurden mit

einer sterilen Schere abgeschnitten und mit Hilfe einer feinen Kanüle das KM heraus gespült. Die gewonnenen KM-Zellen wurden in Medium resuspendiert und bei 1200 rpm für 8 Minuten abzentrifugiert.

Zur Generierung von DCs wurden die Zellen in Vollmedium mit 10% GM-CSF aufgenommen ($4 \cdot 10^6$ Zellen/mL) und 10 mL Vollmedium in eine beschichtete Petrischale gegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit einem 5%igem CO₂-Gehalt. Am Tag 3 und 6 wurden 10 mL frisches Vollmedium und 1 mL GM-CSF hinzugegeben. Am Tag 7 oder 9 wurden die DCs für Experimente verwendet oder zur Konservierung in Stickstoff aufbewahrt.

Zur Generierung von Makrophagen wurden die Zellen in IMDM-Medium mit 10% FCS, 30% L929-Überstand und 5% Pferdeserum aufgenommen und in 6-well Zellkulturplatten überführt ($5 \cdot 10^5$ Zellen/well). Die Zellen wurden im Brutschrank mit 10%igem CO₂-Gehalt kultiviert und alle 2 bis 3 Tage jeweils 2 mL IMDM-Medium mit 10% FCS, 30% L929-Überstand und 5% Pferdeserum hinzugegeben. Am Tag 11 oder 12 wurden die Makrophagen für Experimente verwendet oder zur Konservierung in Stickstoff gelagert.

3.3.7 Präparation der Milz

Die Milz von sieben bis zehn Wochen alten Mäusen wurde unter der Sterilbank entnommen. Anschließend wurde die Milz mit Erythrozyten-Lysepuffer gespült, die Milzzellen isoliert und die Erythrozyten in der hypotonen Lösung entfernt. Die isolierten Milzzellen wurden in 10 mL Vollmedium aufgenommen und einmal gewaschen, anschließend gezählt und für verschiedene Analysen eingesetzt.

3.3.8 Durchflusszytometrie

Mithilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS) können Zellen charakterisiert und voneinander getrennt werden. Die Zellen fließen einzeln an einem Fotodetektor vorbei und dabei werden die Zellgröße, die Granuladichte und die Fluoreszenz von gebundenen fluoreszierenden Antikörpern gemessen. Die Messdaten wurden mit der Software *FlowJo* (Version 7.5.6 für Windows) ausgewertet.

Charakterisierung von Zellen:

$2 \cdot 10^5$ Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen pelletiert und unter Zugabe des primären Antikörpers für 30-45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer, wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper weitere

30-45 Minuten auf Eis, im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 250 μ L 1% PBS/PFA fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Charakterisierung von Trypomastigoten:

Das Siglec-E-Ig Fusionsmolekül oder das biotinylierte Lektin Mal II wurden mit entsprechenden Sekundärantikörpern (0.5 μ g anti-human IgG-PE bzw. 0.2 μ g anti-Streptavidin-APC) für 45 min bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurden $2 \cdot 10^5$ Trypomastigote pelletiert und mit dem Komplex aus Sekundärantikörper und Siglec-E-Ig Fusionsprotein (2 μ g/Färbung) oder dem biotinylierten Lektin Mal II (1 μ g/Färbung) eine Stunde bei 4°C oder auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Trypomastigote in 200 μ l 2% PFA fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Falls die Trypomastigote aus dem Blut infizierter Mäuse isoliert wurden, erfolgte zusätzlich eine Färbung mit anti-Ter119 (1:50), um die Erythrozyten von den Trypomastigoten abgrenzen zu können.

3.3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie lassen sich Moleküle in Zellen über fluoreszenzmarkierte Antikörper mikroskopisch nachweisen. Über den Farbstoff Dapi, welcher eine spezifische Bindung mit der DNA eingeht, lassen sich die Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen. Die Verwendung von Phalloidin ermöglicht eine Färbung des Zytoskeletts, um die Struktur der Zellen darzustellen.

Für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse wurden Zellen in Chamberslides ausgesät ($1 \cdot 2 \cdot 10^5$ Zellen/well) und nach ca. 3-4 Stunden für z.B. Infektionsexperimente verwendet. Die Färbung erfolgte nach einer 30-minütigen Fixierung mit 2-4% PFA haltiger PBS-Lösung. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zusätzlich mit einer 0.1% Triton-X-Lösung permeabilisiert. Nach der Färbung wurden die Objektträger von den Kammern getrennt und mit einem Tropfen des Einbettmediums ein Deckgläschen aufgelegt. Nach Trocknen im Dunkeln über Nacht erfolgte die Analyse am Fluoreszenzmikroskop.

Verwendung von Farbstoffen und Antikörpern in den einzelnen Experimenten:

CHO *T. cruzi* Infektion: Dapi (1:2000), Kaninchen-anti-Siglec-E (1:200), anti-Kaninchen-Alexa488 (1:500)

BMDCs und BMDMs *T. cruzi* Infektion: Dapi (1:2000), Phalloidin red (1:300), anti-*T. cruzi* Serum (Kaninchen) (1:300), anti-Kaninchen-Alexa488 (1:500)

Lyosomenfärbung: anti-Lamp-1 (1:300), anti-Ratte-Alexa488 (1:1000)

3.3.10 Präparation und Aufreinigung von PMNs (aus Blut, Milz oder KM)

Die Entnahme der KM-Zellen erfolgte wie unter 3.3.6 beschrieben. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der PMNs mittels magnetischer Zellseparation oder einer Gradientenzentrifugation.

Magnetische Zellseparation (MACS):

Durch die Verwendung von anti-Ly6G-gekoppelten magnetischen Beads können PMNs mittels einer positiven Selektion aufgereinigt werden. Die PMNs wurden nach der magnetischen Zellseparation in PBS (1 mM EDTA) oder Medium aufgenommen und die Reinheit der Zellpopulation durchflusszytometrisch überprüft.

Gradientenzentrifugation:

Für die Aufreinigung von PMNs mittels Gradientenzentrifugation wurden 3 mL Histopaque 1077 RT Lösung in ein 15 mL Falcon überführt und mit der KM-Zellen enthaltenden Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 30-45 min, RT, ohne Bremse) zur Auftrennung der Zellen im Dichtegradienten. Die PMNs befanden sich danach im Zellpellet, dahingegen waren andere KM-Zellen zwischen den zwei Flüssigkeitsphasen zu finden. Das PMNs-haltige Pellet wurde je nach Bedarf in Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgenommen, falls noch viele Erythrozyten vorhanden waren. Anschließend wurde die Reinheit der PMNs durchflusszytometrisch überprüft.

3.3.11 Mikroskopische Analyse der NET-Produktion von PMNs

Die von PMNs produzierten DNA-NETs wurden mit Hilfe von Dapi bzw. einem extrazellulären DNA-Marker (*SYTOX orange*, *Molecular Probes®*, *Invitrogen*) für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse angefärbt.

Stimulation von PMNs zur NET-Produktion:

PMNs aus dem Blut oder der Milz wurden in RPMI-Medium in Chamberslides ausgesät ($1 \cdot 10^4$ /well) und mit verschiedenen TLR-Agonisten bzw. mit PMA für vier Stunden stimuliert. Für die Stimulation wurden verschiedene Konzentrationen der Agenzien eingesetzt: PamCys (1 µg/mL), LPS (100 ng/mL), PMA (100 nM). Nach der Stimulation wurden die Zellen mit einer 2%igen PFA-Lösung fixiert, mit DNA-Farbstoffen (Dapi (1:2000), Sytox orange (0.2 µM)) gefärbt und für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse verwendet.

Inkubation von PMNs mit *T. cruzi* Tulahuen:

PMNs wurden mit vitalen Trypomastigoten für vier Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fixierung (4% PFA) und die Färbung mit Dapi. Die Zellkerne der PMNs, sowie die Zellkerne und Kinetoplasten der Trypanosomen wurden angefärbt, um eine Kolokalisation von NETs und *T. cruzi* zu analysieren.

Inkubation vom PMNs mit dem anti-Siglec-E Antikörper:

Aus dem KM isolierte PMNs, welche über eine Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen wurden, wurden mit PMA (100 nM) und anti-Siglec-E (5 µg/ well) für 4, 8 und 16 Stunden stimuliert. Die Zugabe des anti-Siglec-E-Antikörpers erfolgte eine Stunde vor der Stimulation mit PMA. Anschließend wurden die Proben fixiert (2% PFA) mit Dapi und Sytox orange gefärbt und die Anzahl der NETs durch Auszählung von mindestens 10 zufällig ausgewählten Aufnahmen bestimmt.

3.3.12 Messung der ROS Produktion

Die Produktion von ROS lässt sich im Durchflusszytometer durch die Verwendung von Dihydrorhodamin 123 (DHR) analysieren. Das nicht fluoreszierende DHR wird durch ROS zu dem fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert, was mit einer Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in FL-1 einhergeht. Somit konnte die ROS Produktion von PMNs nach einer Stimulation und unter dem Einfluss eines anti-Siglec-E Antikörpers bestimmt werden.

ROS Produktion unter Einfluss von anti-Siglec-E:

PMNs wurden aus dem KM isoliert und für 1 h mit PMA (100-500 nM) stimuliert. Zusätzlich wurde ein Ansatz vorher für 30 Minuten mit dem anti-Siglec-E Antikörper (5 µg/Ansatz) inkubiert. 30 Minuten nach der Zugabe von PMA wurden 25 µL der verdünnten DHR-Lösung (30 µg/mL), sowie ein APC-markierter anti-Gr-1 Antikörper hinzugefügt. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte ein Fixierungsschritt (2% PFA) und die durchflusszytometrische Analyse.

ROS Produktion unter Einfluss von anti-Siglec-E und *T. cruzi* Tulahuen:

Zusätzlich zu der oben beschriebenen PMA (500 nM) Stimulation und Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers erfolgte die einstündige Inkubation mit *T. cruzi* Tulahuen aus der Hg 39 Zellkultur. Anschließend wurde der Umsatz von DHR im Durchflusszytometer analysiert.

ROS Produktion von PMNs aus *T. cruzi* Tulahuen infiziertem Blut:

Aus der Schwanzvene einer *T. cruzi* infizierten und einer nicht infizierten C57BL/6 Maus wurde Blut entnommen und die im Blut enthaltenen PMNs, wie oben beschrieben, mit PMA (500 nM) stimuliert und anschließend mit der DHR-Lösung sowie einem anti-Gr-1 Antikörper inkubiert. Die MFI von DHR wurde in der Gr-1⁺ Zellpopulation bestimmt.

3.3.13 *T. cruzi* Tulahuen Infektion von CHO und CHO-Siglec-E Zellen

CHO Zellen wurden mit einem für Siglec-E kodierenden LEGO-Vektor transduziert und anschließend mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes infiziert. Die CHO Zellen und die CHO-Siglec-E Zellen wurden 72 h nach der *T. cruzi* Infektion mit einem anti-Siglec-E Antikörper und einem anti-Ratte-Alexa488 Antikörper gefärbt, anschließend fixiert und zusätzlich mit Dapi gefärbt.

3.3.14 Auszählung der Parasitenanzahl der *in vitro* Infektionsexperimente

BMDCs oder BMDMs wurden in 4-well Chamberslides ausgesät ($1-2 \cdot 10^5$ /well) und nach ca. 3-4 Stunden unter Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers (5 µg/well) oder des Kontroll-Antikörpers (5 µg/well) für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion mit *T. cruzi* Brazil oder *T. cruzi* Tulahuen ($1-2 \cdot 10^5$ /well). Die Proben wurden nach 24, 48 oder 72 h mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und anschließend mit Dapi, Phalloidin red und einem anti-*T. cruzi* Serum gefärbt. Es wurden jeweils 10-15 zufällig ausgewählte Aufnahmen der infizierten Zellen angefertigt, welche anschließend am Computer ausgezählt wurden. Hierbei wurden einerseits die Infektionsrate und andererseits die Anzahl der Amastigoten pro Zelle bestimmt.

3.3.15 Darstellung der Lysosomenrekrutierung in einer *T. cruzi* Brazil Infektion

BMDCs wurden in 4-well Chamberslides ausgesät ($1-2 \cdot 10^5$ /well) und nach ca. 3-4 Stunden unter Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers (5 µg/well) oder des Kontroll-Antikörpers (5 µg/well) für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion mit *T. cruzi* Brazil ($1-2 \cdot 10^5$ /well). Nach 24 h wurden die Proben mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und anschließend mit Dapi, Phalloidin red und einem anti-Lamp-1 Antikörper sowie einem anti-Ratte-Alexa488 Antikörper gefärbt. Es wurden jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählte Aufnahmen der infizierten Zellen angefertigt und die Lokalisierung der Parasiten und Lamp-1 bestimmt. Hierbei wurde zwischen Parasiten, die mit Lamp-1 assoziiert waren und Parasiten, die nicht mit Lamp-1 kolokalisierten unterschieden.

3.4 Parasiten und Infektionsmodell

3.4.1 *T. cruzi* Stammerhaltung

Die verschiedenen *T. cruzi* Stämme wurden alle 12-18 Tage in C57BL/6 Mäusen *in vivo* passagiert. Hierfür wurden infizierte Mäuse mit Isofluran (*Baxter*) narkotisiert und durch Herzpunktion mit einer Heparin-vorbehandelten Spritze das Blut entnommen. Es erfolgte die Bestimmung der Parasitenanzahl in einer Neubauer-Zählkammer ($0.02 \times 0.0025 \text{ mm}^2$). Die Konzentration wurde mit sterilem PBS auf $5 \cdot 10^5$ Parasiten/mL eingestellt. Die Infektion von nicht-infizierten C57BL/6 Mäusen erfolgte intraperitoneal (i.p.) mit 100-200 μL der Trypanosomen-Lösung ($5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ Parasiten).

3.4.2 *T. cruzi* Zellkultur

Für die *in vitro* Kultivierung von *T. cruzi* wurden Hg 39 Zellen in IMDM Medium mit 10% FCS-Gehalt in kleinen Zellkulturflaschen mit Trypomastigoten infiziert. 1-2 Tage nach der Infektion wurden die Zellen gewaschen, so dass extrazelluläre Parasiten entfernt wurden. Nach ca. 4-5 Tagen ist die intrazelluläre Vermehrung von *T. cruzi* vollzogen und die neugebildeten Trypomastigoten wurden aus dem Zellkulturüberstand für die Infektion neuer Hg 39 Zellen eingesetzt. Hierfür wurden 500 μL -2 mL je nach Anzahl der Parasiten verwendet.

Zusätzlich zu dieser Standard-*in vitro*-Kultur wurden verschiedene Parameter zur Analyse der Sialylierungsbedingungen verändert:

Medium: IMDM oder RPMI, FCS-Gehalt: 5-10%, Medium-Zusatz: Natriumpyruvat, nicht-essentielle Aminosäuren, Zelltypen: L929 (murine Fibroblasten), BMDCs

3.4.3 Laktose-Behandlung von *T. cruzi*

Für die Desialylierung durch eine Laktose-Behandlung wurden Trypomastigote, welche aus einer Rag-1-defizienten Maus isoliert wurden, dreimal mit einer 10 mM Laktose-Lösung gewaschen, bevor sie für die *in vitro* Infektion von BMDCs eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde dem Infektionsansatz 10 mM Laktose zugefügt, um eine Desialylierung während der gesamten Infektionszeit zu ermöglichen.

3.4.4 Parasitämiebestimmung

Die Parasitämien einer *T. cruzi* Infektion wurden ab Tag 6 alle drei Tage bestimmt. Hierfür wurde Blut durch eine Schwanzvenenpunktion gewonnen, in einem Verhältnis von 1:10 mit Erythrozyten-Lyse-Puffer verdünnt und anschließend durch die

Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ($0.02 \times 0.0025 \text{ mm}^2$) die Parasitenanzahl bestimmt. Berechnung: $x/4 \cdot 10$ (Verdünnungsfaktor) $\cdot 5 \cdot 10^4$ Parasiten/mL

3.4.5 Gr-1 Depletion in der *T. cruzi* Infektion

300 μg eines anti-Gr-1 Antikörpers (Klon RB6-8C5) wurden C57BL/6 Mäusen i.p. injiziert, um die PMNs einen Tag vor der *T. cruzi* Infektion zu depletieren. Die Depletion der Gr-1⁺ Zellen wurde nach 24 h durchflusszytometrisch überprüft. Jeweils sechs Gr-1-depletierte und Kontroll-Mäuse (Weibchen) wurden anschließend mit *T. cruzi* Tulahuen ($1 \cdot 10^4$ Parasiten/Maus) i.p. infiziert. Der Verlauf der Parasitämie, das Gewicht und das Überleben der Mäuse wurden über 21 Tage analysiert und zwischen den Versuchsgruppen verglichen.

3.4.6 Vergleich der *T. cruzi* Infektion von Wildtyp und MPO-defizienten Mäusen

Jeweils sechs Wildtyp und MPO-defiziente Mäuse (Weibchen) wurden mit *T. cruzi* Tulahuen ($2 \cdot 10^4$ Parasiten/Maus) i.p. infiziert. Im Verlauf der Infektion wurde die Parasitämie, das Gewicht und das Überleben der Mäuse über 18 Tage analysiert und verglichen.

3.4.7 Infektion mit *T. cruzi* Tulahuen aus der Zellkultur (Hg 39 und BMDC)

Jeweils fünf C57BL/6 Mäuse (Männchen) wurden mit *T. cruzi* Tulahuen ($1 \cdot 10^5$ Parasiten/Maus) i.p. infiziert. Hierfür wurden einerseits Trypomastigote aus der Hg 39 Kultur oder aus der BMDC Kultur gewählt. Im Verlauf der Infektion wurde die Parasitämie, das Gewicht und das Überleben der Mäuse über 14 Tage analysiert und verglichen.

3.5 Statistische Analysen

Für statistische Auswertungen wurden entweder *Students-t-Tests* oder *Two-way-ANOVA Tests* mit der Graph Pad Prism Software (Graph Pad Prism Software, San Diego, CA) durchgeführt. Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet:

$p \leq 0.005$	***
$p \leq 0.01$	**
$p \leq 0.05$	*
$p > 0.05$	ns (nicht signifikant)

Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in den jeweiligen Bildunterschriften der Abbildungen angegeben.

4 Ergebnisse

Die immunmodulatorische Funktion von Siglec-E sollte im Zusammenhang mit einer *T. cruzi* Infektion analysiert werden. Daher wurde zunächst die Sialylierung von *T. cruzi* analysiert, um einen Zusammenhang mit der Regulation über die Bindung an Siglec-E und der Pathogenität der *T. cruzi* Stämme herstellen zu können. Anschließend wurde die Rolle der PMNs, die Siglec-E stark exprimieren, in einer *T. cruzi* Infektion untersucht. Desweiteren sollte die Funktion von Siglec-E auf APZ genauer analysiert werden. Hierfür wurden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Infektionen mit *T. cruzi* durchgeführt und die Ergebnisse durchflusszytometrisch oder immunfluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Die Experimente wurden mit Parasiten aus einer Hg 39 Zellkultur und mit Parasiten, die direkt aus dem murinen Blut isoliert wurden, durchgeführt.

4.1 Die Sialylierung von Trypanosomen ist sehr variabel

Zunächst wurde die Sialylierung von Trypanosomen analysiert. Die Aktivität der *Trans*-Sialidase (TS) und somit die Sialylierung der Parasitenoberfläche wird mit der Pathogenität verschiedener *T. cruzi* Stämme assoziiert. Da die TS ein Enzym ist, das bidirektional Sialinsäuren auf die *T. cruzi*-Oberfläche oder auf andere Akzeptorstrukturen übertragen kann, ist zu erwarten, dass während der Kultivierung von Trypanosomen Varianzen der Sialylierungsmuster auftreten können. Daher wurde im Folgenden untersucht, welche Unterschiede Trypanosomen im Sialylierungsgrad aufweisen, wenn diese auf Fibroblasten Zelllinien kultiviert oder direkt aus dem Blut infizierter Mäuse isoliert wurden.

4.1.1 Das Lektin Mal II bindet an *T. cruzi* aus murinem Blut

Um die Sialylierung von *T. cruzi* zu untersuchen, wurden Trypanosomen aus dem Überstand einer Hg 39 Zellkultur und Trypanosomen, die aus dem Blut (Serum) infizierter Mäuse isoliert wurden, mit einem Lektin (Mal II) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Eine Bindung von Mal II, ein Lektin welches α -2,3- verknüpfte Sialinsäuren erkennt, zeigt, dass die Parasitenoberfläche sialyliert ist. Bindet das Lektin nicht, spricht dies für Trypanosomen, die nicht sialyliert sind.

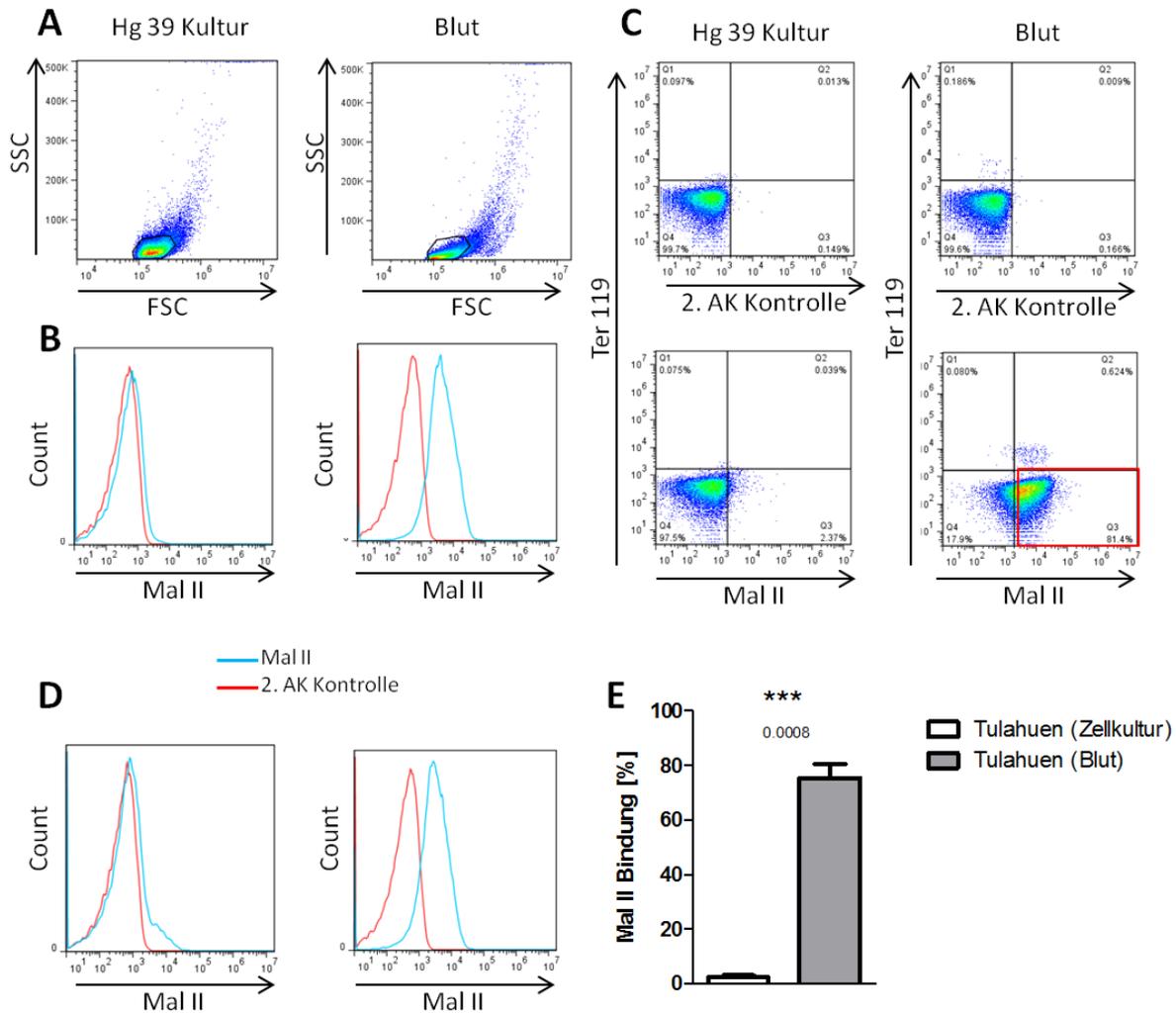


Abb. 8: Sialylierung von *T. cruzi* aus der Zellkultur oder Blut infizierter Mäuse

Mit Hilfe von einem Lektin (Mal II), welches α -2,3 verknüpfte Sialinsäuren erkennt, wurde die Sialylierung von Trypanosomen durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Stämme (Brazil (A, B und C) und Tulahuen (D und E)) untersucht. Die Trypanosomen wurden einerseits aus Hg 39 Zellkultur Überständen oder andererseits aus dem Serum von infizierten Mäusen gewonnen. Die Färbung erfolgte mit einem biotinylierten Lektin (Mal-II), das mit einem APC-gekoppelten Streptavidin-Antikörper vorkomplexiert wurde; zur Kontrolle diente eine Färbung mit dem Sekundär-Antikörper. **A:** Die Population der Trypanosomen wurde an Hand der Kulturparasiten (links) festgelegt, um andere Zellen des Bluts bei den Serumproben (rechts) auszuschließen. **B:** Im Histogramm ist dargestellt, dass nur Trypanosomen, die aus dem Blut isoliert wurden, eine Mal II Bindung und somit eine Sialylierung aufweisen. **C:** Die Bindung von Trypanosomen (Brazil) ist beispielhaft auch als Dot Plot dargestellt. Nur die Parasiten aus dem Blut zeigen eine Verschiebung nach rechts und somit eine Bindung an das Lektin Mal II (rote Umrandung). Erythrozyten wurden mittels Färbung von Ter119 ausgeschlossen. **D:** Histogramm zur Darstellung der Mal II Bindung von Trypanosomen (Tulahuen) aus der Hg 39 Kultur (links) und aus Serum (rechts) infizierter Mäuse. **E:** Vergleich der Sialylierungsraten von *T. cruzi* Tulahuen aus der Zellkultur und aus dem Blut infizierter Mäuse von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *Students-t-test*: *** $p \leq 0.005$

In Abb. 8 ist dargestellt, dass Trypanosomen, die aus infiziertem Blut isoliert wurden, eine starke Bindung des Lektins Mal II aufweisen. Die zwei analysierten *T. cruzi* Stämme Brazil (Abb. 8 A-C) und Tulahuen (Abb. 8 D-E) zeigen vergleichbare Ergebnisse. Die aus Zellkulturüberständen isolierten Parasiten sind nicht stabil sialyliert und binden somit nicht an Mal II, dahingegen sind die Parasitenisolate aus infizierten Mäusen durchaus sialyliert und binden an das Lektin. Um auszuschließen, dass andere Bestandteile des Blutes (z.B. Erythrozyten) an das Lektin binden, wurden die Proben aus dem Serum infizierter Mäuse zusätzlich mit einem anti-Ter 119 Antikörper (einem Erythrozyten-Marker) gefärbt. Zusätzlich wurden die Parasiten nach Größe und Granularität an Hand der Kulturparasiten bestimmt und somit andere Blutbestandteile ausgeschlossen (Abb. 8 C).

Interessanterweise wies *T. cruzi* Tulahuen aus der Hg 39 Kultur nur eine sehr schwache Bindung an das Lektin Mal II auf (Abb. 8 E). Dies spräche für Parasiten, die keine Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit auch keine Lektin Bindung aufweisen. Da in den vergangenen Jahren am Bernhard-Nocht-Institut mit Kulturparasiten dieses Stammes (*T. cruzi* Tulahuen) gearbeitet wurde und sie eine weitgehend konstante Sialylierung zeigen, sollte der aktuelle Zustand, der in Zellkultur passagierten Trypanosomen, weiterführend analysiert werden.

4.1.2 *T. cruzi* ist nach BMDC Kultur transient sialyliert

Um zu untersuchen, wie sich die Sialylierung von kultivierten Parasiten verhält, wurden Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur zur Infektion von BMDCs (*bone marrow derived dendritic cells*) verwendet. Anschließend wurden die aus der Infektion neu hervorgegangenen Trypomastigoten mit dem Lektin Mal II inkubiert und durchflusszytometrisch die Sialylierung analysiert.

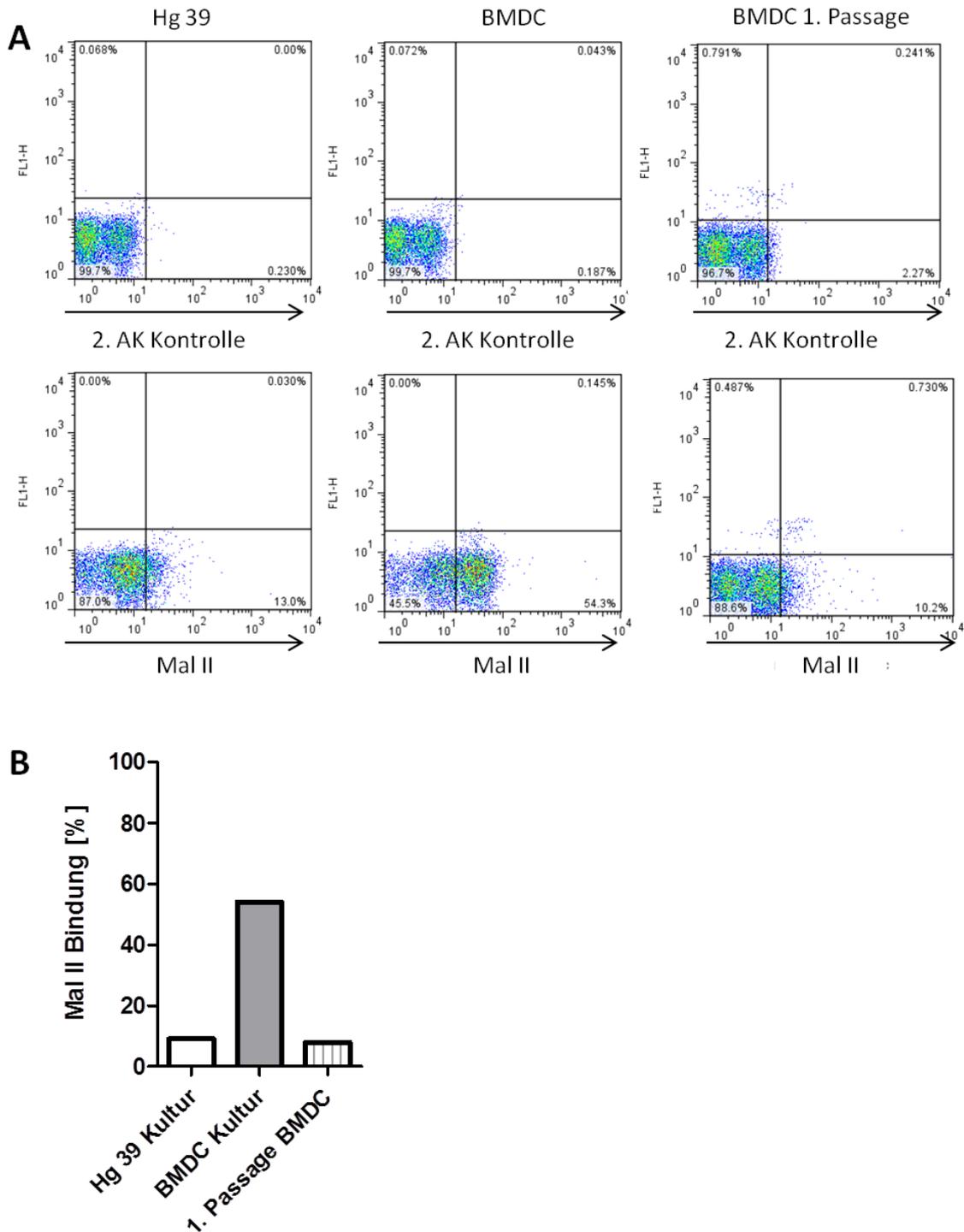


Abb. 9: Vergleich der Sialylierung von *T. cruzi* Tulahuen der Hg 39 und BMDC Kultur

Trypanosomen wurden aus dem Zellkulturüberstand von Hg 39 Zellen oder BMDCs isoliert und mit einem biotinylierten Lektin (Mal II), das α -2,3 verknüpfte Sialinsäuren erkennt, gefärbt. Dieses wurde mit einem APC-gekoppelten Strepavidin-Antikörper vorkomplexiert. Als Kontrolle diente die Färbung mit dem Sekundär-Antikörper. **A:** Die Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur (links) zeigen kaum eine Bindung an das Lektin, dahingegen ist bei den Trypanosomen aus der BMDC Kultur (mitte) eine deutliche Bindung an Mal II zu erkennen. Diese geht nach einer weiteren BMDC Zellpassage (rechts) wieder auf das ursprüngliche Niveau herunter. **B:** Grafische Darstellung der Sialylierung von Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur und der BMDC Kultur. Die Sialylierung nimmt nach einer weiteren BMDC Zellpassage ab. Dies ist eine beispielhafte Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 9 gezeigt ist, sind Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur in der Lage nach einer Passage durch BMDCs wieder ihre Oberfläche zu sialylieren. Dies zeigt, dass die Trans-Sialidase weiterhin aktiv ist. Die Sialylierung der Trypanosomen ist jedoch transient, da gezeigt werden konnte, dass nach einer weiteren Passage durch BMDCs die Sialylierung auf den ursprünglichen Wert abnimmt (Abb. 9 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Trans-Sialidase, trotz der Abwesenheit von Sialinsäuren auf Trypanosomen der Hg 39 Kultur, aktiv ist. Es wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet, um eine stabile Präsenz von Sialinsäuren auf der *T. cruzi* Oberfläche zu erlangen. Dafür wurden verschiedene Zelllinien Hg 39 (human) oder L929 (murin) gewählt, zudem wurden das Kulturmedium (RMPI, IMDM) und der FCS-Gehalt, sowie verschiedene Zusätze und Färbemethoden variiert. Die Veränderungen der Kulturbedingungen und auch das Verwenden neuer Parasitenstämme konnten eine stabile Sialylierung der Trypanosomen nicht wieder herstellen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Schwach sialylierte Kultur-Trypanosomen sind hoch infektiös

Da die Sialylierung von *T. cruzi* und die Aktivität der TS häufig in den Zusammenhang mit der Pathogenität von *T. cruzi* gebracht werden, sollte im weiteren Verlauf analysiert werden, ob nicht-sialylierte Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur in der Lage sind Mäuse zu infizieren und eine Parasitämie zu verursachen. Daher wurden Trypanosomen aus Hg 39 Zellkulturüberständen und Trypanosomen von BMDC Zellkulturüberständen isoliert, der Sialylierungsgrad durchflusszytometrisch untersucht, und anschließend C57BL/6 Mäuse mit diesen Parasiten infiziert.

Hierfür wurden für eine *T. cruzi* Infektion stärker suszeptible Männchen gewählt, um die Parasitämie besser analysieren zu können. Die Analyse mittels Mal II Bindung zeigte, dass nur die Trypanosomen aus der BMDC Kultur vor der Infektion sialyliert waren (siehe Vergleich der Mal II Bindung in Abb. 9, S. 48).

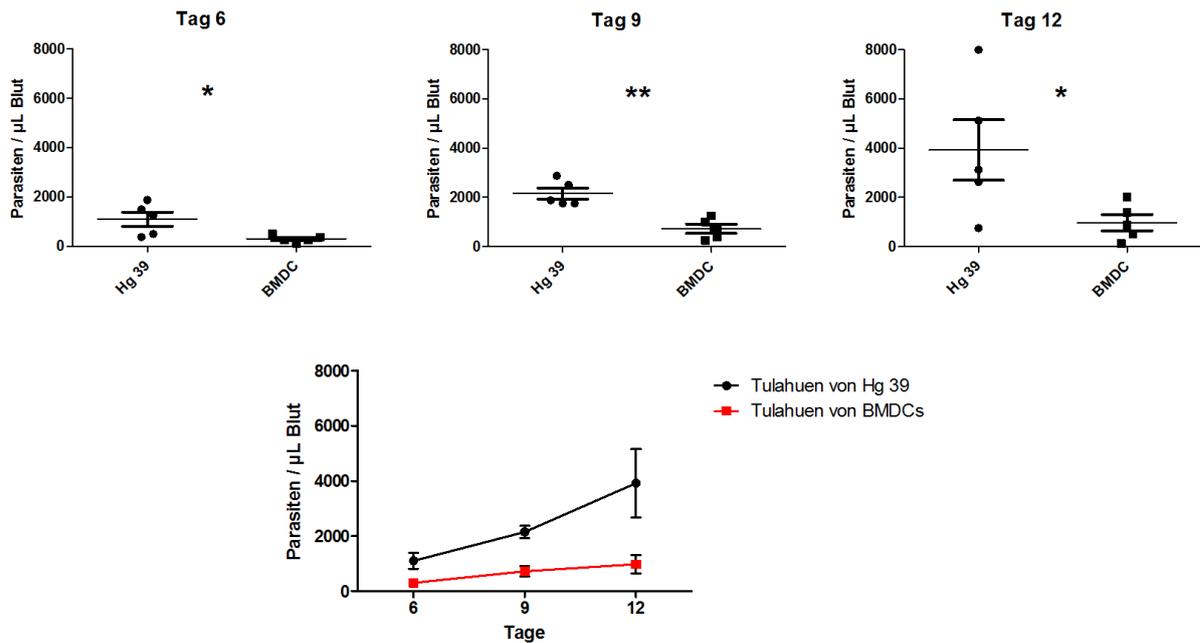


Abb. 10: *T. cruzi* Tulahuen Infektion von Wildtyp C57BL/6 Mäusen mit Kulturparasiten

Trypanosomen des Tulahuen Stammes aus der Hg 39 oder BMDCs Kultur wurden auf den Sialylierungsgrad durchflusszytometrisch überprüft. Diese Trypanosomen wurden anschließend für eine Infektion von Wildtyp C57BL/6 Männchen verwendet. Hierbei wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Trypomastigote pro Maus i.p. injiziert. Der Verlauf der Parasitämie wurde über 12 Tage analysiert. **A:** Darstellung der Parasitämie an den Tagen 6, 9 und 12. Die Parasitämie der Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur war signifikant erhöht. **B:** Vergleich der Parasitämie im Verlauf der Infektion mit Trypanosomen aus der Hg 39 oder BMDCs Kultur. Die Parasitämie der einzelnen Tage wurde mit dem *Students-t-test* statistisch ausgewertet: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Wie Abb. 10 zeigt, können schwach sialylierte Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur Mäuse infizieren und dies führt zu einer sehr hohen Parasitämie. Schon an Tag 6 war die Anzahl an Parasiten im Blut der Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur stark erhöht, was sich im Verlauf der Parasitämie fortsetzte. Die dahingegen sialylierten Trypanosomen der BMDC Kultur zeigten nur einen moderaten Anstieg der Parasitämie, welcher signifikant geringer war. Die weitere Analyse von Trypanosomen, welche aus einer mit Hg 39-Kultur-Parasiten infizierten Maus isoliert und durchflusszytometrisch untersucht wurden, zeigte, dass die vorher nicht oder nur schwach sialylierten Trypanosomen nach einer Mauspassage wieder sialyliert waren. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Sialylierung der in Kultur gehaltenen Parasiten hoch variabel ist und der nicht sialylierte Zustand, der Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur, nur transient ist. Sowie die Passage durch Immunzellen wie BMDCs als auch die Mauspassage zeigen, dass die TS der Trypanosomen generell aktiv ist und die Sialylierung der Parasiten bewirkt.

4.1.4 Kultur-Trypanosomen im argentinischen Labor binden an Siglec-E-Ig

Während einer DAAD geförderten Kollaboration mit einer argentinischen Arbeitsgruppe des *Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben"*, konnten mehrere *T. cruzi* Stämme verschiedener Pathogenität im argentinischen Labor analysiert werden. Hierzu wurden zunächst die Epimastigoten-Kulturen der Parasiten zur Infektion von VERO-Zellen genutzt. Da in einer Epimastigoten-Kultur, vereinzelt auch metazyklische Trypomastigote vorliegen, können Zellen aus einer Zellkultur infiziert werden. Nach einigen Zellpassagen und mehreren Waschschritten mit Mediumswechsel, konnten Trypomastigote der einzelnen *T. cruzi* Stämme gewonnen und für die durchflusszytometrische Analyse eingesetzt werden. Zudem wurden fünf verschiedene Stämme in Form von Cryostocks auf Trockeneis nach Deutschland transportiert und im Bernhard-Nocht-Institut kultiviert (unter anderem der oben erwähnte Brazil Stamm). Die Sialylierung der verschiedenen *T. cruzi* Stämme wurde mittels der Bindung an das Siglec-E-Ig-Fusionsmolekül überprüft. Dieses bindet schwächer als das hochaffine Lektin Mal II an sialylierte Strukturen. Hierfür wurden die einzelnen Trypanosomen mit dem Siglec-E-Ig-Fusionsmolekül inkubiert und mit Hilfe eines Fluoreszenz-markiertem Sekundär-Antikörper durchflusszytometrisch untersucht.

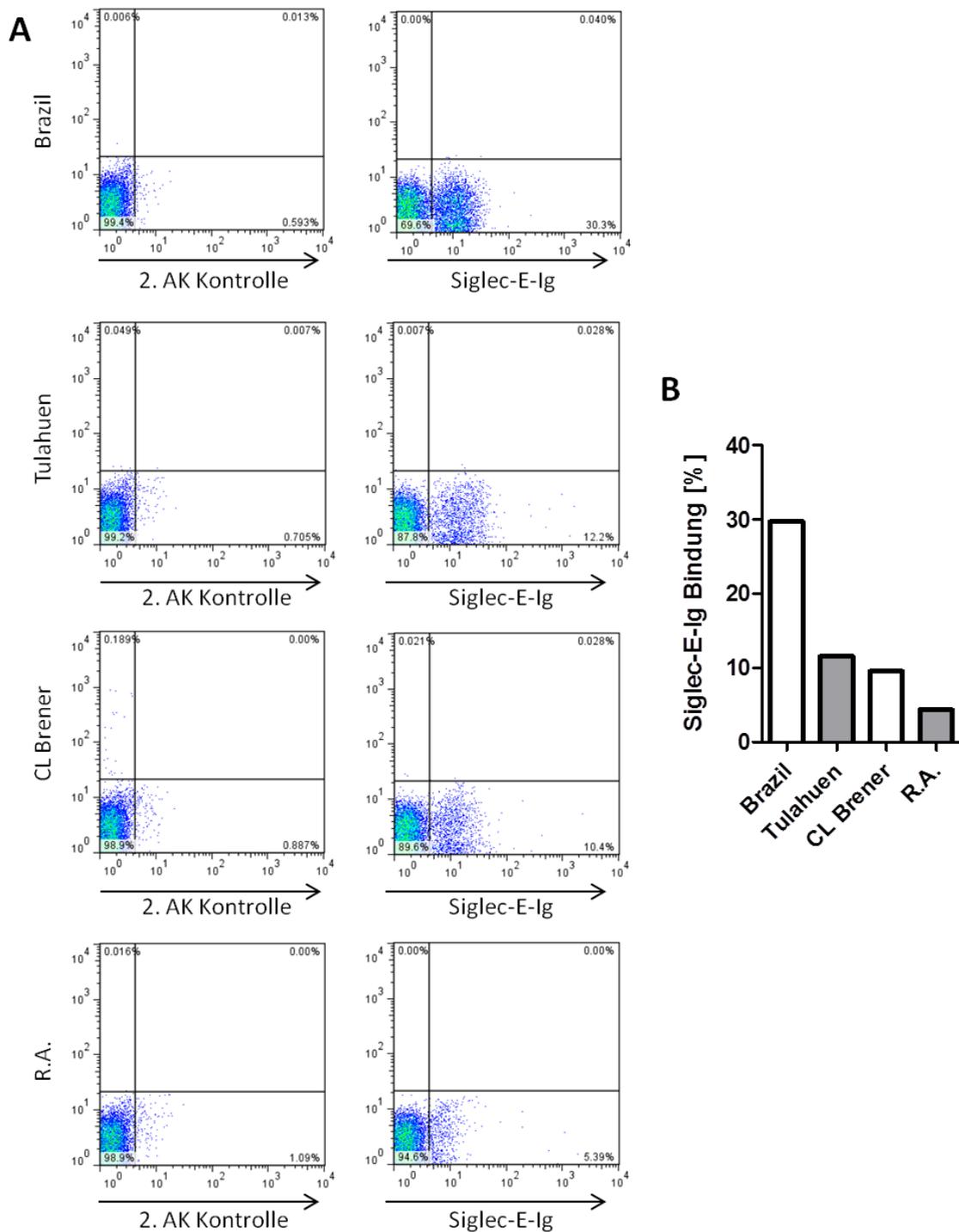


Abb. 11: Bindung verschiedener *T. cruzi* Stämme an Siglec-E-Ig

Verschiedene *T. cruzi* Stämme (Brazil, Tulahuen, CL Brener und R.A.) wurden auf VERO Zellen kultiviert und anschließend aus den Kulturüberständen isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Färbung erfolgte mit einem Siglec-E-Ig Fusionsmolekül, das mit einem PE-gekoppelten anti-human-IgG-Antikörper vorkomplexiert wurde; zur Kontrolle diente eine Färbung mit dem Sekundär-Antikörper. **A:** Darstellung der Bindung an Siglec-E-Ig der jeweiligen *T. cruzi* Stämme (Brazil, Tulahuen, CL Brener, R.A.). Links ist die Sekundär-Antikörper Kontrolle und rechts die Bindung an Siglec-E-Ig zu erkennen. **B:** Vergleich der Siglec-E-Ig Bindung zwischen den verschiedenen *T. cruzi* Stämmen.

Die in Abb. 11 dargestellte durchflusszytometrische Analyse der Trypanosomen aus der Zellkultur zeigte, dass diese Parasiten teilweise sialyliert waren. Ca. 30% der Trypanosomen des Brazil Stammes binden an Siglec-E-Ig. Auch der pathogene *T. cruzi* Tulahuen Stamm, welcher in vielen Experimenten dieser Arbeit verwendet wurde, zeigte eine Bindung an Siglec-E-Ig (Abb. 11 B). Dahingegen war die Bindung des nicht pathogenen R.A. Stammes gering. Aus zeitlichen Gründen und der mangelnden Arbeitsausstattung, konnte dieses Experiment nur einmal durchgeführt werden. Jedoch zeigt es, dass grundsätzlich eine Sialylierung von Trypanosomen aus einer Zellkultur möglich ist.

4.1.5 Die Siglec-E Expression von Zellen hat keinen Einfluss auf die Infektionsrate

Wie in einer vorhergegangenen Doktorarbeit [73] gezeigt werden konnte, ist eine Expression von Siglec-E auf Zellen für den Vorgang der Infektion durch Trypanosomen nicht nötig. Dass Siglec-E keinen direkten Einfluss auf die Infektionsrate hat, wurde in dem folgenden Experiment bestätigt. Für die Infektion mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes wurden CHO Zellen gewählt. Diese Hamster Zelllinie exprimiert kein Siglec-E und eignet sich gut für eine lentivirale Transduktion mit einem für Siglec-E kodierenden LEGO-Vektor. Die Transduktion von CHO Zellen mit diesem Vektor führt zu einer stabilen Expression von Siglec-E auf der Zelloberfläche. Zum Vergleich wurden CHO Zellen mit einem leeren LEGO-Vektor transduziert, der nur den Marker mCherry (rot fluoreszierend) enthält.

Nach erfolgreicher stabiler Transduktion von CHO Zellen mit entweder dem leeren Kontroll-Vektor (CHO-mCherry) oder dem für Siglec-E kodierenden Vektor (CHO-Siglec-E), wurden die Zellen mit Trypanosomen infiziert und die Infektionsrate Immunfluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

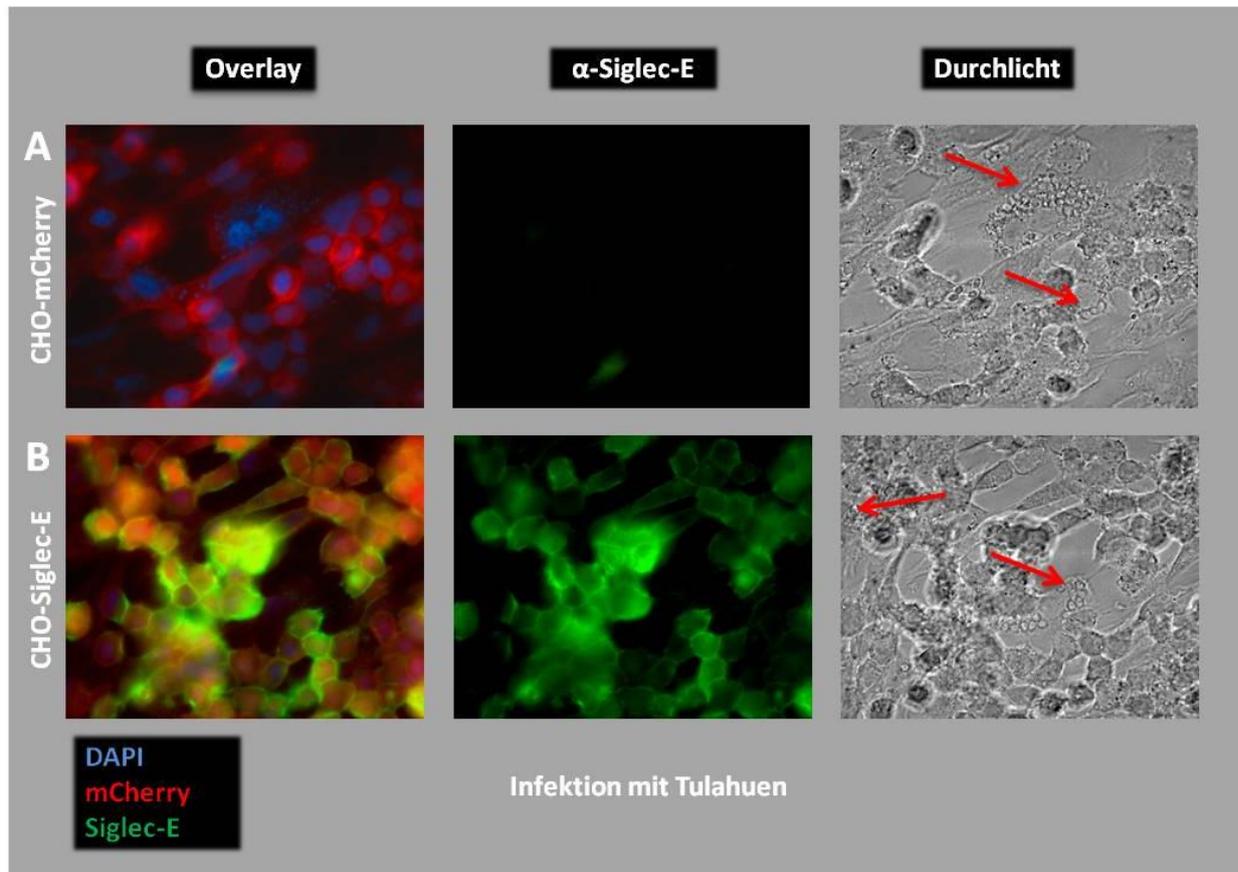


Abb. 12: Vergleich der *T. cruzi* Tulahuem Infektion von CHO Zellen und CHO-Siglec-E Zellen

CHO Zellen wurden mit einem für Siglec-E kodierenden LEGO-Vektor transduziert und anschließend mit Trypanosomen des Tulahuem Stammes infiziert. Die Proben wurden 72 h nach der *T. cruzi* Infektion mit einem anti-Siglec-E Antikörper (sowie einem Alexa 488-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper) gefärbt, anschließend fixiert und zusätzlich mit Dapi gefärbt. Als Kontrolle dienten CHO Zellen, die mit einem Kontroll-LEGO-Vektor, der lediglich das Reportergen mCherry enthielt, transduziert wurden.

A: Darstellung der Infektion von Kontroll-CHO-Lego-mCherry Zellen (Overlay, anti-Siglec-E Färbung und Durchlicht). **B:** Darstellung der Infektion von CHO-Siglec-E Zellen (Overlay, anti-Siglec-E Färbung und Durchlicht). Beide CHO Zelllinien zeigen infizierte Zellen, die im Durchlicht als Amastigote gut zu erkennen sind (rote Pfeile). Dies ist eine beispielhafte Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.

In Abb. 12 B ist gut zu erkennen, dass nur die mit dem für Siglec-E kodierenden LEGO-Vektor transduzierten CHO Zellen das mit einem grün fluoreszierenden Antikörper detektierte Siglec-E exprimieren; die Kontroll-Zellen dagegen keine grüne Fluoreszenz zeigen. Der Marker mCherry (rot) wird in beiden Zelllinien exprimiert und zeigt, dass beide Zelllinien erfolgreich mit dem LEGO-Vektor transduziert wurden. Es fällt auf, dass *T. cruzi* Infektion vergleichbar ist. Beide Zelllinien weisen infizierte Zellen auf, welche im Durchlicht als intrazelluläre Form (Amastigote) gut zu erkennen sind (Abb. 12 rechts). Dies zeigt, dass die *T. cruzi* Infektion nicht durch die Expression von Siglec-E auf den zu infizierenden Zellen verstärkt wird.

4.2 Siglec-E wird auf Neutrophilen (PMNs) hoch exprimiert

Zellen des angeborenen Immunsystems, die das murine Oberflächenmolekül Siglec-E exprimieren, sind PMNs, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs). Siglec-E ist auf PMNs am stärksten exprimiert [33].

Da die Wechselwirkungen von *T. cruzi* mit Siglec-E untersucht werden sollte, wurde zunächst die Expression von Siglec-E auf PMNs durchflusszytometrisch analysiert. Dies sollte das Vorhandensein von Siglec-E auf Gr-1 positiven Zellen überprüfen.

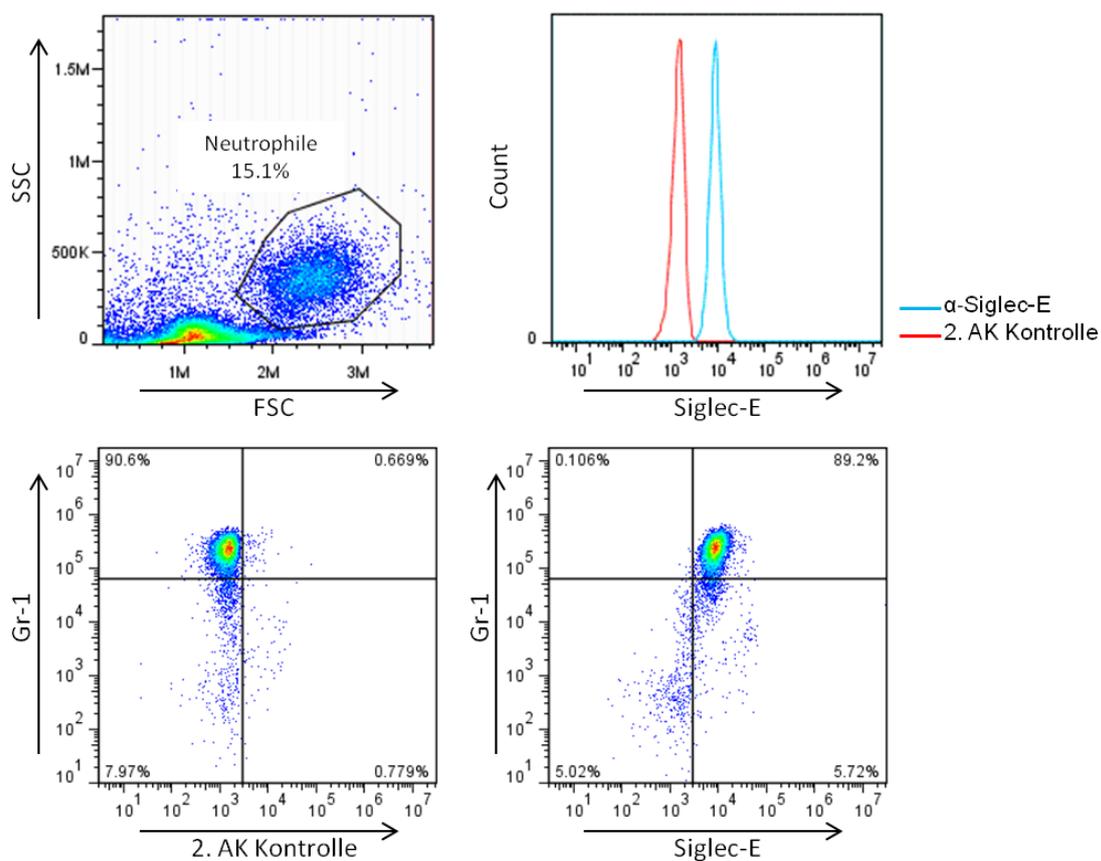


Abb. 13: Siglec-E Expression auf PMNs

Aus murinem Knochenmark wurden PMNs isoliert und mittels Gradientenzentrifugation angereichert (oben links). Diese wurden anschließend mit einem APC-gekoppelten anti-Gr-1 Antikörper und einem anti-Siglec-E Antikörper mit einem Alexa 488-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundär-Antikörpers gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Siglec-E Expression der Gr-1⁺ Zellen ist im Histogramm (oben rechts) dargestellt. Als Kontrolle diente eine Färbung, die nur den Sekundär-Antikörper enthielt (unten links). Die Gr-1⁺ Zellen zeigen eine starke Expression des Oberflächenmoleküls Siglec-E (unten rechts).

In Abb. 13 ist zu sehen, dass PMNs Siglec-E exprimieren. Die Färbung mit einem anti-Gr-1 Antikörper, einem Oberflächenmarker, der von PMNs stark exprimiert wird, zeigt, dass alle Zellen dieser Gr-1⁺ Zellpopulation Siglec-E exprimieren (unten rechts). Um auszuschließen, dass auch Monozyten, welche Gr-1 und Siglec-E exprimieren, dargestellt wurden, müsste ein weiterer Oberflächenmarker hinzugezogen werden.

Hiermit konnte verifiziert werden, dass PMNs sehr viel Siglec-E exprimieren und somit wurde zunächst die Rolle dieser Zellpopulation im Verlauf der *T. cruzi* Infektion analysiert.

4.2.1 PMNs produzieren nach Stimulation DNA NETs

Nach Anregung mit verschiedenen Stimulanzen werden PMNs aktiviert und produzieren so genannte *neutrophil extracellular traps* (NETs) zum Fixieren von extrazellulären Pathogenen. Diese bleiben an der hoch geladenen DNA haften und können leichter von phagozytischen Zellen aufgenommen werden. Dies könnte ein Abwehrmechanismus sein, der in der *T. cruzi* Infektion vorkommt und sollte daher analysiert werden.

Zunächst sollte die Stimulation der NET-Produktion durch verschiedene TLR Agonisten untersucht werden. Hierzu wurden PMNs mit dem TLR 4 Agonisten LPS und dem TLR 2 Agonisten PamCys stimuliert und die DNA NETs immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

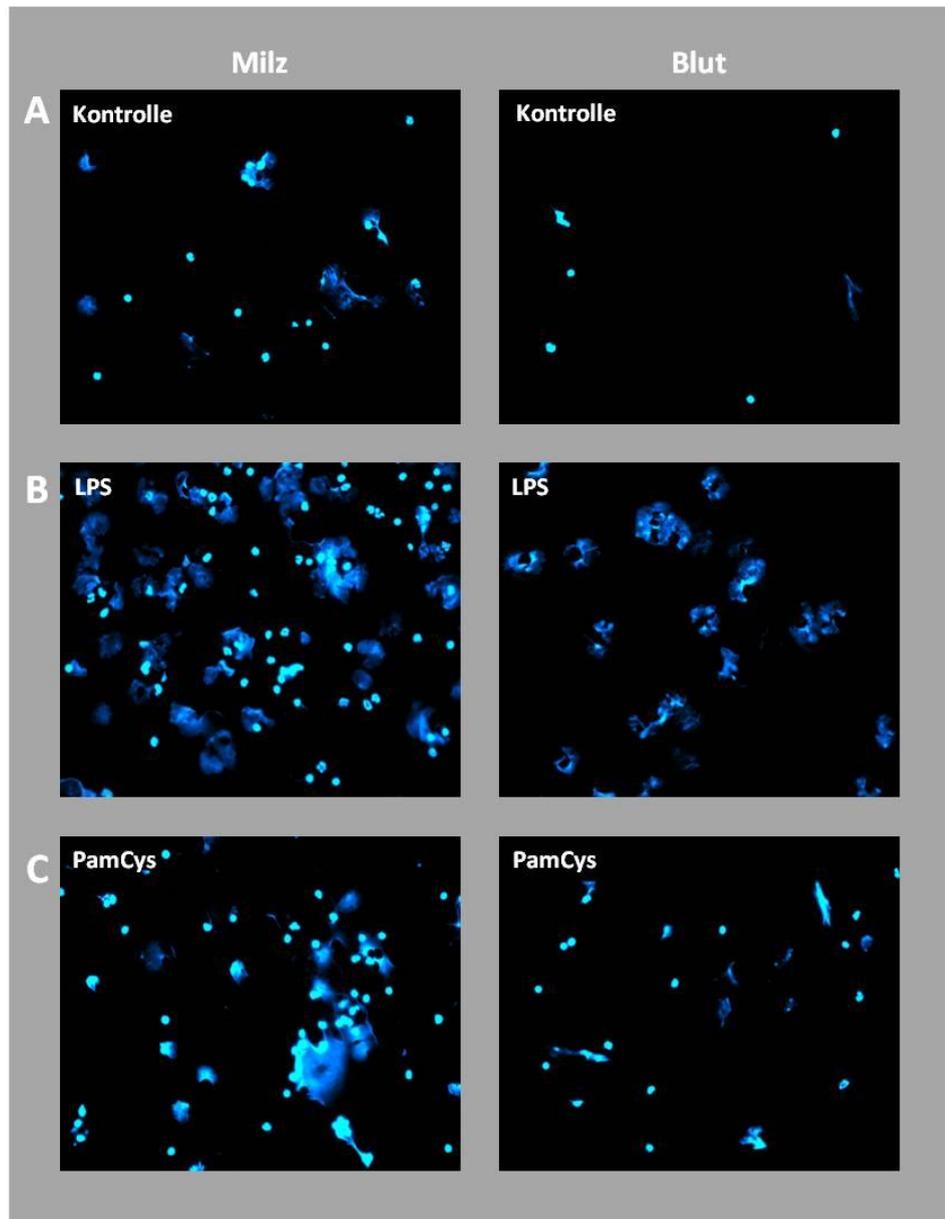


Abb. 14: NET-Produktion von PMNs nach Stimulation mit verschiedenen Agenzien

Murine PMNs wurden aus der Milz (links) oder dem Blut (rechts) mittels magnetischer anti-Ly6G gekoppelter Beads positiv selektiert und anschließend für 4 h stimuliert. Nach Fixierung wurden die Proben mit Dapi (blau) angefärbt, um die DNA Strukturen zu erkennen (40-fache Vergrößerung). **A:** negativ Kontrolle, ohne Stimulationsagens. **B:** Stimulation mit 100 ng/mL LPS. **C:** Stimulation mit 1 µg/mL PamCys. Es ist zu erkennen, dass nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten die PMNs zur Produktion von DNA-NETs angeregt wurden.

Die Abb. 14 zeigt, dass nach vier stündiger Inkubation der aus Blut oder Milz isolierten PMNs mit den jeweiligen TLR Agonisten (LPS oder PamCys) viele DNA NETs mit dem DNA Farbstoff Dapi anzufärben sind. Die unstimulierten Kontrollen zeigen nur wenige NETs und viele intakte Zellkerne der PMNs. Dies zeigt, dass die PMNs in der Lage sind NETs nach Stimulation zu produzieren. Die Stimulation durch LPS scheint zu einer stärkeren Aktivierung zu führen, da mehr NETs in den LPS stimulierten Proben im Vergleich zu den PamCys stimulierten Proben vorhanden waren (s. Abb. 14 B).

4.2.2 Trypanosomen sind mit den NETs assoziiert

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob *T. cruzi* in den gebildeten NETs fixiert und somit eine Reinfektion weiterer Zellen verhindert werden kann. Hierfür wurden PMNs durch magnetische Zellseparation aus murinem Blut isoliert und anschließend mit *T. cruzi* Tulahuen inkubiert.

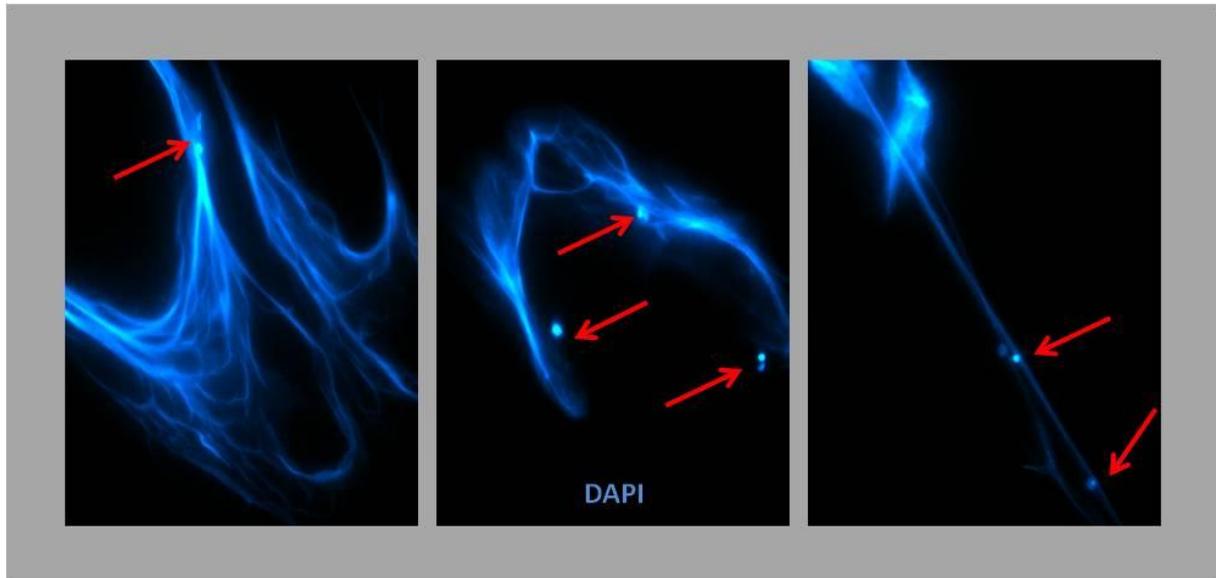


Abb. 15: Trypanosomen des Tulahuen Stammes in PMN NETs

Murine PMNs wurden aus dem Blut mittels magnetischer anti-Ly6G gekoppelter Beads positiv selektiert und anschließend für 4 h mit *T. cruzi* Tulahuen inkubiert. Des Weiteren wurden die Proben fixiert und anschließend die DNA mit Dapi (blau) angefärbt. Die Trypanosomen wurden teilweise in den DNA-NETs der PMNs eingefangen. Die roten Pfeile markieren die Lokalisation der Trypanosomen (Zellkern und Kinetoplast).

In Abb. 15 ist zu erkennen, dass *T. cruzi* in den NETs der PMNs lokalisiert ist. Die mit Dapi angefärbten DNA NETs sind mit den Zellkernen und Kinetoplasten der Trypanosomen assoziiert. Ob es sich bei dieser Färbung um eine zufällige Assoziation von NETs und Trypanosomen handelt oder ein aktives Oponieren der Parasiten durch die aktivierten PMNs, lässt sich mit dieser Färbemethode nicht ermitteln.

4.2.3 Einfluss von anti-Siglec-E auf die NET-Produktion

Da beschrieben wurde, dass *T. cruzi* an Siglec-E bindet und die Aktivierung von DCs über diese Interaktion hemmt, sollte die Auswirkung der Siglec-E Ligation auf PMNs untersucht werden. Die Verwendung des anti-Siglec-E Antikörpers stellt ein Modell für die Ligation von Siglec-E durch *T. cruzi* dar. Durch die Zugabe des Antikörpers sollte die Bindung und die damit verbundene Signalgebung durch Siglec-E analysiert werden. Hierzu wurden PMNs mit einem anti-Siglec-E Antikörper inkubiert, anschließend mit PMA stimuliert und die NET-Produktion analysiert.

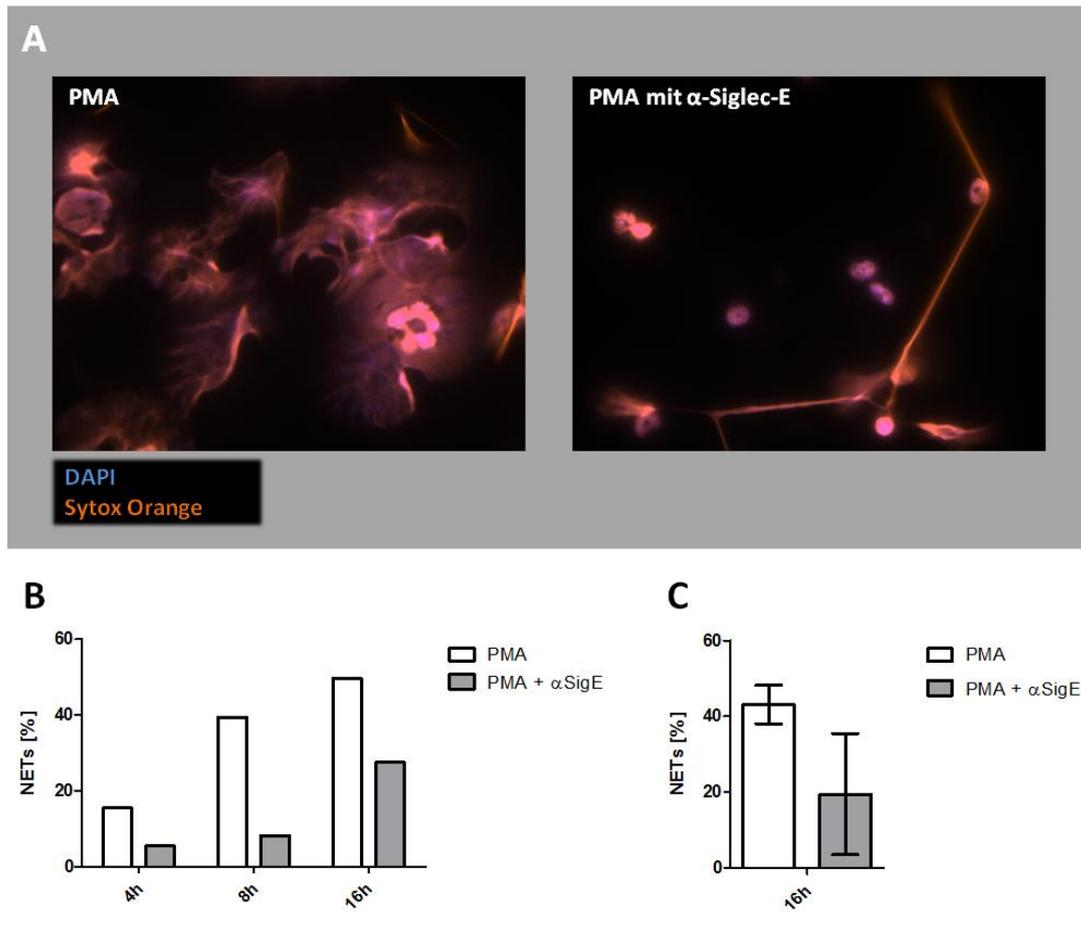


Abb. 16: NET-Produktion nach PMA Stimulation unter dem Einfluss von anti-Siglec-E

Aus dem Knochenmark isolierte PMNs wurden mittels Gradientenzentrifugation aufgereinigt und anschließend zur NET-Produktion mit 100 nM PMA stimuliert. Hierbei wurde ein Ansatz vor der Stimulation zusätzlich 1 h mit einem anti-Siglec-E Antikörper inkubiert. Nach 4, 8 und 16 h wurden die Proben fixiert und die NETs ausgezählt. **A:** Overlay der DNA-Farbstoffe DAPI (blau) und Sytox Orange (orange) zur Darstellung der NET-Produktion nach 16 h PMA Stimulation; 100 nM PMA (rechts) und anti-Siglec-E mit 100 nM PMA (links). **B:** Auszählung der NETs nach verschiedenen Stimulationszeitpunkten (4, 8 und 16 h) mit und ohne anti-Siglec-E Antikörper Zugabe. Aus jeweils 10 zufällig ausgewählten Fotos wurde der prozentuale Anteil der NETs der Proben ermittelt. **C:** NET-Produktion nach 16h PMA Stimulation von zwei unabhängigen Experimenten.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Antikörpergabe die NET-Produktion der PMNs verringert war. Zur Darstellung der NETs wurde zum einen Dapi und zum anderen der DNA-Farbstoff Sytox Orange verwendet (Abb. 16). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden analysiert und die Anzahl der NETs in PMA stimulierten und in PMA stimulierten und anti-Siglec-E inkubierten Proben bestimmt. Die grafische Darstellung in Abb. 16 B zeigt, dass die Anzahl der NETs über den Zeitverlauf von 4, 8 und 16 Stunden zunimmt, aber nach Zugabe von anti-Siglec-E zu allen Zeitpunkten verringert ist. Die NET Bildung erreicht erst nach 16 Stunden den Höhepunkt mit ca. 50% NETs nach PMA Stimulation und im Vergleich dazu nur ca. 30% NETs bei zusätzlicher Antikörpergabe. Die Abb. 16 C zeigt jedoch auch, dass eine relativ hohe Varianz in den wiederholten Messungen der NET Anzahl vorlag.

4.2.4 Anti-Siglec-E hat keinen Einfluss auf ROS Produktion von PMNs

Um eine weitere Funktion der PMNs zur Abwehr von Parasiten zu untersuchen, wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS = *reactive oxygen species*) analysiert. Diese Sauerstoff-Verbindungen mit freien Radikalen haben eine antiparasitäre Wirkung und sind ein gutes Maß für den Aktivierungszustand von PMNs. Die Produktion von ROS kann mittels der durchflusszytometrischen Analyse von Dihydrorhodamine 123 (DHR) gemessen werden. Dies ist ein Farbstoff, der durch ROS oxidiert wird und sich somit die mittlere Fluoreszenzintensität (FL-1) erhöht. PMNs wurden mit PMA und dem anti-Siglec-E Antikörper inkubiert, um den inhibitorischen Effekt einer Ligation von Siglec-E mittels eines anti-Siglec-E-Antikörpers zu analysieren.

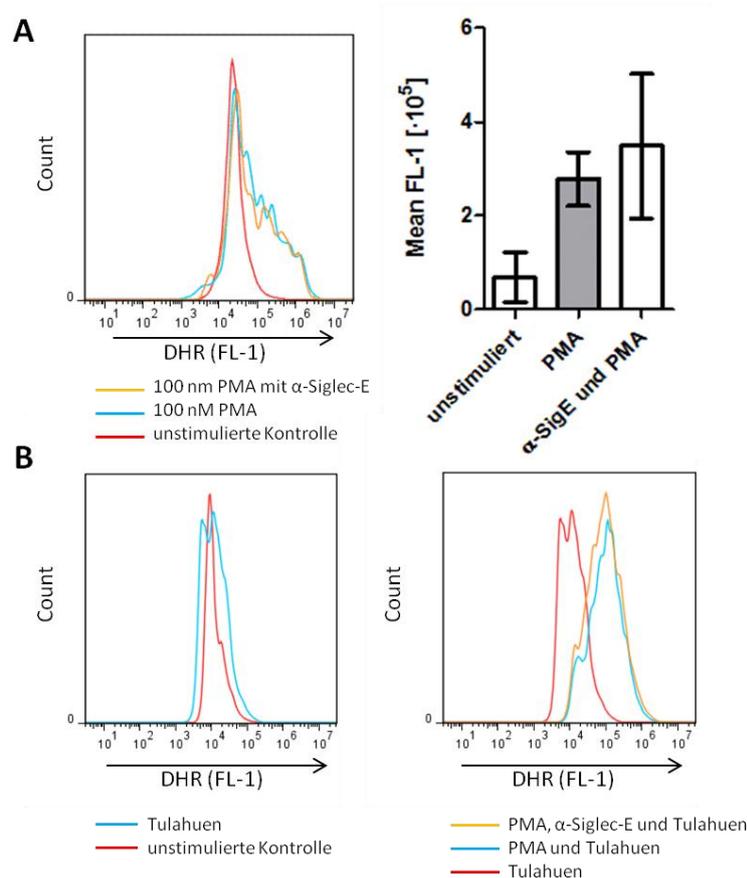


Abb. 17: Messung der ROS-Produktion unter Einfluss von anti-Siglec-E

Neutrophile Granulozyten wurden mittels Gradientenzentrifugation angereichert und anschließend für 1 h mit 100 nM PMA zur Produktion von ROS stimuliert. Die ROS-Produktion wurde mit Hilfe der Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität in FL-1 (DHR) auf Gr-1⁺Zellen gemessen. Hierbei wurde jeweils eine unstimulierte mit einer PMA stimulierten Probe verglichen. Zusätzlich zur PMA Stimulation wurde einem Ansatz 5 μ g anti-Siglec-E hinzugefügt und der Einfluss auf die ROS-Produktion ermittelt. **A:** Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von DHR. Vergleich von unstimulierten und PMA stimulierten sowie zusätzlich anti-Siglec-E inkubierten Proben. **B:** Zusätzlich zur Stimulation mit PMA (500 nM) wurde der aktivierende Effekt von Trypanosomen getestet. Eine leichte Erhöhung der DHR Fluoreszenzintensität nach Zugabe von *T. cruzi* Tulahuen ist zu erkennen (links). Die Koinkubation mit *T. cruzi* und anti-Siglec-E zeigt keinen Einfluss nach PMA Stimulation (rechts).

Die Abb. 17 zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den PMA stimulierten und den zuvor mit anti-Siglec-E inkubierten Proben im Bezug auf die ROS-Produktion vorlagen. Im Vergleich zu unstimulierten PMNs nahm die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von DHR bei stimulierten Ansätzen zwar deutlich zu, jedoch konnte kein inhibierender Effekt von Siglec-E gezeigt werden. Die Stimulation von PMNs durch Inkubation mit Trypanosomen zeigte eine leichte Erhöhung der ROS Produktion (Abb. 17 B links), jedoch konnten keine Unterschiede bei der Koinkubation von *T. cruzi* mit anti-Siglec-E und PMA festgestellt werden (Abb. 17 B, rechts).

Desweiteren wurde die ROS Produktion von PMNs untersucht, die direkt aus dem Blut einer *T. cruzi* infizierten Maus isoliert wurden. Zum Vergleich wurden Gr-1 positive Zellen aus einer nicht infizierten Maus gewählt.

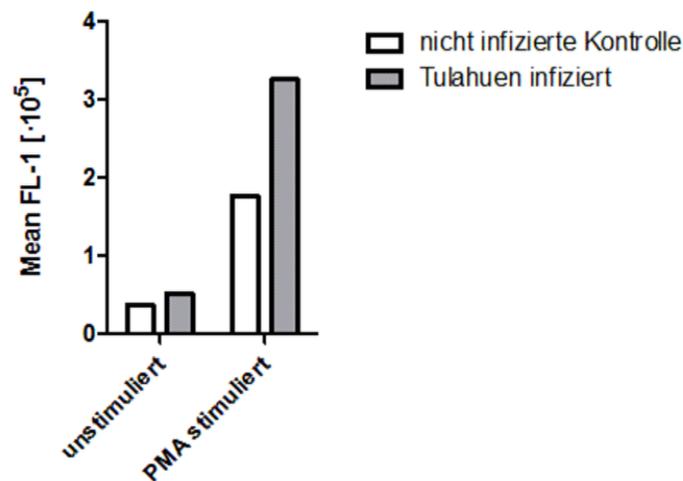


Abb. 18: Vergleich der ROS-Produktion von Gr-1⁺ Zellen einer *T. cruzi* Tulahuen infizierten und einer nicht infizierten Maus

Murines Blut wurde nach Zugabe von DHR und einem APC-markierten anti-Gr-1 Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Die ROS-Produktion von Gr-1⁺ Zellen wurde an Hand der mittleren Fluoreszenzintensität von DHR bestimmt. Hierbei wurde die ROS-Produktion der PMNs von nicht infizierten und *T. cruzi* Tulahuen infizierten Mäusen verglichen. Die Proben wurden zusätzlich 1 h mit 500 nM PMA stimuliert. Die Gr-1⁺ Zellen der *T. cruzi* Tulahuen infizierten Maus ließen sich besser zur ROS-Produktion anregen.

In Abb. 18 ist zu erkennen, dass erst nach zusätzlicher PMA Stimulation die PMNs zur ROS-Produktion angeregt werden können. Es fällt auf, dass die PMNs, welche aus dem Blut einer Tulahuen infizierten Maus isoliert wurden, eine höhere ROS Produktion aufweisen. Dies spricht für eine bessere Aktivierung der PMNs durch die vorhandene *T. cruzi* Infektion.

Da die durch *in vitro* Analysen erhaltenen Ergebnisse keinen eindeutigen Effekt von Siglec-E auf PMNs zeigten, sollte die Rolle der PMNs in der *T. cruzi* Infektion *in vivo* untersucht werden.

4.2.5 Die Depletion von PMNs hat keinen Einfluss auf die Parasitämie im Verlauf einer *T. cruzi* Infektion

Um den Einfluss der PMNs *in vivo* untersuchen zu können, wurden diese Zellen mittels eines anti-Gr-1-Antikörpers depletiert und der Verlauf der *T. cruzi* Infektion an Hand der Parasitämie analysiert.

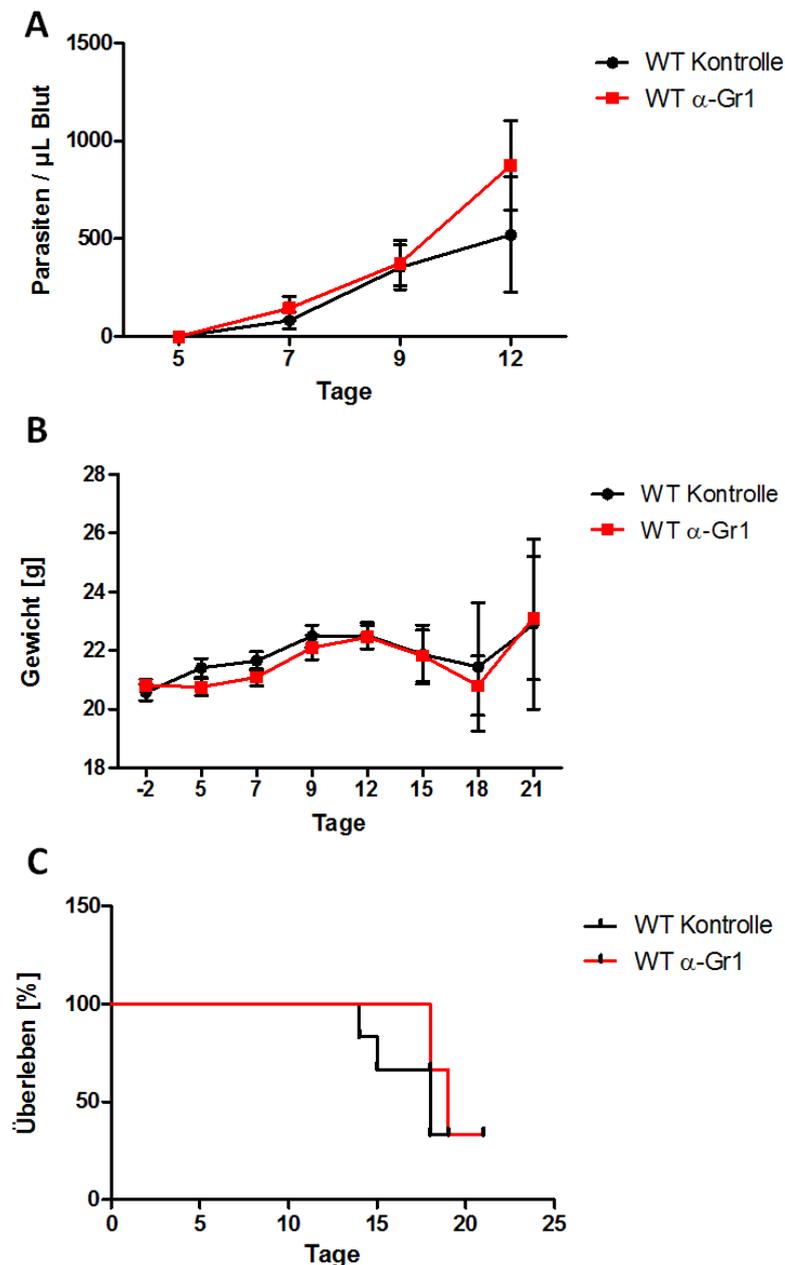


Abb. 19: Depletion von PMNs mittels anti-Gr-1 vor einer *T. cruzi* Tulahuen Infektion

Gr-1⁺ Zellen (PMNs) wurden mittels i.p. Injektion von 300 μg anti-Gr-1 Antikörper einen Tag vor der Infektion depletiert und der Depletionserfolg durchflusszytometrisch überprüft. Anschließend wurden C57Bl/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^4$ *T. cruzi* Tulahuen infiziert und der Verlauf der Parasitämie analysiert. **A:** Parasitämieverlauf der Kontroll- und der PMN-depletierten Mäuse. **B:** Gewichtsverlauf während der Infektion. **C:** Überlebenskurve der Kontroll- und der PMN-depletierten Mäuse im Verlauf der *T. cruzi* Tulahuen Infektion. Der Parasitämieverlauf wurde statistisch mit dem *Two-way-ANOVA* ausgewertet und war nicht signifikant (n.s.); Gruppengröße WT Kontrolle und WT α -Gr-1: n=6.

Die Abb. 19 zeigt, dass die Parasitämie der *T. cruzi* Infektion keine signifikanten Unterschiede in den zu vergleichenden Gruppen aufwies. Der Verlauf der Parasitämie, die Gewichtskurve und das Überleben der Kontroll- und der Gr-1 depletierten Mäuse waren vergleichbar. Um auszuschließen, dass der anti-Gr-1 Antikörper nicht funktionell war, wurde die Depletion der PMNs durchflusszytometrisch vor der Infektion mit Trypanosomen überprüft (Daten nicht gezeigt). Die PMNs waren vollständig depletiert. Das Fehlen der PMNs in der Frühphase der *T. cruzi* Tulahuen Infektion scheint keinen Einfluss auf den folgenden Verlauf der Infektion zu haben.

4.2.6 Die Funktion der MPO ist irrelevant für den Verlauf der *T. cruzi* Infektion

Da eine Depletion mit dem anti-Gr-1 Antikörper nur zu einer transienten Neutropenie von circa fünf bis sieben Tagen führt, wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss der Neutrophilen Funktion untersucht. Da das Vorhandensein von Myeloperoxidase (MPO) zur Produktion von NETs und reaktiven Stickstoffspezies essentiell scheint, sollte analysiert werden, welchen Einfluss das Fehlen dieses Enzyms auf den Verlauf einer *T. cruzi* Infektion hat. Hierzu wurden Wildtyp und MPO-defiziente Mäuse mit *T. cruzi* Tulahuen infiziert und der Infektionsverlauf analysiert.

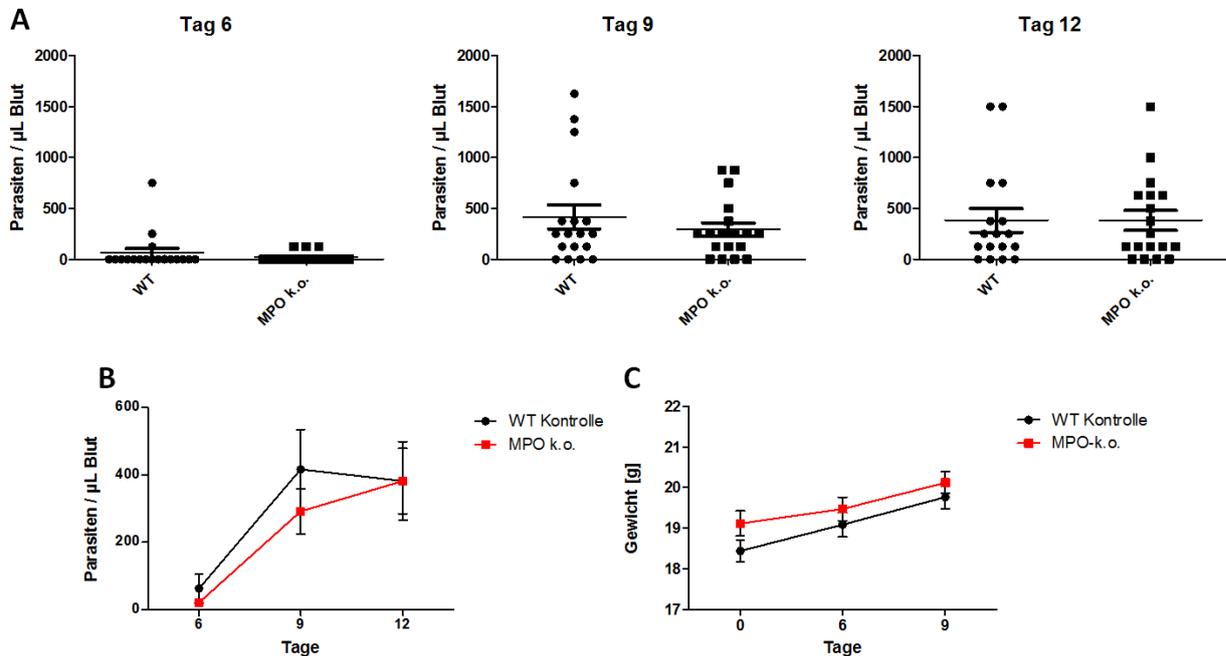


Abb. 20: Vergleich der Tulahuen Infektion zwischen Wildtyp und MPO defizienten Mäusen

C57BL/6 Wildtyp und MPO-defiziente Mäuse wurden mit $2 \cdot 10^4$ Trypanosomen des Tulahuen Stammes infiziert und der Verlauf der Parasitämie analysiert. An den Tagen 6, 9 und 12 wurde die Parasitämie mikroskopisch ermittelt. **A:** Vergleich der Parasitämie an den Tagen 6, 9 und 12. **B:** Vergleich des Parasitämieverlaufs von Wildtyp und MPO defizienten Mäusen. **C:** Gewichtsverlauf während der Tulahuen Infektion. Die Daten sind zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n=6$), und wurden mit dem *Students-t-test* oder *Two-way-ANOVA* statistisch analysiert; die Unterschiede waren nicht signifikant (n.s.).

In Abb. 20 ist zu erkennen, dass zwischen den zwei zu vergleichenden Phänotypen (Wildtyp und MPO-defizient) keine signifikanten Unterschiede in der Parasitämie vorliegen. Die dargestellte Zusammenfassung drei unabhängiger Experimente zeigt, dass die Parasitenlast in der frühen Phase der Infektion (Tag 6, 9 und 12) vergleichbar ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von MPO oder auch die Depletion der PMNs in den ersten Tagen der Infektion keinen Einfluss auf den Verlauf der *T. cruzi* Infektion oder das Überleben der Mäuse hat.

4.3 Einfluss von anti-Siglec-E auf *T. cruzi* infizierte Zellen

4.3.1 Funktionsnachweis des anti-Siglec-E Antikörpers

Da gezeigt werden konnte, dass die Expression von Siglec-E keinen Einfluss auf die Infektionsrate von CHO Zellen hat (Abb. 12), aber generell Siglec-E mit einer immunmodulierenden Funktion assoziiert wird, sollte die Wirkung eines anti-Siglec-E Antikörpers analysiert werden. Dieser Antikörper wurde in einer vorangegangenen Doktorarbeit [73] durch die Immunisierung eines Kaninchens gewonnen. Es handelt sich um einen IgG Antikörper, welcher affinitätschromatografisch aufgereinigt wurde. Im Folgenden wurde analysiert, wie die Eigenschaften (Bindung, Ligation oder Blockade) dieses anti-Siglec-E Antikörpers einzuordnen sind. Um festzustellen, ob der Antikörper an die Bindungsstelle von Siglec-E oder an einen anderen Bereich bindet, wurde die Bindung an Siglec-E-Ig durchflusszytometrisch analysiert. Dieses Fusionsmolekül besitzt eine hoch affine Bindungsstelle für α -2,3- oder α -2,6-verknüpfte Sialinsäuren und einen Fc-Teil des humanen IgG. Zum Bindungsnachweis wurden hochsialylierte CHO Zellen verwendet.

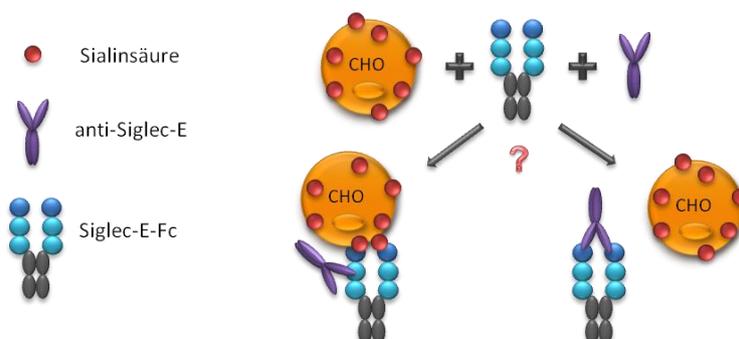


Abb. 21: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Bindungsnachweis von anti-Siglec-E

Hochsialylierte CHO-Zellen wurden mit dem Siglec-E-Ig Fusionsmolekül inkubiert. Dieses bindet an die Sialinsäuren auf der Zelloberfläche. Bei einer Koinkubation des Fusionsmoleküls mit dem anti-Siglec-E Antikörper kann entweder die Bindung an sialylierte Strukturen der CHO Zellen erhalten bleiben (links) oder die Bindungsstelle von Siglec-E-Ig durch den anti-Siglec-E Antikörper blockiert und somit die Bindung an Sialinsäuren der CHO Zellen verhindert werden (rechts).

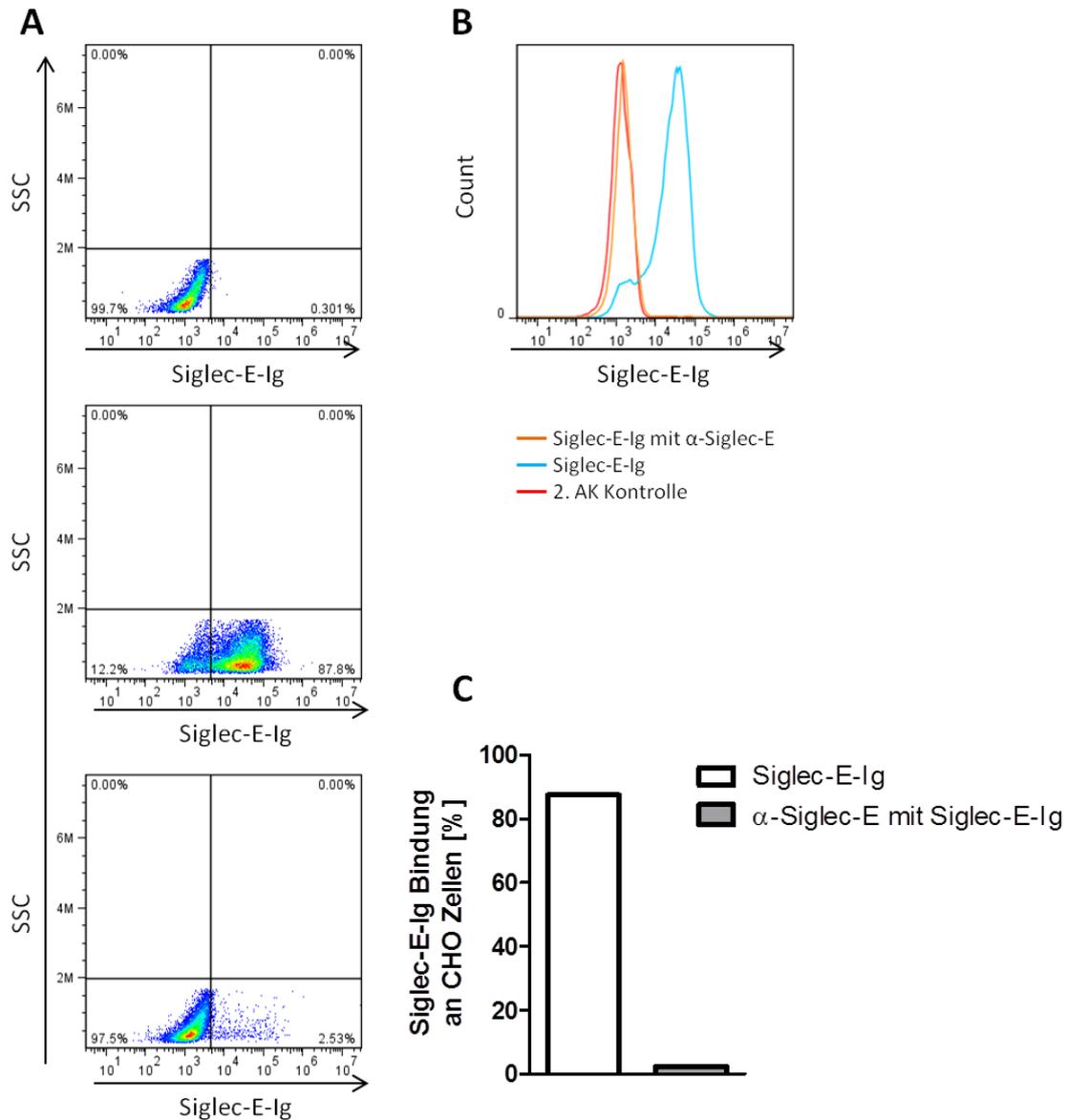


Abb. 22: Funktionsnachweis des anti-Siglec-E Antikörpers

Der aus einem immunisierten Kaninchen gewonnene anti-Siglec-E-Antikörper wurde auf seine Funktion im Durchflusszytometer getestet. Hierfür wurden hochsialylierte CHO Zellen mit einem Siglec-E-Ig Fusionsmolekül inkubiert und die Bindung von Siglec-E-Ig an die von CHO Zellen exprimierte Sialinsäuren gezeigt. Bei vorheriger Inkubation (1 h) von 5 μ g anti-Siglec-E mit dem Siglec-E-Ig Fusionsmolekül, wird die Bindungsstelle von Siglec-E durch den Antikörper blockiert und die Bindung an sialylierte Liganden der CHO Zellen wird verhindert. **A:** Darstellung der Siglec-E-Ig Bindung an sialylierte CHO Zellen; Sekundär Antikörper Kontrolle (oben), Siglec-E-Ig Bindung (mitte) und Koinkubation von anti-Siglec-E und Siglec-E-Ig (unten). **B:** Darstellung der Konkurrenz von anti-Siglec-E und sialylierten CHO Zellen um die Bindungsstelle an Siglec-E-Ig; Sekundär Antikörper Kontrolle (rote Linie), Siglec-E-Ig Bindung (blaue Linie), Koinkubation mit anti-Siglec-E (orange Linie). **C:** Grafische Darstellung der Bindung von Siglec-E-Ig an CHO Zellen und der Konkurrenz durch Zugabe von anti-Siglec-E. Die Bindung geht von ca. 85% auf 2% zurück. Dies zeigt, dass der anti-Siglec-E-Antikörper an die Bindungsstelle von Siglec-E bindet und somit die Bindung an Sialinsäuren inhibiert.

In Abb. 22 ist zu erkennen, dass der anti-Siglec-E Antikörper an die Bindungsstelle von Siglec-E bindet und diese blockiert oder auch ligiert. Ca. 85% der sialylierten CHO Zellen, welche viele Liganden für Siglec-E exprimieren, binden an das Fusionsmolekül Siglec-E-Ig (Abb. 22 C). Bei vorheriger Inkubation von Siglec-E-Ig mit dem anti-Siglec-E Antikörper ist die Bindung an die sialylierten CHO Zellen blockiert und geht auf nur 2% zurück.

Die Wirkung des anti-Siglec-E Antikörpers sollte im weiteren Verlauf der Arbeit an Siglec-E exprimierenden Zellen getestet werden.

Da die Untersuchungen zur Funktion von PMNs, welche sehr viel Siglec-E exprimieren, im Zusammenhang mit einer *T. cruzi* Infektion keine eindeutigen Ergebnisse zeigten, wurden im Folgenden andere Zellen des angeborenen Immunsystems (APZ) gewählt, die auch Siglec-E exprimieren. APZ (DCs und Makrophagen) können im Gegensatz zu PMNs die adaptive Immunantwort beeinflussen, da sie T-Zellen Antigene präsentieren und durch die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen die Zellen der adaptiven Immunabwehr aktivieren.

4.3.2 BMDCs und BMDMs exprimieren Siglec-E

DCs und Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, welche bei der Abwehr einer *T. cruzi* Infektion eine wichtige Rolle spielen. Sie regulieren über die Produktion von Zytokinen die adaptive Immunantwort, welche für die Bekämpfung einer *T. cruzi* Infektion essentiell ist. Zudem exprimieren diese Zellen Siglec-E und Erdmann et al. konnten zeigen, dass die Zytokinproduktion von BMDCs über die Ligation von Siglec-E reguliert werden kann [78].

Die Expression von Siglec-E sollte durchflusszytometrisch auf nicht infizierten und *T. cruzi* Tulahuen infizierten BMDCs und BMDMs untersucht werden. So sollte analysiert werden, ob die *T. cruzi* Infektion einen Einfluss auf die Siglec-E Expression hat.

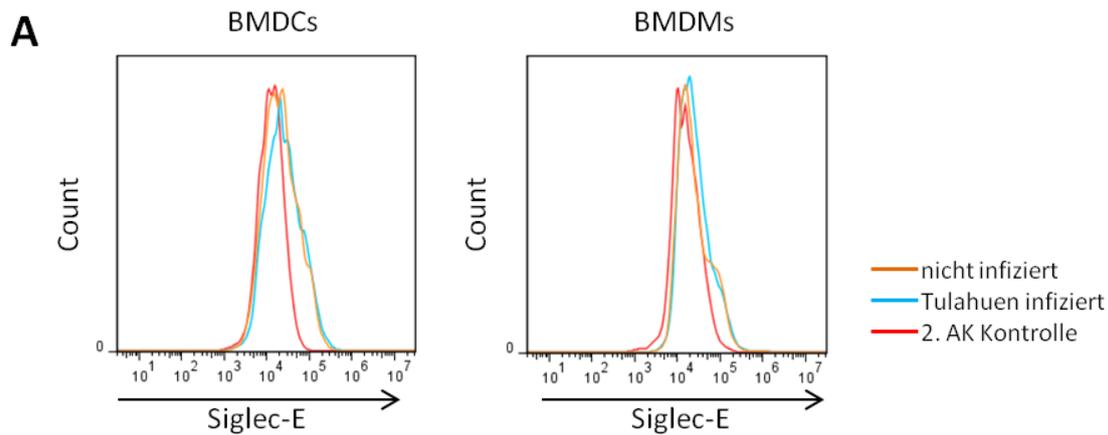


Abb. 23: Siglec-E Expression auf BMDCs und BMDMs

Die Siglec-E Expression wurde auf BMDCs und BMDMs durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden mit einem anti-Siglec-E Antikörper und einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper sowie mit einem CD11c bzw. CD11b Antikörper gefärbt; als Kontrolle diente eine Färbung mit dem Sekundär-Antikörper (rote Kurve). Hierfür wurden Zellen 24 h vorher mit *T. cruzi* Tulahuen infiziert (blaue Kurve) und die Siglec-E Expression mit nicht infizierten Zellen (orange Kurve) verglichen. **A:** Darstellung der Siglec-E Expression im Histogramm, BMDCs (links) und BMDMs (rechts). Es ist zu erkennen, dass auf BMDCs und auf BMDMs Siglec-E exprimiert wird; die Expression bleibt während der Infektion mit Trypanosomen unverändert.

In Abb. 23 ist die Expression von Siglec-E auf BMDCs und BMDMs dargestellt. Die Zellen wurden mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes infiziert und die Expression von Siglec-E anschließend auf nicht infizierten und infizierten Zellen analysiert. Im Histogramm ist zu erkennen, dass Siglec-E auf beiden Zelltypen exprimiert wird und die Expression von Siglec-E auch während der Infektion mit *T. cruzi* nicht induziert wird. Somit eignen sich BMDCs oder auch BMDMs zur weiteren Analyse des Einflusses von anti-Siglec-E auf die *T. cruzi* Infektion.

4.3.3 BMDC und BMDM *in vitro* Infektion unter dem Einfluss von anti-Siglec-E

In diesem Abschnitt ist der Einfluss von anti-Siglec-E auf die *T. cruzi* Infektion von BMDCs und BMDMs dargestellt. Hierfür wurden Zellen in Chamberslides ausgesät und anschließend mit *T. cruzi* infiziert. Vor der *T. cruzi* Infektion wurde dem Kulturmedium der anti-Siglec-E Antikörper zugefügt, um den Effekt auf die Siglec-E exprimierenden Immunzellen zu untersuchen.

Zunächst wurde analysiert, ob die Zugabe von anti-Siglec-E einen sichtbaren Effekt auf die *T. cruzi* Infektion von BMDCs hat. Die *T. cruzi* infizierten Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

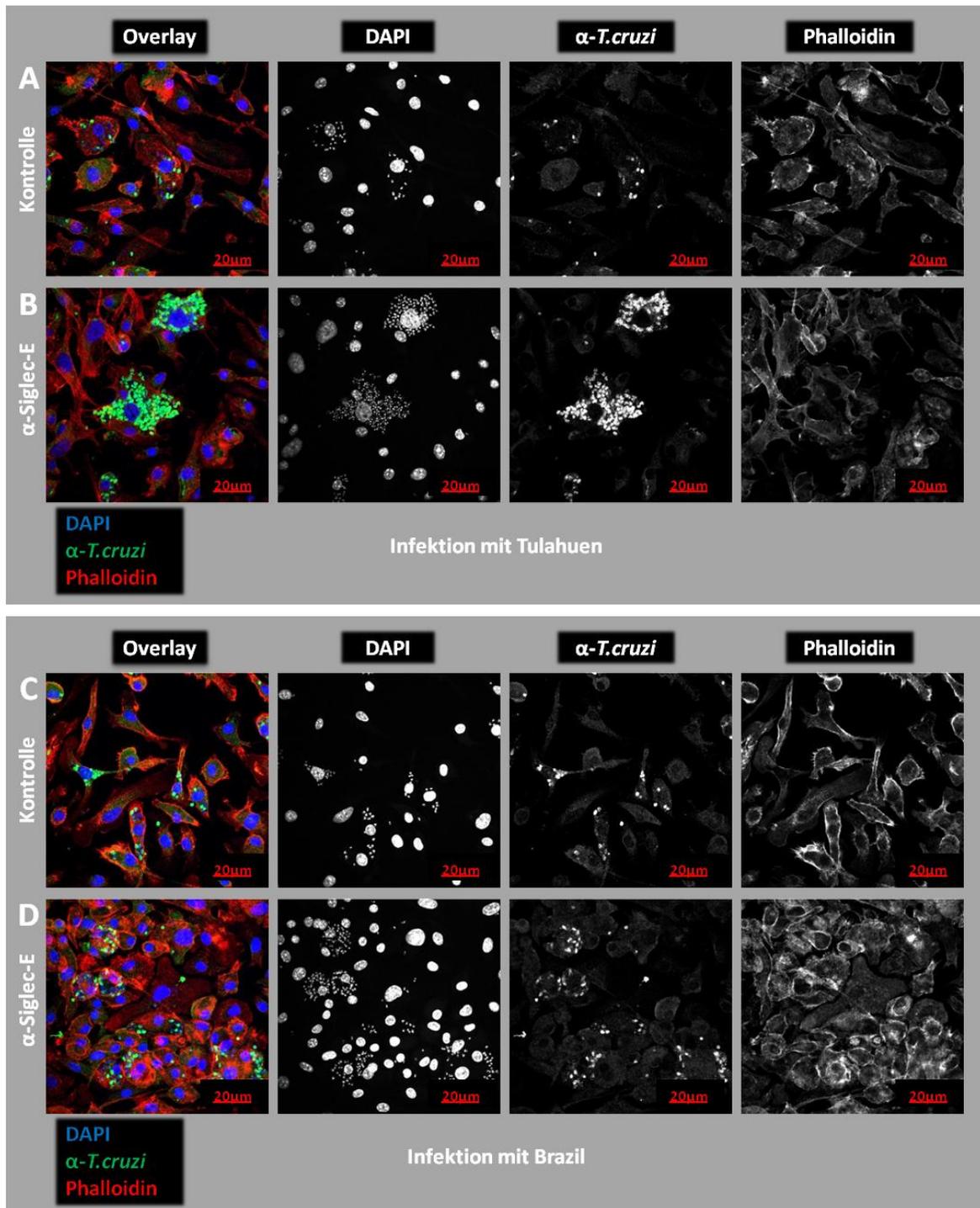


Abb. 24: Infektion von BMDCs nach Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers

BMDCs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit 5 μ g anti-Siglec-E inkubiert. Anschließend wurden die BMDCs mit Trypanosomen ($1 \cdot 10^5$ Parasiten/well) des Tulahuen (A, B) oder des Brazil (C, D) Stammes aus der Hg 39 Kultur infiziert und 72 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi (blau), Phalloidin (rot) und einem anti-*T. cruzi* Serum sowie einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils die Overlays (links) in Farbe und die einzelnen Färbungen (Dapi, α -*T. cruzi*, Phalloidin) in Graustufen (die rote Skalierung zeigt 20 μ m an).

A: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach Infektion mit Tulahuen. Kontrollansatz ohne Zugabe von anti-Siglec-E. **B:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach Infektion mit Tulahuen. Infektion nach Zugabe von anti-Siglec-E. **C:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach Infektion mit Brazil. Kontrollansatz ohne Zugabe von anti-Siglec-E. **D:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach Infektion mit Brazil. Infektion nach Zugabe von anti-Siglec-E. Diese Aufnahmen zeigen Beispiele für drei unabhängige Experimente.

In Abb. 24 wird deutlich, dass unter dem Einfluss von anti-Siglec-E die Anzahl der Amastigoten pro infizierter Zelle ansteigt. Die Infektion von BMDCs mit Trypanosomen des Tulahuen (Abb. 24 A, B) und des Brazil (Abb. 24 C, D) Stammes zeigt, dass nach der Zugabe von anti-Siglec-E mehr Parasiten in den einzelnen infizierten Zellen zu finden sind. Die mit einem anti-*T. cruzi* Serum (grün) gefärbten Amastigoten in den Zellen sind zu erkennen und in den Antikörper behandelten Proben deutlich vermehrt; die Dapi Färbung (blau) verdeutlicht die hohe Anzahl der Parasiten in anti-Siglec-E inkubierten Proben.

Ob dieser Effekt auch bei der Infektion von Makrophagen vorzufinden war, sollte durch die *T. cruzi* Infektion von BMDMs analysiert werden. Zusätzlich wurde ein polyklonales IgG-Kaninchenserum eingesetzt, um einen unspezifischen Effekt durch die Zugabe von IgG Antikörpern zu den zu infizierenden Zellen auszuschließen.

Die Infektion von BMDMs wurde in einem Zeitverlauf von 48 h und 72 h immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

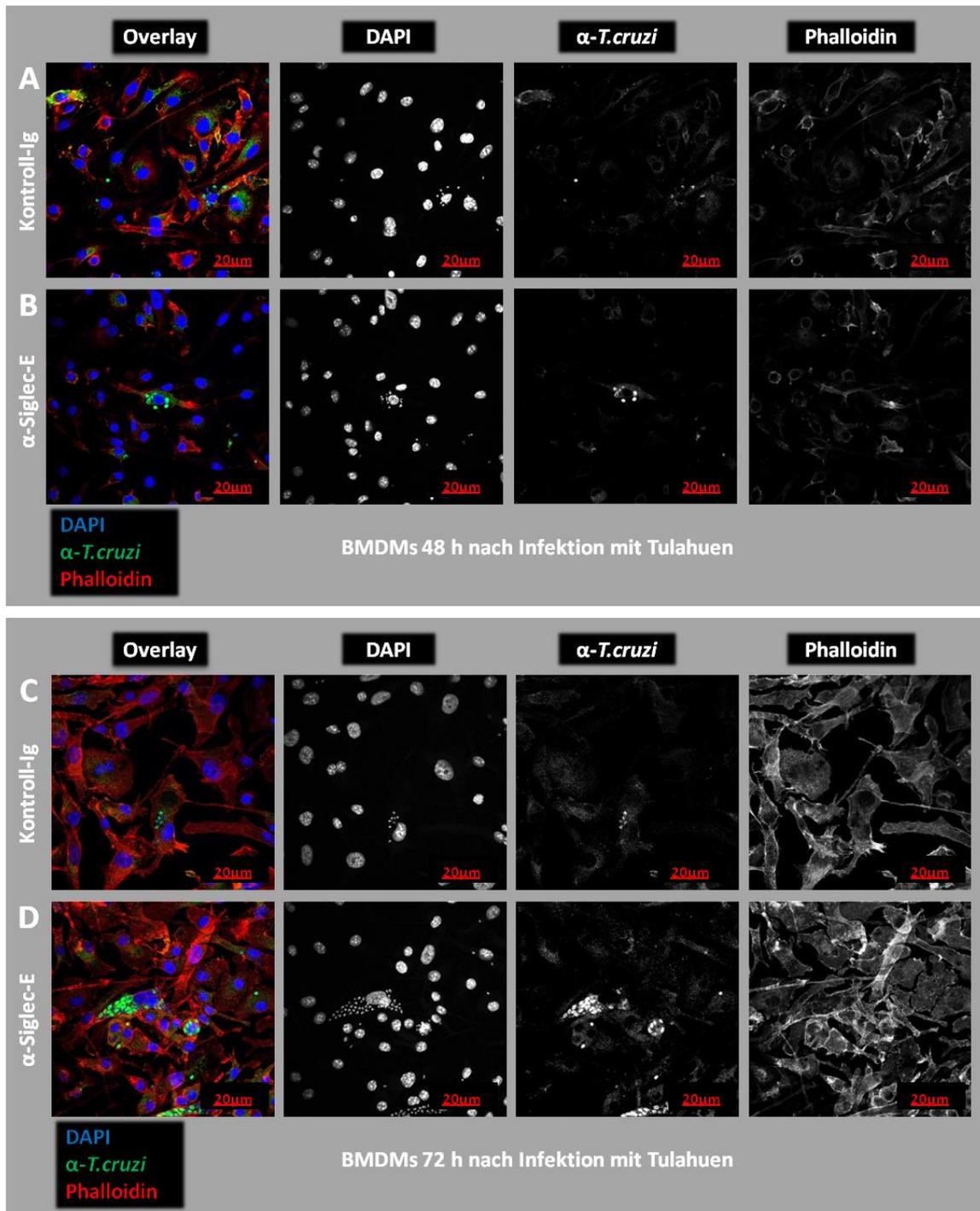


Abb. 25: Infektion von BMDMs nach Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers

BMDMs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit $5 \mu\text{g}$ anti-Siglec-E oder mit einem unspezifischen Kontroll-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die BMDMs mit Trypanosomen ($1 \cdot 10^5$ Parasiten/well) des Tulahuen Stammes aus der Hg 39 Kultur infiziert und 48 h (A, B) und 72 h (C, D) nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi (blau), Phalloidin (rot) und einem anti-*T. cruzi* Serum, sowie einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils die Overlays (links) in Farbe und die einzelnen Färbungen (Dapi, α -*T. cruzi*, Phalloidin) in Graustufen (die rote Skalierung zeigt $20 \mu\text{m}$ an). **A:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 48 h nach *T. cruzi* Tulahuen Infektion. Kontrollansatz nach Zugabe eines unspezifischen Kontrollantikörpers.

B: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 48 h nach Infektion mit *T. cruzi* Tulahuen. Infektion nach Zugabe von anti-Siglec-E. **C:** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach *T. cruzi* Tulahuen Infektion. Kontrollansatz nach Zugabe eines unspezifischen Kontrollantikörpers.

D: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 72 h nach Infektion mit *T. cruzi* Tulahuen. Infektion nach Zugabe von anti-Siglec-E. Diese Aufnahmen zeigen Beispiele für zwei unabhängige Experimente.

In Abb. 25 wird gezeigt, dass die Anzahl von Amastigoten pro infizierter BMDM unter Zugabe von anti-Siglec-E nach 72 h deutlich ansteigt. Es ist zu erkennen, dass zunächst nach 48 h in den mit anti-Siglec-E oder Kontroll-Antikörper behandelten Proben annähernd gleiche Parasitenzahlen vorzufinden sind, dahingegen steigt die Anzahl der Parasiten pro infizierter Zelle nach 72 h deutlich gegenüber der Kontroll-Antikörper inkubierten Probe an. Die Färbung des anti-*T. cruzi* Serum (grün) und die Dapi Färbung (blau) zeigen, dass viele hoch infizierte BMDMs nach 72 h unter dem anti-Siglec-E Einfluss vorhanden sind (Abb. 25D).

Um diesen Effekt des anti-Siglec-E Antikörpers besser charakterisieren zu können, wurden BMDCs mit Trypanosomen des Tulahuen und des Brazil Stammes infiziert und durch Auszählung von mindestens zehn zufällig ausgewählten Immunfluoreszenz-Aufnahmen 72 h nach der Infektion die Anzahl der Amastigoten pro infizierter Zelle ermittelt. Hierbei wurden die verschiedenen Ansätze nach anti-Siglec-E oder Kontroll-Antikörper Zugabe verglichen.

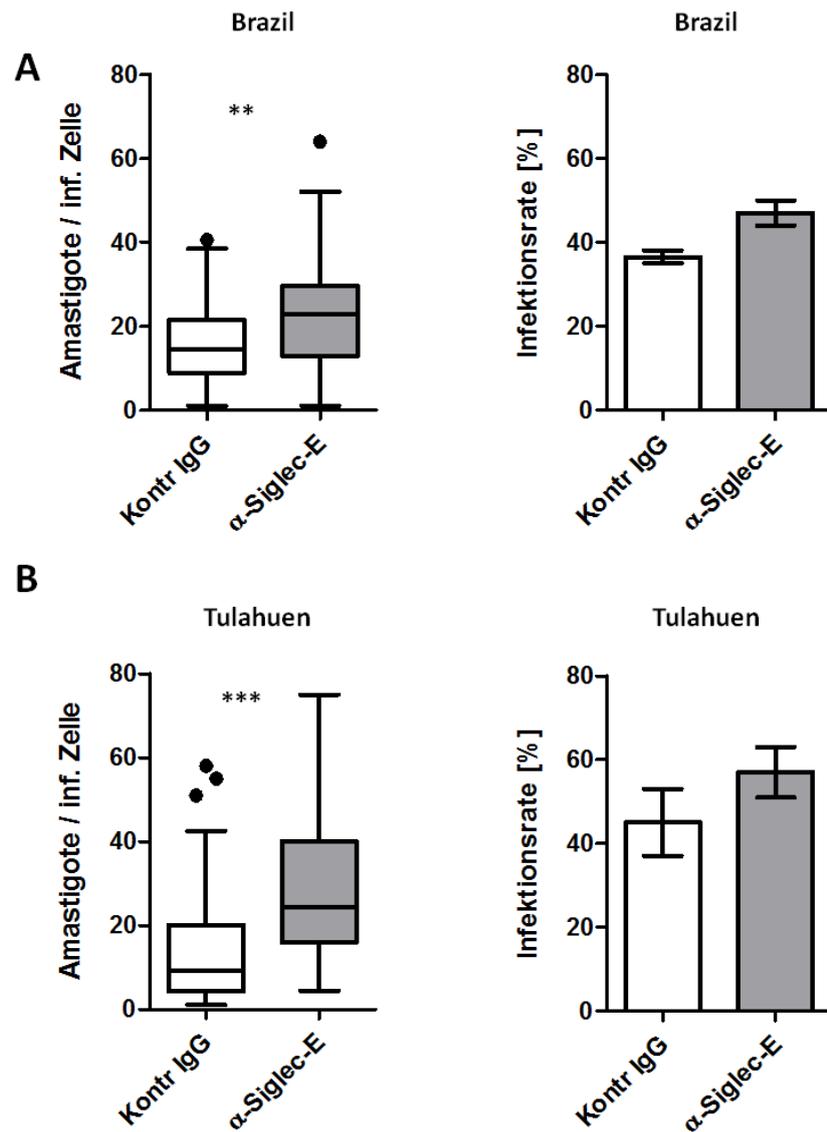


Abb. 26: Anzahl der Parasiten je infizierter Zelle und Infektionsraten von BMDCs

BMDCs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit 5 µg anti-Siglec-E oder mit einem unspezifischen Kontroll-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die BMDCs mit Trypanosomen ($2 \cdot 10^5$ Parasiten/well) des Brazil (A) oder des Tulahuen (B) Stammes aus der Hg 39 Kultur infiziert und 72 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi, Phalloidin und einem anti-*T. cruzi* Serum, sowie einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt. Es wurde die Infektionsrate mittels Auszählung bestimmt. Zusätzlich wurde ermittelt wie viele Amastigote pro infizierter Zelle vorhanden waren. **A:** Infektion von BMDCs mit Trypanosomen des Brazil Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). **B:** Infektion von BMDCs mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). Darstellung einer Auszählung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *Students-t-test*: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$

Wie in Abb. 26 dargestellt, ist zu erkennen, dass die Anzahl der Amastigoten pro infizierter Zelle signifikant erhöht ist, wenn die Zellen zuvor mit dem anti-Siglec-E Antikörper inkubiert wurden. Die Infektionsrate hingegen ist vergleichbar in den anti-Siglec-E und Kontroll-Antikörper behandelten Ansätzen. Diese Ergebnisse galten für die *T. cruzi* Infektion mit Trypanosomen des Tulahuen sowie des Brazil Stammes, welche

aus dem Überstand von Hg 39 Zellkulturen erhalten wurden.

Im nächsten Schritt wurde durch Auszählung der Parasiten pro infizierter Zelle überprüft, ob dieser Phänotyp auch bei der Infektion von BMDMs vorzufinden ist. Hierfür wurden BMDMs nach demselben Protokoll mit *T. cruzi* infiziert und anschließend nach 72 h immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

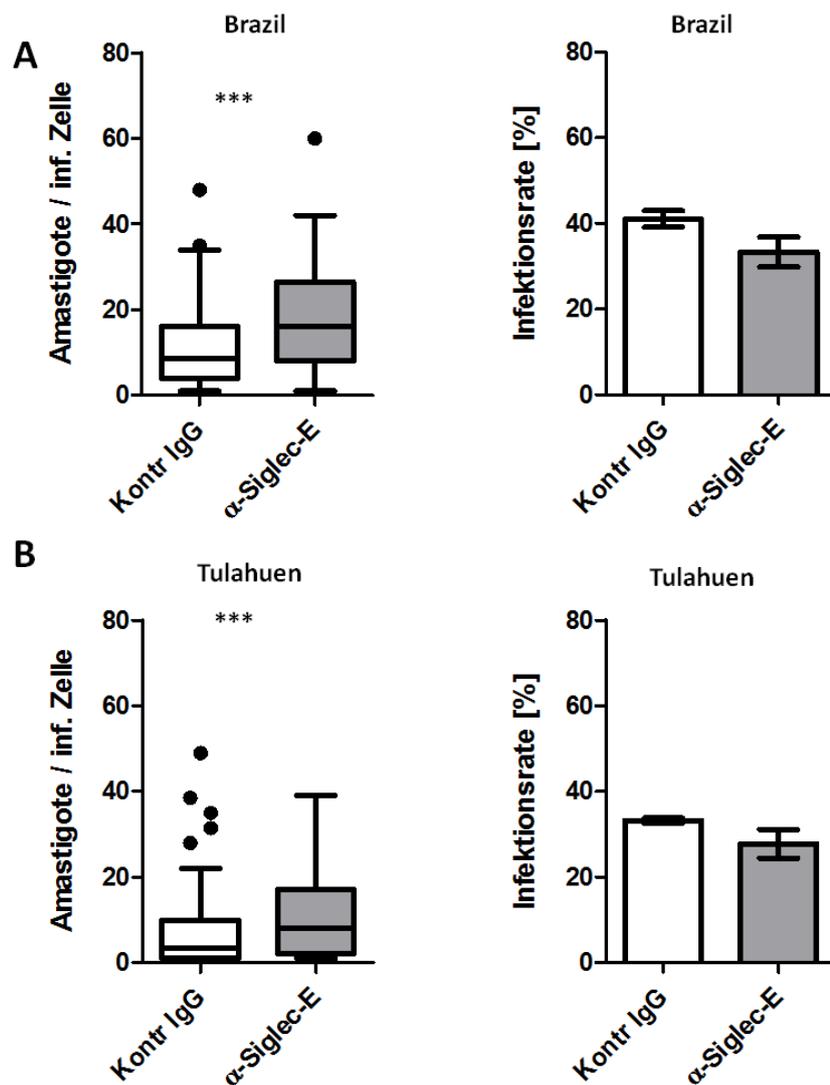


Abb. 27: Anzahl der Parasiten je infizierter Zelle und Infektionsraten von BMDMs

BMDMs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit 5 μ g anti-Siglec-E oder mit einem unspezifischen Kontrollantikörper inkubiert. Anschließend wurden die BMDMs Trypanosomen ($2 \cdot 10^5$ Parasiten/well) des Brazil (A) oder des Tulahuen (B) Stammes aus der Hg 39 Kultur infiziert und 72 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi, Phalloidin und einem anti-*T. cruzi* Serum, sowie einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt. Es wurde die Infektionsrate mittels Auszählung bestimmt. Zusätzlich wurde ermittelt wie viele Amastigote pro infizierter Zelle vorhanden waren. **A:** Infektion von BMDMs mit Trypanosomen des Brazil Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). **B:** Infektion von BMDMs mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). Dies ist eine Beispiel-Darstellung von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *Students-t-test*: *** $p \leq 0.005$

Auch bei der Infektion von BMDMs zeigte sich, dass die anti-Siglec-E behandelten Proben eine signifikante Erhöhung der Amastigoten-Anzahl aufwiesen (Abb. 27). Die Infektionsraten bewegten sich zwischen 30-40% und waren in den mit dem Kontroll- oder dem anti-Siglec-E Antikörper behandelten Proben vergleichbar. Die Auszählung zeigte für beide Trypanosomen Stämme einen signifikanten Anstieg der Parasitenlast pro Zelle. Auch in diesem Experiment handelte es sich um eine Infektion mit Trypanosomen aus der Hg 39 Zellkultur.

Um im weiteren Verlauf zu analysieren, ob auch die *T. cruzi* Infektion mit Trypanosomen, welche aus dem Blut einer infizierten Maus isoliert wurden, zu diesem Effekt nach anti-Siglec-E Behandlung führte, wurde dieses Experiment mit Trypanosomen aus dem Blut wiederholt. Da Trypanosomen des Tulahuen Stammes im Vergleich zu *T. cruzi* Brazil zu einer höheren Parasitämie führen und sich somit in einer größeren Anzahl aus dem Serum isolieren lassen, wurden im Folgenden BMDCs und BMDMs mit diesem *T. cruzi* Stamm infiziert. Anschließend wurde die Anzahl an Amastigoten pro infizierter Zelle und die Infektionsrate bestimmt.

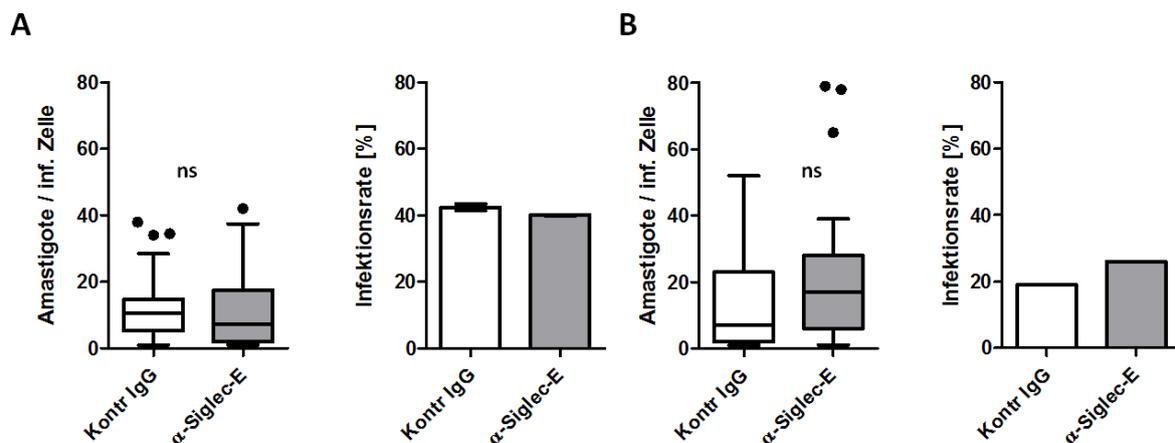


Abb. 28: Infektion von BMDCs und BMDMs mit Trypanosomen aus Blut infizierter C57BL/6 Mäuse

BMDCs und BMDMs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit 5 µg anti-Siglec-E oder mit einem unspezifischen Kontrollantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes, welche aus dem Blut infizierter C57BL/6 Mäuse isoliert wurden, infiziert und 72 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi gefärbt. Es wurde die Infektionsrate mittels Auszählung bestimmt. Zusätzlich wurde ermittelt wie viele Amastigote pro infizierter Zelle vorhanden waren. **A:** Infektion von BMDCs mit *T. cruzi* Tulahuen aus dem Blut. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). **B:** Infektion von BMDMs mit *T. cruzi* Tulahuen aus dem Blut. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). Die statistische Analyse erfolgte mit dem *Students-t-test*: $p > 0.05$ n.s (nicht signifikant)

In Abb. 28 ist zu erkennen, dass die Infektion mit Trypanosomen aus dem Blut infizierter Mäuse nicht zu einem signifikanten Anstieg der Amastigoten-Anzahl in den anti-Siglec-E behandelten Proben führte. Dies war für BMDCs und BMDMs der Fall. Die Infektionsraten lagen bei 40% (BMDCs) bzw. 20% (BMDMs) und waren vergleichbar.

Da die verwendete Verdünnung der Trypanosomen, die aus dem Blut einer infizierten C57BL/6 Maus isoliert wurden, auch Serumbestandteile (Zytokine) enthielt, welche die anschließende Zytokinmessung im *in vitro* Assay beeinflussen könnten, sollten in einem weiteren Experiment zur Isolation von Trypanosomen aus dem Blut Rag-1 defizienten Mäuse verwendet werden. Diese Rag-1 defizienten Mäuse können keine adaptive Immunantwort gegen die *T. cruzi* Infektion ausbilden, was nach *T. cruzi* Infektion zu einer sehr hohen Parasitämie führt. Zudem sind durch die fehlende adaptive Immunantwort auch weniger Zytokine im Serum zu erwarten. Da eine hohe Anzahl an Parasiten aus Rag-1 defizienten Mäusen isoliert werden kann, konnten die Trypanosomen vor der Infektion abzentrifugiert werden. Somit konnte ein Effekt durch das Vorhandensein von Serumbestandteilen in den Proben, die die *in vitro* zu infizierenden Zellen stimulieren können, ausgeschlossen werden.

Ob die Sialylierung von *T. cruzi* einen Einfluss auf den hohen Anstieg der Amastigoten Anzahl nach anti-Siglec-E Zugabe hat, sollte zusätzlich untersucht werden. Hierfür wurden die Parasiten vor der Infektion mit Laktose inkubiert, was eine Desialylierung zur Folge hat. Die *T. cruzi* Trans-Sialidase (TS), ein in der Einleitung ausführlich beschriebenes Enzym (1.3.4, S.22), kann Sialinsäuren auf die Parasitenoberfläche übertragen. Da die TS ein Enzym ist, das bidirektional Sias transferieren kann, wird durch die Zugabe von Laktose, einer guten Akzeptorstruktur für Sias, eine Desialylierung induziert. Ist die TS aktiv, findet eine Desialylierung der Parasiten in Anwesenheit von Laktose statt.

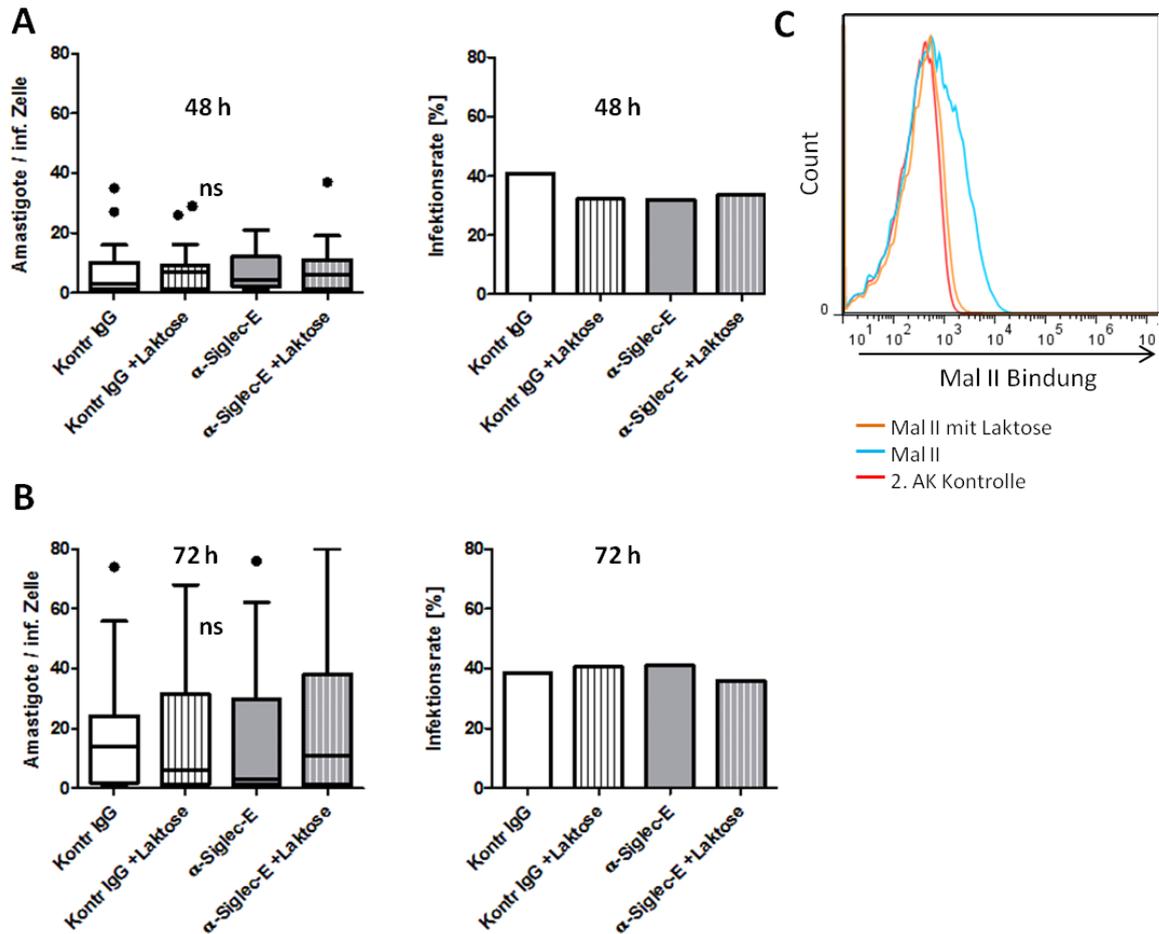


Abb. 29: Infektion von BMDCs mit *T. cruzi* Trypanosomen aus dem Blut infizierter Rag-1 defizienter Mäuse

BMDCs wurden in Chamberslides kultiviert und 1 h vor der Infektion mit 5 μ g anti-Siglec-E oder mit einem unspezifischen Kontrollantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes, welche aus dem Blut infizierter Rag-1 defizienter Mäuse isoliert wurden, infiziert. Zur Desialylierung der Trypanosomen wurde ein Ansatz jeweils unter Zugabe von Laktose kultiviert. Die Proben wurden 48 h und 72 h nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit Dapi zur Auszählung gefärbt. Es wurde die Infektionsrate mittels Auszählung bestimmt. Zusätzlich wurde ermittelt wie viele Amastigoten pro infizierter Zelle vorhanden waren. **A:** 48 h Werte der BMDC Infektion mit aus Blut isolierten Trypanosomen des Tulahuen Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). **B:** 72 h Werte der BMDC Infektion mit aus Blut isolierten Trypanosomen des Tulahuen Stammes. Darstellung der Amastigoten pro infizierter Zelle (links) und Infektionsrate (rechts). **C:** Nachweis der erfolgreichen Desialylierung der Trypanosomen vor der Infektion durch Zugabe von Laktose. Sekundär Antikörper Kontrolle (rote Linie), Mal II Bindung an sialylierte Trypanosomen (blaue Linie) und Mal II Bindung an desialylierte Trypanosomen nach Laktose Behandlung (orange Linie).

In Abb. 29 ist gezeigt, dass die Infektion mit Trypanosomen, die aus Rag-1 defizienten Mäusen isoliert wurden, zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den zu vergleichenden Proben führt. Zudem fällt auf, dass die Desialylierung durch Zugabe von Laktose keinen Effekt auf die Infektionsrate bzw. auf die Amastigoten-Anzahl hat. Die Infektionsraten lagen bei 30-40% und waren in allen Proben vergleichbar. Der in Abb. 29 C dargestellte Nachweis zur Desialylierung der Trypanosomen durch Inkubation

mit Laktose zeigt, dass die Bindung der sialylierten Parasiten an das Lektin Mal II nach Laktose Zugabe abnimmt. So konnte die Bindung des Lektins Mal II, welches α -2,3-verknüpfte Sialinsäuren erkennt, an die aus dem Blut isolierten Trypanosomen erfolgreich durch die Inkubation mit Laktose verhindert werden. Dies zeigt, dass die Trans-Sialidase aktiv ist und Sialinsäuren auf die Akzeptorstrukturen (Laktose) von der Parasitenoberfläche überträgt, wenn Laktose im Überschuss vorhanden ist. Ob die Trypanosomen trotz Zugabe von Laktose zum Medium der infizierten BMDCs resialyliert wurden, bevor die Infektion stattfand, ist nicht auszuschließen.

4.3.4 Anti-Siglec-E führt zu einer signifikanten Reduktion inflammatorischer Zytokine

Um den Einfluss von anti-Siglec-E genauer charakterisieren zu können, wurden die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen (BMDCs und BMDMs) auf das Vorhandensein von Zytokinen untersucht. Die inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12, welche von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden, wurden mittels CBA (Cytometric Bead Array) im Durchflusszytometer gemessen und an Hand einer Standardkurve wurde die jeweilige Konzentration der verschiedenen Zytokine bestimmt. Zunächst sollten die Zytokinprofile der Zellen, die mit Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur infiziert wurden, untersucht werden. Hierbei wurden die mit dem Kontroll-Antikörper und die mit anti-Siglec-E behandelten Proben verglichen.

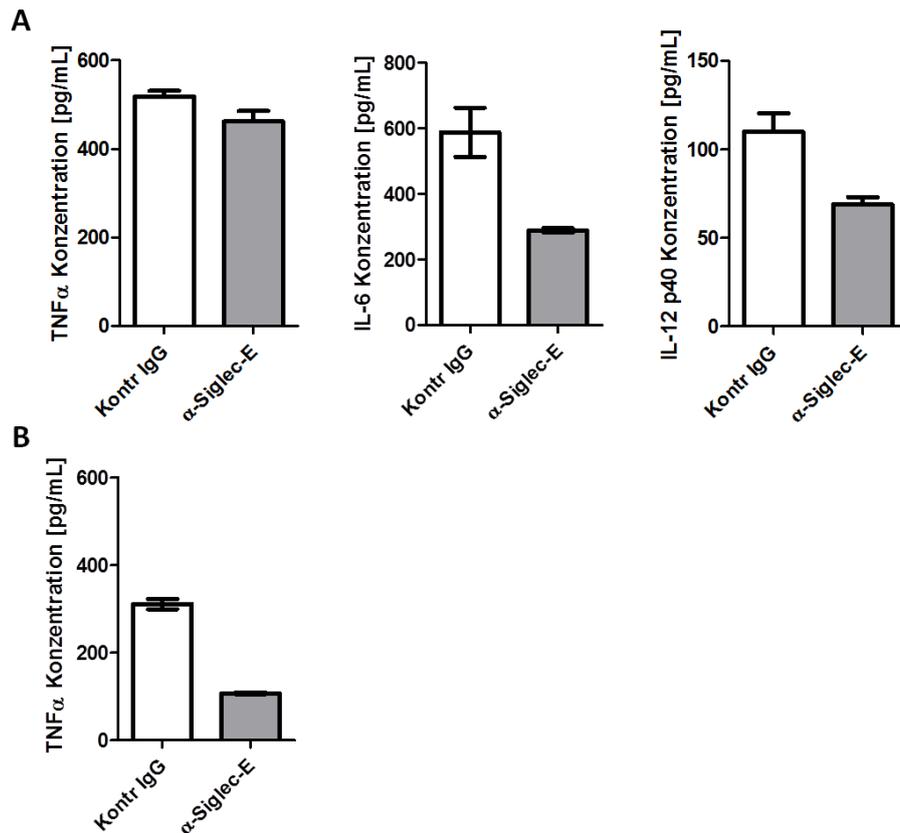


Abb. 30: Zytokinprofil von *T. cruzi* Tulahuen (Hg 39 Kultur) infizierten BMDCs und BMDMs

BMDCs oder BMDMs wurden mit Trypanosomen des Tulahuen oder Brazil (nicht gezeigt) Stammes aus der Hg 39 Kultur infiziert. Vorher wurden die Zellen mit 5 µg anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper für 1 h inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zur Zytokinmessung mittels CBA verwendet. **A:** Darstellung der Zytokinkonzentrationen (TNF-α, IL-6 und IL-12) von infizierten BMDCs unter Zugabe von anti-Siglec-E oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper. **B:** Darstellung der Zytokinkonzentration (TNF-α) von infizierten BMDMs unter Zugabe von anti-Siglec-E oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper. Die Konzentrationen von IL-6 und IL-12 lagen unter der Detektionsgrenze.

In Abb. 30 A ist zu erkennen, dass die BMDCs nach der Infektion mit Trypanosomen des Tulahuen Stammes in den mit anti-Siglec-E behandelten Proben weniger Zytokine produzieren als in der zu vergleichenden Kontrolle. Hierbei fällt auf, dass die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-12 um die Hälfte reduziert sind und die TNF-α Konzentration nur leicht gesenkt ist. Bei der Analyse des Zytokinprofils der BMDMs fiel auf, dass nur TNF-α in messbaren Mengen produziert wurde; die Konzentrationen von IL-6 und IL-12 lagen unter dem Detektionsbereich. Allerdings zeigt sich, dass die Zugabe von anti-Siglec-E zu einem ähnlichen Effekt führt und die Zytokinproduktion von TNF-α stark reduziert.

In einem weiteren Experiment wurde die NO-Produktion in den Zellkulturüberständen der BMDMs ermittelt. Die Messwerte lagen unter der Detektionsgrenze und zeigten keine Unterschiede in den zu vergleichenden Proben. Nach Stimulation mit einem

TLR Agonisten (LPS oder PamCys) war zwar eine NO-Produktion, aber keine Unterschiede zwischen den Kontroll- oder anti-Siglec-E-Antikörper behandelten Proben zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurden auch die Zellkulturüberstände der BMDCs untersucht, die mit Trypanosomen, die aus dem Blut von C57BL/6 oder Rag-1 defizienten Mäusen isoliert wurden, infiziert wurden. Hierfür wurde ebenfalls eine CBA Zytokinmessung der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12 durchgeführt.

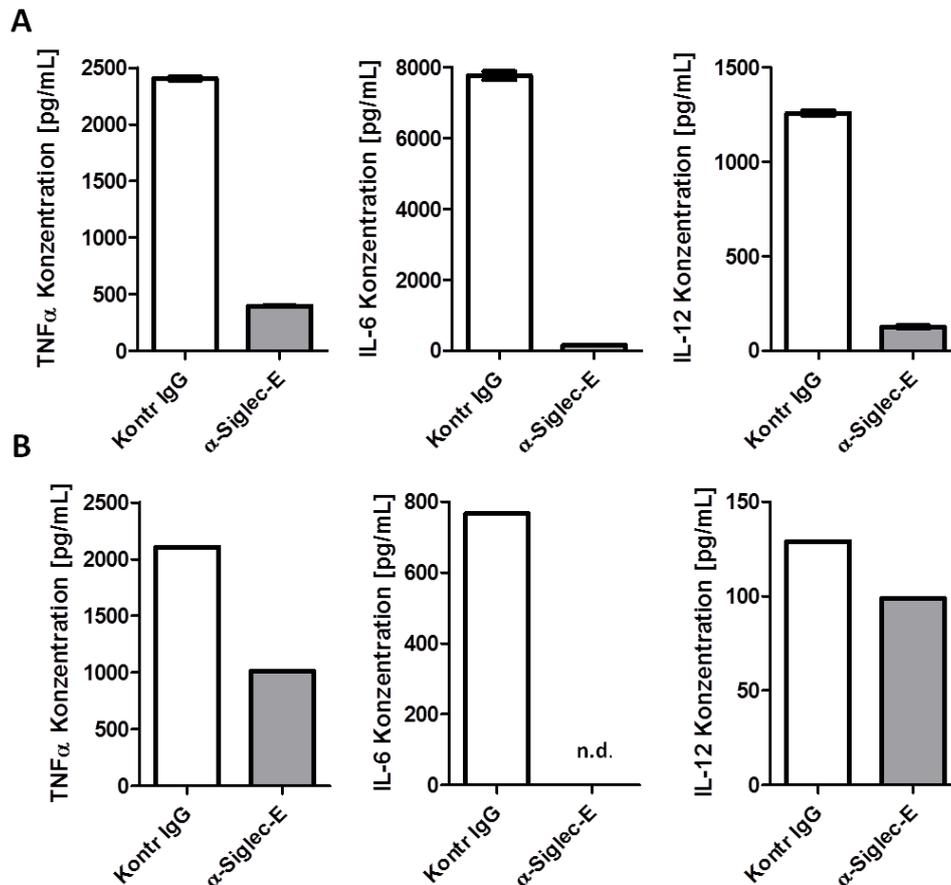


Abb. 31: Zytokinprofil von *T. cruzi* Tulahuen (aus Blut (C57BL/6 oder Rag-1 defizient) isoliert) infizierten BMDCs

BMDCs wurden mit aus Blut (C57BL/6 oder Rag-1 defizient) isolierten Trypanosomen des Tulahuen Stammes infiziert. Vorher wurden die Zellen mit 5 μ g anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper für 1 h inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zur Zytokinmessung mittels CBA verwendet. **A:** Darstellung der Zytokinkonzentrationen (TNF- α , IL-6 und IL-12) von infizierten BMDCs unter Zugabe von anti-Siglec-E oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper. Die Trypanosomen wurden aus einer infizierten C57BL/6 Maus isoliert und im *in vitro* Assay eingesetzt. **B:** Darstellung der Zytokinkonzentration (TNF- α , IL-6 und IL-12) von infizierten BMDCs unter Zugabe von anti-Siglec-E oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper. Die Trypanosomen wurden aus einer infizierten Rag-1 defizienten Maus isoliert und im *in vitro* Assay eingesetzt. IL-6 war in der anti-Siglec-E behandelten Probe nicht detektierbar (n.d.).

In Abb. 31 ist das Zytokinprofil der mit *T. cruzi* Tulahuen infizierten BMDCs gezeigt. Die Infektionen mit Trypanosomen, die aus C57BL/6 (Abb. 31 A) und aus Rag-1 defizienten Mäusen (Abb. 31 B) isoliert wurden, sind dargestellt. Es fällt auf, dass die Zytokinproduktion in allen Proben, die mit anti-Siglec-E behandelt wurden, sehr stark verringert sind. In Abb. 31 A ist zu sehen, dass die Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-12 nach anti-Siglec-E Zugabe auf dem Level der Detektionsgrenze reduziert ist. Dahingegen werden sehr hohe Mengen dieser Zytokine in den Kontroll-Antikörper inkubierten Proben produziert. Bei der Betrachtung der in Abb. 31 B dargestellten Zytokinprofile fällt auf, dass die infizierten BMDCs, die mit Trypanosomen aus Rag-1 defizienten Mäusen infiziert wurden, ähnliche Mengen TNF- α produzieren, die Konzentrationen von IL-6 und IL-12 hingegen um ca. das 100-fache geringer sind als die in Abb. 31 A dargestellten Zytokinmessungen. Dies lässt vermuten, dass in den Proben, die aus dem Serum von C57BL/6 Mäusen isoliert wurden, Serumbestandteile vorhanden waren, die die BMDCs zur Zytokinproduktion zusätzlich stimulierten. Dies wird unterstützt durch die Messung von IFN- γ , einem Zytokin, welches nicht von BMDCs, sondern von Zellen des adaptiven Immunsystems produziert wird. Dieses Zytokin war in hohen Mengen in den Zellkulturüberständen vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Behandlung mit anti-Siglec-E zu einer starken Reduktion der Zytokinproduktion nach Infektion mit *T. cruzi* führt. Dahingegen ist in den Kontroll-Proben zu erkennen, dass die Infektion mit *T. cruzi* ein starker Stimulus ist und zu einer beträchtlichen Zytokinproduktion der BMDCs führt. Da Trypanosomen viele PAMPs besitzen, die TLR-Signalwege stimulieren können, sollte in einem weiteren Experiment die Zytokinproduktion von BMDCs nach Stimulation mit dem TLR-2 Agonisten PamCys untersucht werden. Die Stimulation erfolgte wiederum unter Zugabe von anti-Siglec-E oder dem Kontroll-Antikörper. Es wurden die Zytokinprofile nach 6 h und 72 h analysiert. Zusätzlich zur PamCys Stimulation wurde auch der Effekt von anti-Siglec-E auf unstimulierten Zellen untersucht.

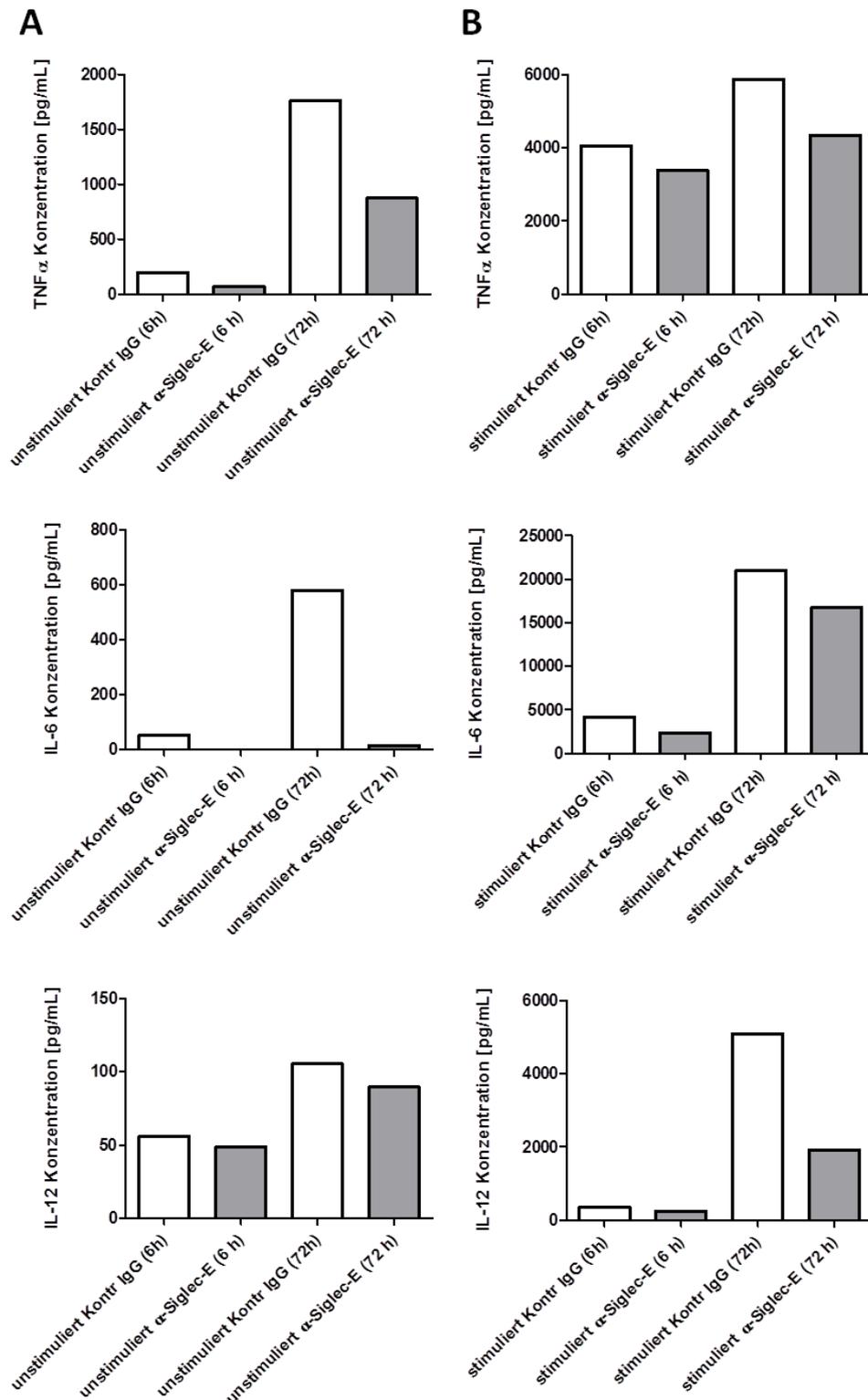


Abb. 32: Zytokinprofil von unstimulierten und PamCys stimulierten BMDCs nach 6h und 72h

BMDCs wurden für 6 h bzw. 72 h unter Zugabe von 5 μ g anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper kultiviert. Nach Stimulation mit dem TLR-2 Agonisten PamCys wurde die Zytokinproduktion (TNF- α , IL-6 und IL-12) mittels CBA analysiert. **A:** Zytokinprofil (TNF- α , IL-6 und IL-12) der unstimulierten BMDCs, die 6 h oder 72 h unter Zugabe von 5 μ g anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper kultiviert wurden. **B:** Zytokinprofil (TNF- α , IL-6 und IL-12) der PamCys (100 ng/mL) stimulierten BMDCs, die 6 h oder 72 h unter Zugabe von 5 μ g anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper kultiviert wurden.

In Abb. 32 sind die Zytokinprofile von unstimulierten und von PamCys stimulierten BMDCs nach 6 h und 72 h dargestellt. Hierbei wurden jeweils anti-Siglec-E inkubierte Proben mit den entsprechenden Kontrollen verglichen. Es fällt auf, dass unstimulierte Zellen eine geringe Zytokinproduktion aufweisen. In den anti-Siglec-E behandelten Proben wurde weniger TNF- α und IL-6 gemessen. Die IL-12 Produktion war in beiden unstimulierten Proben sehr niedrig und zwischen den anti-Siglec-E und Kontroll-Antikörper behandelten Proben vergleichbar. Nach Stimulation mit PamCys stieg die Produktion aller gemessenen Zytokine stark an (Abb. 32 B). Die anti-Siglec-E inkubierten Ansätze zeigten im Vergleich zu den Kontroll-Antikörper behandelten Proben eine leichte Reduktion für die Zytokine TNF- α und IL-6. Die IL-12 Produktion war 72 h nach anti-Siglec-E Zugabe stark verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein TLR-2 abhängiger Signalweg von der Siglec-E Ligation beeinflusst wird und zur Zytokin-Suppression führt.

4.3.5 Anti-Siglec-E hat keinen Einfluss auf die Lysosomen-Rekrutierung

Nach der *T. cruzi* Infektion von Zellen befinden sich die Trypomastigoten in einer so genannten parasitophoren Vakuole. Es ist bekannt, dass diese intrazelluläre Form der Parasiten Lysosomen rekrutieren kann und nach einigen Stunden mit diesen assoziiert ist [82, 100].

Da die Amastigoten-Anzahl nach anti-Siglec-E Zugabe, in den mit Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur infizierten Zellen, signifikant erhöht war, sollte untersucht werden, ob die Assoziation der Parasiten mit Lysosomen verändert war. Zur Analyse wurden BMDCs mit Trypanosomen des Brazil Stammes infiziert und die Lokalisation der intrazellulären Parasiten bestimmt. Zur Darstellung von Lysosomen-artigen Kompartimenten wurde die Färbung mit anti-Lamp-1 (*Lysosome associated Membrane Protein-1*) gewählt, welches ein spezifischer Lysosomenmarker ist.

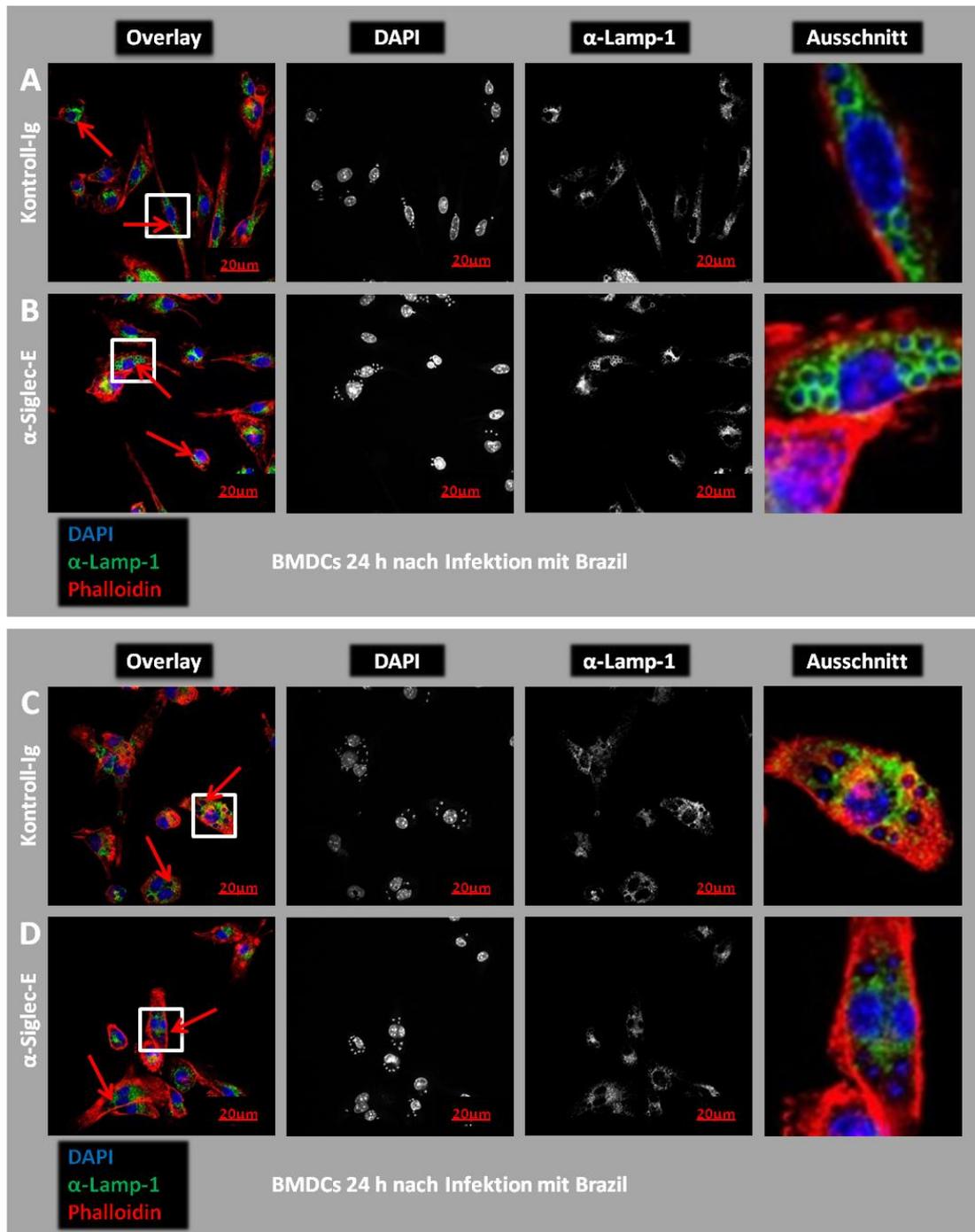


Abb. 33: Lokalisierung des Lysosomenmarkers Lamp-1 von *T. cruzi* Brazil infizierten BMDCs

BMDCs wurden in Chamberslides kultiviert und mit Trypanosomen des Brazil Stammes infiziert. Zuvor wurden die Zellen mit 5 μg anti-Siglec-E oder einem Kontroll-Antikörper inkubiert. 24 h nach der Infektion wurden die BMDCs fixiert, permeabilisiert und mit Dapi (blau), Phalloidin (rot) und einem anti-Lamp-1, sowie einem Alexa 488-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils die Overlays (links) in Farbe und der einzelnen Färbungen (Dapi und α -Lamp-1) in Graustufen (die rote Skalierung zeigt 20 μm an). Die weiß markierten Ausschnitte sind rechts vergrößert dargestellt.

A: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 24 h nach Infektion mit *T. cruzi* Brazil unter Zugabe des Kontroll-Antikörpers. Lamp-1 ist mit der parasitophoren Vakuole kolokalisiert.

B: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 24 h nach *T. cruzi* Brazil Infektion unter Zugabe von anti-Siglec-E. Lamp-1 ist mit der parasitophoren Vakuole kolokalisiert.

C: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 24 h nach *T. cruzi* Brazil Infektion unter Zugabe des Kontroll-Antikörpers. Die Parasiten sind nicht mit Lamp-1 assoziiert.

D: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme 24 h nach *T. cruzi* Brazil Infektion unter Zugabe von anti-Siglec-E. Die Parasiten sind nicht mit Lamp-1 assoziiert.

In Abb. 33 ist die Lokalisation von Lamp-1, einem spezifischen Lysosomenmarker, dargestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen den anti-Siglec-E und Kontroll-Antikörper behandelten Proben festgestellt werden.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass intrazelluläre Parasiten teilweise von Lamp-1 (grün) umgeben sind (Abb. 33 A und B). Jedoch sind in beiden Ansätzen auch gleichermaßen Parasiten zu sehen, die nicht mit Lamp-1 assoziiert sind (Abb. 33 C und D). Es wurden zehn zufällig ausgewählte Aufnahmen je Probe analysiert und verhältnismäßig gleiche Zahlen von Lamp-1 assoziierten und nicht-assoziierten Parasiten vorgefunden. Eine Auszählung ergab, dass unabhängig von der Antikörperbehandlung jeweils ca. 50% der Parasiten mit Lamp-1 kolokalisierten (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von anti-Siglec-E scheint somit keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Lysosomen zur parasitophoren Vakuole zu haben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zugabe eines anti-Siglec-E Antikörpers vor einer *T. cruzi* Infektion zu einer Reduktion der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12, sowie zu einem Anstieg der Amastigoten Anzahl pro infizierter Zelle führt. Die intrazelluläre Lokalisation der Trypanosomen war dahingegen durch die anti-Siglec-E Antikörper Behandlung nicht beeinflusst.

5 Diskussion

Über 25 Millionen Menschen sind dem Risiko einer *T. cruzi* Infektion ausgesetzt und ca. 10 Millionen Menschen in Süd- und Mittelamerika leiden an der von *T. cruzi* übertragenen Chagas-Krankheit. Gekennzeichnet ist diese chronische Infektionskrankheit durch eine lebenslange Persistenz der Parasiten und damit verbundenen gravierenden Organschädigungen. Mit jährlich ca. 10.000 Toten ist die Chagas-Krankheit weltweit eine der führenden Ursachen der infektiösen Kardiomyopathie mit tödlichen Folgen [158].

Trotz der von *T. cruzi* induzierten Aktivierung des Immunsystems, reicht die Immunabwehr häufig nicht aus den Parasiten vollständig zu eliminieren. So werden durch Proteine (z.B. Racemasen), die von *T. cruzi* sezerniert werden, Lymphozyten polyklonal aktiviert [159-162]. Die polyklonale Aktivierung von B-Zellen in der akuten Phase der Infektion führt zur Produktion von unspezifischen Antikörpern, die den Parasiten nicht opsonieren können [161, 163, 164]. Die Induktion von unspezifischen IgM-Pentameren bewirkt, dass spezifisch gegen *T. cruzi* gerichtete Antikörper nicht an die Parasitenoberfläche binden können [165]. Zudem konnten Risso et al. feststellen, dass die Sezernierung der löslichen Form der *Trans*-Sialidase (TS) zu einer starken Veränderung im Thymus führt, so dass die Reifung von T-Zellen gestört ist [120].

Anschließend an die anfängliche Aktivierung der Immunantwort setzt eine Phase der Immunsuppression ein, welche die Vermehrung und die Persistenz von *T. cruzi* in verschiedenen Organen ermöglicht. In dieser Phase werden Immunantworten gegen *T. cruzi* spezifische Antigene aber auch gegen Mitogene unterdrückt [166, 167]. Verschiedene durch *T. cruzi* induzierte Mechanismen tragen zur Immunsuppression bei. So wurde beschrieben, dass die Expression des IL-2-Rezeptors [168-170], sowie die Zytokinproduktion von IL-2 [171, 172] gehemmt sind. Da IL-2 für die klonale Expansion von T-Zellen notwendig ist, wird die T-Zellantwort gegen *T. cruzi* inhibiert.

Ein weiterer Evasionsmechanismus, der häufig von intrazellulären Pathogenen genutzt wird, ist die Reduktion von Oberflächenmolekülen zur Antigenpräsentation (MHC-Komplex) und zur T-Zell-Aktivierung, aber auch von proinflammatorischen Zytokinen. *Leishmania major* entgeht der Aktivierung von Makrophagen, in dem es durch Phagozytose von infizierten, apoptotischen Neutrophilen ohne ein inflammatorisches Signal aufgenommen wird [173]. Zudem wurde eine verschlechterte Kapazität zur Antigenpräsentation beschrieben [174]. Auch *T. cruzi* benutzt

verschiedene Mechanismen, um eine Immunantwort zu verhindern oder zu supprimieren. Camargo et al. konnten zeigen, dass metazyklische Trypomastigote Makrophagen infizieren können ohne die Produktion von IL-12 zu induzieren [175]. Dies ermöglicht *T. cruzi* sich nach der Infektion zu etablieren. Desweiteren wurde beschrieben, dass *T. cruzi* die TLR-induzierte Maturierung von DCs inhibieren kann. Diese Inhibition ist durch eine Reduktion von MHC-I und CD40, sowie der Zytokine IL-12, TNF- α und IL-6 gekennzeichnet [176, 177].

Erdmann et al. konnten zeigen, dass ein hochsialylierter *T. cruzi* Stamm über die Interaktion mit Siglec-E die trypanozide Immunantwort supprimieren kann [78]. Auch andere sialylierte Pathogene interagieren mit Siglecs auf Immunzellen. So wurde die Wechselwirkung zwischen Siglec-9 und Gruppe B Streptokokken [61], sowie die Interaktion von *Neisseria meningitidis* mit Sialoadhesin bzw. Siglec-5 beschrieben [62]. Da Siglecs auf fast allen Immunzellen differenziell exprimiert werden und auf Grund des Vorhandenseins von inhibitorischen Signalmotiven mit der Immunregulation assoziiert werden [21], bieten Siglecs einen guten Angriffspunkt für Pathogene die Immunantwort zu modulieren. *T. cruzi* exprimiert ein einzigartiges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS), so dass der Parasit über abgespaltene Sialinsäuren, die auf die Oberfläche des Parasiten transferiert wurden, mit Siglecs interagieren kann.

Die Interaktion von *T. cruzi* mit dem inhibitorischen Immunregulator Siglec-E sollte in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden. Hierzu wurde die hochdynamische Sialylierung der Parasiten untersucht, da sialylierte Oberflächenstrukturen von *T. cruzi* die Voraussetzung für eine Siglec-Sialinsäure-Interaktion sind.

5.1 Sialylierung von *T. cruzi*

T. cruzi besitzt ein einmaliges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS). Die TS kann Sialinsäuren von Wirtszellen abspalten und sie auf Akzeptorstrukturen (Mucine) der *T. cruzi* Oberfläche übertragen [125, 126, 178-181]. Viele Pathogene nutzen sialylierte Oberflächenproteine, um die Bindung des Komplementfaktors C3b und somit die Opsonierung durch das Komplementsystem zu verhindern [75, 76]. Andererseits wurde gezeigt, dass *T. cruzi* direkt mit Siglec-E interagieren und die protektive Immunantwort supprimieren kann. So führt die Interaktion mit Siglec-E auf DCs zur verminderten IL-12-Produktion. Dadurch können Th1-Zellen schlechter aktiviert werden und weniger IFN- γ produzieren, welches essentiell für die Abwehr gegen *T. cruzi* ist [78].

Risso et al. stellten fest, dass die TS-Aktivität und somit die Sialylierung der Parasiten

mit der Virulenz von verschiedenen *T. cruzi* Stämmen korreliert [120].

Da die Sialylierung von *T. cruzi* ein entscheidender Virulenzfaktor für diesen sich intrazellulär vermehrenden Parasiten ist, sollten die Trypanosomen aus der Zellkultur, sowie die *T. cruzi* Isolate aus infizierten Mäusen auf ihren Sialinsäuregehalt analysiert werden.

Interessanterweise waren Trypanosomen aus der Hg 39 Zellkultur nach einer Passage auf diesen Zellen nicht mehr sialyliert, was durch die Bindung von Mal II, einem Lektin, das α -2,3-verknüpfte Sialinsäuren erkennt, gezeigt wurde. Verschiedene Kulturbedingungen (Hg 39 Zellen, L929 Fibroblasten; RPMI-Medium, IMDM-Medium; 5-10% FCS-Gehalt, Zusatzstoffe für das Kulturmedium), sowie die Verwendung von neuen *T. cruzi* Stocks konnten diesen Zustand nicht revidieren. Dies war für den seit Jahren am Bernhard-Nocht-Institut verwendeten *T. cruzi* Tulahuen Stamm, sowie für weitere *T. cruzi* Stämme (z.B. *T. cruzi* Brazil und *T. cruzi* Y) der Fall.

Allerdings konnte eine Resialylierung der Parasiten beobachtet werden, wenn *T. cruzi* auf BMDCs kultiviert wurde. Dies spricht dafür, dass die TS aktiv war und grundsätzlich eine Sialylierung der Parasiten unter den gewählten Kultivierungsbedingungen und dem anschließenden Vorgang bis zur Messung möglich war.

Auch Parasiten, die direkt aus dem Blut infizierter Mäuse isoliert wurden, waren sialyliert. Möglicherweise ist die Sialylierung der Parasiten mit einer Art „immunologischen Druck“ zu erklären. Die Hg 39 Zellen (Neuroblastom-Zellen) besitzen keine Abwehrmechanismen gegen *T. cruzi* und können über den Wundheilungsmechanismus infiziert werden. Dahingegen können BMDCs, sowie Makrophagen, Trypanosomen nach Aktivierung intrazellulär abtöten [149-152].

Parasiten einer infizierten Maus sind der Abwehr des gesamten angeborenen und adaptiven Immunsystems ausgesetzt. Man könnte somit annehmen, dass eine Sialylierung für die Parasiten von Vorteil ist, da sie einerseits über Siglec-E zu einer Inhibition der Zytokinproduktion führt [78] und andererseits die TS auch in anderen Zusammenhängen mit der Pathogenität der *T. cruzi* Stämme assoziiert ist. So wurde das Vorhandensein von Sialinsäuren auf der Parasitenoberfläche von Schauer et al. als essentiell für das Überleben von *T. cruzi* im Säugetierwirt beschrieben [121].

Erstaunlicherweise konnten Mäuse mit den sehr schwach sialylierten Trypanosomen aus der Hg 39 Kultur infiziert werden und dies führte zu einer sehr hohen Parasitämie. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die Parasiten sehr schnell resialyliert wurden und somit die ursprüngliche Virulenz wiederhergestellt war. Die

Isolation der Parasiten aus dem Blut infizierter Mäuse und die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die Trypomastigoten wieder sialyliert waren und an das Lektin Mal II gebunden haben.

Durch die Kollaboration mit einem argentinischen Labor (*Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben"*) konnten weitere *T. cruzi* Stämme analysiert werden. So wurden in Buenos Aires (Argentinien) fünf verschiedene *T. cruzi* Stämme kultiviert und anschließend die Sialylierung untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse mit einem Siglec-E-Ig Fusionsmolekül zeigt, dass die Parasiten aus der Zellkultur sialyliert waren und spezifisch an Siglec-E gebunden haben. Hierbei fiel auf, dass die verschiedenen *T. cruzi* Stämme einen Unterschied in der Sialylierung aufwiesen. So war *T. cruzi* Brazil stark sialyliert, wohingegen *T. cruzi* R.A. nur eine sehr schwache Bindung im Durchflusszytometer zeigte. Um eine direkte Korrelation zwischen der Bindung an Siglec-E-Ig und der Virulenz der verwendeten Stämme herstellen zu können, müssten die durchflusszytometrischen Messungen mehrfach wiederholt werden, um transiente Unterschiede in der Sialylierung auszuschließen. Die gegebenen Arbeitsumstände in Argentinien sowie die limitierte Zeit des Auslandsaufenthalts, ließen eine Wiederholung der Experimente leider nicht zu.

Die Einordnung der verwendeten *T. cruzi* Stämme gestaltet sich schwierig. Die anfängliche Zuordnung von *T. cruzi* in zwei phylogenetische Hauptgruppen [134] wurde im Jahr 2009 durch eine sechsgliedrige Unterteilung ersetzt [137]. Dennoch lassen sich die Stämme TcII-TcVI der Gruppe der *T. cruzi* Stämme zuordnen, die dem domestischen Infektionszyklus angehören. Diese werden mit den Symptomen der Chagas-Krankheit assoziiert, wohingegen TcI dem sylvatischen Infektionszyklus zugeordnet wird [141, 142].

Der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Stamm *T. cruzi* Tulahuen gehört der Gruppe TcVI an. Trypanosomen dieser Kategorie sind hauptsächlich in den nördlichen Regionen Chiles und Argentinens, sowie in den südlichen Regionen Perus und Brasiliens als auch in Bolivien verbreitet [136].

Der zudem verwendete Stamm *T. cruzi* Brazil wurde nicht in der von Zingales et al. veröffentlichten Tabelle aufgelistet [137]. *T. cruzi* Brazil ist seit 1982 am *Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben"* und wurde von Dr. Thomas M. Trischmann erhalten. Die Herkunft dieses *T. cruzi* Stammes lässt sich wahrscheinlich auf Dr. William Hanson zurückführen, der bereits 1976 mit *T. cruzi* Brazil experimentierte [182]. Seither wurde *T. cruzi* Brazil durch Zellkulturpassagen erhalten. Im Allgemeinen

wird der *T. cruzi* Brazil Stamm mit den typischen Megasyndromen der Chagas-Krankheit assoziiert [183].

Im Vergleich zur Infektion mit *T. cruzi* Tulahuen führt die Infektion von *T. cruzi* Brazil nur zu einer leichten Parasitämie in C57BL/6 Mäusen. Beide Stämme persistieren im Wirt. Wobei eine *T. cruzi* Tulahuen Infektion häufig letal in der akuten Phase verläuft, dahingegen mit *T. cruzi* Brazil infizierte Mäuse die akute Phase immer überleben. Trotz dieses verschiedenen Phänotyps konnte kein signifikanter Unterschied in der Sialylierung und der Bindung an das Lektin Mal II festgestellt werden.

Viele zur experimentellen Analyse verwendeten *T. cruzi* Stämme sind über mehrere Jahrzehnte in Zellkulturen oder werden durch Mauspassagen erhalten. Ob sich diese Stämme in ihrer Virulenz und Sialylierung von *T. cruzi* Patientenisolaten unterscheiden, wäre interessant experimentell zu analysieren. Der Zugang zu Patientenproben war trotz der Kollaboration mit Argentinien nicht möglich. Zudem ist es selten, dass Patienten während der akuten Phase, in der viele Trypomastigote im Blut vorhanden sind, die Ambulanz des *Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben"* aufsuchen, da diese häufig symptomfrei verläuft.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen zur Sialylierung von *T. cruzi*, dass die TS, der zu analysierenden *T. cruzi* Stämme, zwar aktiv war, aber die Trypanosomen der Hg 39 Kultur nicht sialyliert waren. Sobald ein immunologischer Druck auf die Parasiten durch die Verwendung von DCs wirkte, konnte eine transiente Resialylierung beobachtet werden. Auch Trypanosomen, die aus infiziertem Blut von Mäusen isoliert wurden, waren sialyliert. Dies spricht dafür, dass die Sialylierung im Säugetierwirt von Vorteil ist und unterstreicht die Aussage von Schauer et al., dass die TS-Aktivität von *T. cruzi* essentiell für das Überleben im Wirt ist [121].

5.2 Siglec-E auf Neutrophilen Granulozyten (PMNs)

PMNs sind die Immunzellen, die als erstes mit einem Pathogen am Infektionsort in Kontakt kommen. Sie können Pathogene phagozytieren und über die Bildung von ROS schnell abtöten, um eine Verbreitung der Pathogene zu verhindern. Zudem produzieren sie Zytokine, die weitere Immunzellen zum Infektionsort rekrutieren. Eine weitere besondere Funktion ist die Bildung von DNA NETs. Diese dienen der zusätzlichen Opsonierung von Pathogenen, welche in der hoch geladenen DNA hängen bleiben und so unfähig gemacht werden andere Zellen zu infizieren [6].

Die Rolle von Siglec-E auf PMNs sollte im Zusammenhang mit einer *T. cruzi* Infektion analysiert werden. Bisher ist bekannt, dass verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Samonella typhimurium* und *Shigella flexneri*), sowie Pilze (*Candida albicans*) bei PMNs die Bildung von NETs auslösen können [6, 184]. Die Verwendung von *life imaging* und neuste Erkenntnisse aus der Intravital-Mikroskopie konnten beweisen, dass die Bildung von NETs und das Opsonieren der Pathogene ein aktiver Prozess ist, der von PMNs gerichtet ausgeführt wird [185, 186]. So konnten Bruns et al. mittels *in vivo* 2-Photon-Mikroskopie im Mausmodell zeigen, dass der Pilz *Aspergillus fumigatus* im Lungengewebe von PMNs durch NETs opsoniert und durch fungizide Proteine abgetötet wird [186].

Grundsätzlich ist die Arbeit mit murinen PMNs erschwert, da im Vergleich zu humanen PMNs nur wenige Zellen dieser Population, 10-25% aller peripheren Blutleukozyten, im Blut vorhanden sind. Viele Studien zur NET-Produktion oder auch der ROS Bildung werden mit humanen PMNs aus dem Blut durchgeführt, da diese 65-75% ausmachen. Ermert et al. konnten zeigen, dass sich der Aktivierungszustand von humanen und murinen PMNs stark unterscheidet [187]. So können bei humanen PMNs nach vierstündiger PMA Stimulation ca. 80% NETs nachgewiesen werden [188], wohingegen bei murinen PMNs die NET-Produktion erst nach 16 Stunden vollständig ist und nur einen durchschnittlichen Wert von 30% NETs erreicht [187].

Zusätzlich sind Unterschiede zu beobachten, wenn die Zellen aus dem Blut oder dem Knochenmark isoliert werden. Die Isolation von PMNs aus dem Knochenmark bietet sich jedoch an, da hier große Mengen dieser Zellpopulation vorhanden sind [189]. Die PMNs des Blutes zeigen einen voraktivierten Zustand, dahingegen sind PMNs des Knochenmarks nicht aktiviert und brauchen vermutlich einen stärkeren Reiz und eine längere Inkubationsdauer zur vollständigen Aktivierung [187].

Im Jahr 2007 beschrieben Carlin et al., dass das sialylierte kapsuläre Polysaccharid (CPS) der Gruppe B Streptokokken (GBS) mit Siglecs interagiert [60]. Daraufhin veröffentlichten sie 2009, dass das humane Siglec-9 im direkten Zusammenhang mit der NET-Produktion von PMNs steht. Wurde die Wechselwirkung zwischen Siglec-9 und dem sialylierten CPS von GBS durch einen Antikörper blockiert, stieg die Anzahl der NETs sowie die Produktion von ROS deutlich an [61]. Dies lässt auf einen inhibitorischen Effekt der Ligation von Siglec-9 durch das CPS schließen und ist ein gutes Beispiel für ein molekulares Mimikry von Pathogenen, um die inhibitorische Funktion von Siglecs auszunutzen und sich einen Überlebensvorteil zu schaffen.

Daher sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob das murine Siglec-E der PMNs auch einen inhibitorischen Effekt auf die NET-Produktion bzw. auf die Entstehung von ROS hat. Es konnte gezeigt werden, dass in den anti-Siglec-E Antikörper behandelten Proben tendenziell weniger NETs produziert wurden. Doch die Präparation der leicht zu aktivierenden PMNs führte auch in den unstimulierten Kontrollen zur NET-Produktion. Ähnliche Probleme traten auch mit einer weiteren hoch sensitiven Methode (*dsDNA pico green Kit*) zur Bestimmung geringer Mengen an DNA im Probenüberstand auf. Der Hintergrund unstimulierter PMNs war so hoch, dass die gemessenen Daten nicht auswertbar waren (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurde untersucht, ob *T. cruzi* durch die Bildung von NETs opsoniert wird und somit eine Infektion weiterer Zellen verhindert werden kann. Hierbei fiel auf, dass Trypanosomen mit NETs assoziiert waren. Diese Daten können als wichtiger Hinweis gewertet werden, dass *T. cruzi* durch NETs opsoniert werden kann. Um vollständig zu beweisen, dass dieser Vorgang gerichtet und *T. cruzi* spezifisch ist, wäre es vorteilhaft eine Analyse mittels *live imaging* und einem extrazellulären DNA Farbstoffes (z.B. Sytox orange) hinzuzuziehen. Die Anwendung der lebend Mikroskopie setzt jedoch eine S 3-Anlage mit dementsprechender Ausstattung voraus, da es sich bei *T. cruzi* um ein Pathogen der Sicherheitsstufe 3 (S 3) handelt. Aus diesem Grund konnte eine spezifische mikroskopische Analyse nicht durchgeführt werden.

Da das Experimentieren mit murinen PMNs, durch die geringe Anzahl dieser Zellen im Blut, sowie durch die veränderte Aktivierungskinetik von PMNs aus dem Knochenmark, beeinträchtigt ist, fiel die Quantifizierung der NETs schwer. Daher wurde eine weitere Funktion der PMNs, die ROS Produktion, analysiert. Hierbei erfolgte die Messung von ROS unter dem Einfluss des anti-Siglec-E Antikörpers. Es konnten keine Unterschiede nach PMA Stimulation festgestellt werden. Möglicherweise war der starke Stimulus von

PMA ausreichend, um einen geringfügigen Effekt des inhibitorischen Moleküls Siglec-E zu überlagern.

Die anschließend durchgeführten *in vivo* Experimente sollten klären, ob PMNs eine wichtige Rolle während der *T. cruzi* Infektion spielen. Mit einem anti-Gr-1 Antikörper wurden alle Gr-1⁺ Zellen depletiert. Da Gr-1 nicht ein hochspezifischer Oberflächenmarker auf PMNs ist, sondern auch auf sogenannten inflammatorischen Monozyten exprimiert wird [190], wurden auch diese Zellen vor der *T. cruzi* Infektion depletiert. Die Depletion der Gr-1⁺ Zellen zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Parasitämie im Verlauf einer *T. cruzi* Tulahuen Infektion. Chen et al. führten ein ähnliches Experiment mit C57BL/6 und BALB/c Mäusen durch. Die Infektion erfolgte ebenfalls mit *T. cruzi* Tulahuen. Hier wurde gezeigt, dass die C57BL/6 Mäuse nach Depletion von PMNs einen Überlebensvorteil hatten und eine geringere Parasitämie im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten [191]. Zur Depletion der PMNs wurde der gleiche anti-Gr-1 Antikörper verwendet und obwohl auch der gleiche Parasiten Stamm verwendet wurde, könnten Unterschiede in der Infektiösität der jeweiligen Trypomastigoten aus den verschiedenen Laboren vorliegen.

Zudem wurden Wildtyp Mäuse mit MPO-defizienten Mäusen in der *T. cruzi* Infektion verglichen. Eine MPO Defizienz wird bei Menschen mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber *Candida*-Infektionen in Verbindung gebracht [192, 193] und MPO-defiziente Mäuse sind bestimmten bakteriellen und fungiziden Infektionen gegenüber suszeptibler [194]. Metzler et al. beschrieben, dass beim Menschen das Vorhandensein von MPO für die Entstehung von NETs notwendig ist [195]. Patienten mit septischer Granulomatose (CGD = chronic granulomatous disease) können keine NETs bilden, was auf eine Mutation zurückzuführen ist, so dass die NADPH-Oxidase keine Substrate für die MPO generieren kann. Dieser Effekt lässt sich durch die Zugabe von exogenem Wasserstoffperoxid aufheben, was vermuten lässt, dass ROS für die Entstehung von NETs verantwortlich sind [188].

Der Vergleich von MPO-defizienten und Wildtyp Mäusen zeigte keine Unterschiede, so dass die Defizienz von MPO scheinbar keinen Einfluss auf die Parasitämie einer *T. cruzi* Infektion hat. Zudem konnte festgestellt werden, dass murine MPO-defiziente PMNs in der Lage waren NETs zu bilden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise unterscheidet sich die Aktivierung von humanen und murinen PMNs in Bezug auf MPO als notwendigen Faktor für die NET-Produktion.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass PMNs im Verlauf einer *T. cruzi* Infektion nur eine untergeordnete Rolle spielen und somit die Funktion von Siglec-E auf PMNs für die Parasitämie einer *T. cruzi* Infektion unbedeutend scheint.

Im weiteren Verlauf wurde der Schwerpunkt auf andere Zellen (Antigenpräsentierende Zellen, APZ) des angeborenen Immunsystems gelegt. APZ sind maßgebend an der Bekämpfung gegen eine *T. cruzi* Infektion beteiligt und stellen zudem die Verbindung zur adaptiven Immunabwehr dar, welche für die Abwehr gegen eine *T. cruzi* Infektion essentiell ist.

5.3 Siglec-E auf Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs)

Makrophagen und DCs sind Immunzellen, die als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) die Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort darstellen. Durch die Erkennung von PAMPs über PRRs (z.B. TLRs) werden diese Zellen aktiviert und zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen angeregt. Durch Chemokine werden weitere Immunzellen an den Infektionsort rekrutiert. Die Zytokine, IL-6, IL-12 und TNF- α , induzieren die inflammatorische Immunantwort und führen dazu, dass Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden. Die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch die Ausschüttung von IL-12 ist essentiell für eine effektive Immunabwehr bei einer *T. cruzi* Infektion [148]. Aktivierte T-Zellen produzieren nach spezifischer Aktivierung durch APZ IFN- γ , ein Zytokin, das wiederum auf APZ wirkt und zu einem verbesserten Abtöten der intrazellulären Parasiten führt [149-152].

In den mit BMDMs und BMDCs durchgeführten Experimenten, sollte die inhibitorische Wirkung von Siglec-E durch die Verwendung eines anti-Siglec-E Antikörpers analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der anti-Siglec-E Antikörper an die Bindungsstelle von Siglec-E bindet und die Bindung an Sialinsäureliganden auf CHO Zellen blockiert. Ob es sich hierbei um eine einfache Blockade der Bindungsstelle oder um eine Ligation von Siglec-E und somit eine Aktivierung des inhibitorischen Siglec-E Signalwegs handelt, sollte im Folgenden weiter analysiert werden.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Inkubation der Zellen mit einem anti-Siglec-E Antikörper während einer *in vitro* *T. cruzi* Infektion zu einer signifikanten Erhöhung der Amastigoten pro Zelle führte. Dies lässt vermuten, dass sich die Parasiten intrazellulär besser vermehren konnten, wenn ein über Siglec-E regulierter Signalweg durch eine Ligation mit dem spezifischen anti-Siglec-E Antikörper inhibiert wird. Die

erhöhte Anzahl der Amastigoten könnte einerseits auf eine gesteigerte Anzahl von Mehrfachinfektionen durch Trypomastigote zurückzuführen sein. Andererseits ist es vorstellbar, dass durch das inhibierende Signal von Siglec-E trypanozide Abwehrmechanismen der BMDMs bzw. BMDCs supprimiert werden und sich somit *T. cruzi* nach der Infektion besser vermehren kann. Der Zusammenhang zwischen der Regulation über Siglec-E und der erhöhten Anzahl von Parasiten in den infizierten Zellen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch wurde beschrieben, dass die Freisetzung von TNF- α synergistisch mit IFN- γ einen positiven Effekt auf die Erzeugung von antimikrobiellen Substanzen hat, welche Makrophagen und DCs zur trypanoziden Abwehr benötigen [196-198].

Da Siglec-E einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine hat [71], sollte analysiert werden, wie sich das Zytokinprofil *T. cruzi* infizierter BMDMs oder BMDCs verändert, wenn Siglec-E durch den spezifischen anti-Siglec-E Antikörper ligiert wird. Die Messung der Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-6 zeigte, dass nach Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers diese inflammatorischen Zytokine stark reduziert waren. Dahingegen wurden in den Kontroll-Antikörper behandelten Proben hohe Mengen der proinflammatorischen Zytokine während der *T. cruzi* Infektion freigesetzt. Dies zeigt, dass *T. cruzi* vermutlich über PAMPS, welche von TLR-2 oder TLR-9 erkannt werden, die Produktion der Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-6 induziert. Die Ligation von Siglec-E bewirkt, dass die TLR-induzierten Signalwege zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine inhibiert werden und somit weniger Zytokine im Zellkulturüberstand gemessen werden konnten. Boyd et al. beschrieben, dass durch TLR-Agonisten (LPS) induzierte TLR-Signalwege durch Siglec-E supprimiert werden können. Die Verwendung von LPS, einem TLR-4 Agonisten, führt zu einer erhöhten Expression und Phosphorylierung von Siglec-E, um im Gegenzug das TLR-induzierte Signal zu supprimieren und eine überschießende Immunantwort zu regulieren [71]. Da *T. cruzi* viele GPI-verankerte Oberflächenmoleküle besitzt, welche als PAMPs dienen, die über TLR-2 erkannt werden, sollte die Induktion von Zytokinen über den TLR-2 Signalweg untersucht werden. Die Stimulation mit dem TLR-2 Agonisten PamCys zeigte, dass nach der Ligation von Siglec-E die Zytokinproduktion von TNF- α , IL-12 und IL-6 supprimiert war. Dieser Effekt zeigte sich am deutlichsten bei der Messung von IL-12 nach einer 72 stündigen Stimulation mit PamCys; die anderen Zytokine waren nur leicht supprimiert. Im Vergleich dazu waren die Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen den anti-Siglec-E Antikörper und Kontroll-Antikörper

behandelten Proben, in den Infektionsexperimenten mit *T. cruzi* aus infiziertem Blut sehr groß. Somit lässt sich vermuten, dass die Ligation von Siglec-E nicht nur den TLR-2-induzierten Signalweg, sondern auch weitere *T. cruzi* induzierte Signalwege, die zur Zytokinproduktion beitragen, inhibiert. Es wurde beschrieben, dass auch TLR-9 vermittelte Signale zur trypanoziden Immunabwehr und der Produktion von TNF- α , IL-12 und IL-6, sowie NO beitragen [145]. Zudem ist bekannt, dass *T. cruzi* verschiedene Proteine sezerniert, die den Ca²⁺ Spiegel in der zu infizierenden Zellen erhöhen. Über die Cystein-Protease Cruzipain wird ein Phospholipase C (PLC)-abhängiger Signalweg zur Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels aktiviert [199, 200]. Auch das Oberflächenmolekül gp82 von metazyklischen Trypomastigoten bindet an einen noch unbekanntem Rezeptor, was zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt [201]. Diese Erhöhung des Ca²⁺ Spiegels führt zur Aktivierung von NFATc1, einem Transkriptionsfaktor, der an der Reifung von DCs beteiligt ist. Dieser Effekt ist unabhängig von TLR-Signalwegen, die über die Aktivierung von MyD88 auf die Expression von Genen inflammatorischer Zytokine wirken [202]. Möglicherweise greift die inhibitorische Funktion von Siglec-E in diesen Signalweg ein und eine Ligation von Siglec-E führt somit zur Verminderung der trypanoziden Immunabwehr der DCs.

Desweiteren generiert die Cystein-Protease Cruzipain wirtseigene kurzlebige Kinine, welche über die Bindung an den Bradykinin-B₂-Rezeptor zur Reifung und IL-12 Produktion der DCs führen [200, 203]. Dies ist ein weiterer Signalweg, der durch Siglec-E reguliert werden könnte. Um die durch Siglec-E induzierte Inhibition verschiedener Signalwege, welche an der *T. cruzi* induzierten Zytokinproduktion beteiligt sind, genauer zu analysieren, müssten verschiedenen Experimente durchgeführt werden, die die intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion genauer aufklären.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Produktion der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-6, welche bei einer *T. cruzi* Infektion generiert werden, durch einen Siglec-E gesteuerten Signalweg supprimiert werden. Um zu bestätigen, dass die verringerte Zytokinproduktion einen direkten Effekt auf die erhöhte Anzahl an Amastigoten hat, müssten weitere Analysen durchgeführt werden. Es ist zu vermuten, dass die autokrine Wirkung einer hohen Zytokinproduktion mit einer verbesserten trypanoziden Immunantwort der DCs korreliert.

Da die NO-Produktion von Makrophagen nach einer *T. cruzi* Infektion unter Zugabe von anti-Siglec-E nicht verändert war (Daten nicht gezeigt), sollte untersucht werden, ob die

erhöhte Parasitenanzahl der infizierten Zellen durch ein verbessertes Rekrutieren von Lysosomen zustande kam. Denn im Gegensatz zu *Mycobacterium tuberculosis*, einem sich intrazellulär vermehrenden Bakterium, das die Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen verhindert [204], rekrutiert *T. cruzi* Lysosomen für die Zellinvasion über den Wundheilungsmechanismus [101, 104, 106-108]. Die Ansäuerung durch die Verschmelzung von Lysosomen mit der parasitophoren Vakuole von *T. cruzi* ist notwendig, damit das Protein TcTox aktiviert werden kann, um ins Zytosol der infizierten Zelle zu gelangen [117]. Zusätzlich wird auch die Umwandlung in die Amastigote Form durch den niedrigen pH-Wert induziert [118].

Für dieses Experiment wurde der *T. cruzi* Brazil Stamm gewählt, der im Vergleich zu *T. cruzi* Tulahuen einen verlangsamten Infektionszyklus aufwies. Die Assoziation der intrazellulären Parasiten mit dem Lysosomenmarker Lamp-1 wurde immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. In den anti-Siglec-E Antikörper und den Kontroll-Antikörper behandelten Proben, war zu erkennen, dass einige Parasiten in der mit Lamp-1 angereicherten parasitophoren Vakuole lokalisiert waren, dahingegen andere im Zytosol der Zelle als Amastigote Form vorlagen. Die Ligation von Siglec-E schien keinen Einfluss auf den Invasionsprozess und die Rekrutierung von Lysosomen zu haben, da jeweils ca. 50% der Parasiten mit Lamp-1 in den zu vergleichenden Proben assoziiert waren. Der direkte Einfluss der Ligation von Siglec-E auf die erhöhte Anzahl von Amastigoten konnte in dieser Arbeit somit nicht aufgeklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine Möglichkeit die Funktion des anti-Siglec-E Antikörpers in der *T. cruzi* Infektion besser zu charakterisieren, wäre der Einsatz des Antikörpers *in vivo*. Somit könnte man den Einfluss der Siglec-E Ligation im Verlauf der *T. cruzi* Infektion untersuchen. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob auch *in vivo* die erhöhte Anzahl der Amastigoten zu einer gesteigerten Parasitämie führt.

Die Verwendung einer Siglec-E-defizienten Maus wäre ein weiteres Mittel, um die Funktion von Siglec-E während einer *T. cruzi* Infektion zu charakterisieren. So wäre ein Vergleich der Defizient mit der Aktivierung von Siglec-E, durch die Verwendung eines ligierenden anti-Siglec-E Antikörpers, während der *T. cruzi* Infektion möglich. Da eine Siglec-E-defiziente Maus leider nicht zur Verfügung stand, konnten keine derartigen *in vivo* Versuche durchgeführt werden.

Die Verwendung von Antikörpern, die gegen Rezeptoren gerichtet sind, kann eine Blockade der Bindungsstelle oder eine Ligation und Aktivierung des Signalweges

induzieren. In diesem Fall handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Ligation von Siglec-E, da die inhibitorische Wirkung auf die Zytokinproduktion ausgelöst wurde. Ein gegen das inhibitorische Siglec-E gerichteter Antikörper kann somit eine Ligation durch einen natürlichen Liganden nachahmen, allerdings kann die Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und einem Rezeptor viel stärker als die natürliche Ligation sein. So wird die Interaktion von Siglecs mit einem Sialinsäureliganden schwächer eingeschätzt als die Ligation durch einen spezifischen Antikörper. Durch die Ligation von Siglec-F, dem Paralog des humanen Siglec-8, mit einem quervernetzenden spezifischen Antikörper, wird Apoptose in murinen Eosinophilen ausgelöst [205]. Die Verwendung eines synthetisch hergestellten Sialinsäureliganden gegen Siglec-8 ist dahingegen weniger effektiv als ein spezifischer Antikörper Apoptose zu induzieren [69, 206]. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Ligation von Siglec-9 durch spezifische Antikörper gemacht werden. Hier führte die Ligation zur Induktion von Apoptose bei Neutrophilen [68]. Diese Studien zeigen, dass die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Siglecs zwar ein gutes immunologisches Werkzeug ist, allerdings kann hierbei ein artifizieller Effekt durch die hochaffine Ligation ausgelöst werden.

Die Ligation von Siglec-E mit dem spezifischen anti-Siglec-E Antikörper hatte zur Folge, dass die durch *T. cruzi* induzierte Zytokinproduktion stark inhibiert wurde. Die Produktion der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-6 war verringert. Da Trypanosomen, die eine hohe TS-Aktivität aufweisen, viele natürliche Liganden auf ihrer Oberfläche tragen, können sie Siglec-E ligieren und somit die protektive Immunantwort von DCs vermindern [78]. Dieser Effekt konnte durch die Ligation von Siglec-E mit einem spezifischen Antikörper imitiert werden, so dass nicht-sialylierte Parasiten aus der Hg 39 Kultur sich besser intrazellulär vermehren konnten. Die Verwendung des anti-Siglec-E Antikörpers führte zudem zu einer sehr effektiven Suppression der, durch eine *T. cruzi* Infektion induzierten, inflammatorischen Zytokine. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Inhibition der Zytokinproduktion durch Siglec-E während einer *T. cruzi* Infektion mit vitalen Trypomastigoten gezeigt. In ähnlichen Studien wurden entweder Parasiten-Lysate [73] oder TLR-Agonisten zur Untersuchung der suppressiven Funktion von Siglec-E verwendet [71]. Da die Hemmung der Zytokinproduktion sehr effektiv war, ist anzunehmen, dass nicht nur TLR-induzierte Signalwege, sondern auch weitere *T. cruzi* induzierte Signalwege über Siglec-E reguliert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass die inhibitorische Funktion von Siglecs durch sialylierte Pathogene ausgenutzt werden kann, um einen Überlebensvorteil im Wirt zu erlangen.

T. cruzi interagiert mit Siglec-E, um die immunsuppressive Aktivierung auszulösen. Siglec-E regulierte Signalwege zur Zytokinproduktion von DCs und Makrophagen werden inhibiert, so dass die essentielle Wechselwirkung zwischen APZ und Th1-Zellen zur Abwehr einer *T. cruzi* Infektion gestört ist. Durch die verminderte IL-12 Produktion kommt es zu einer verminderten T-Zell-Aktivierung. Die Reduktion der IFN- γ Ausschüttung führt zum verschlechterten Abtöten der sich intrazellulär vermehrenden Parasiten. Interessanterweise hatte eine Ligation von Siglec-E durch einen spezifischen Antikörper auch eine endogene Wirkung auf die Siglec-E exprimierenden Immunzellen (DCs und Makrophagen). Die Permissivität der Zellen war nach der Aktivierung des Siglec-E Signalwegs signifikant erhöht, so dass sich die Trypanosomen intrazellulär besser vermehren konnten. Diese neuen Erkenntnisse zeigen, dass *T. cruzi* nicht nur die Wechselwirkung zwischen APZ und T-Zellen über die Aktivierung des suppressiven Siglec-E Signalwegs negativ beeinflusst, sondern auch einen endogenen Effekt auf die Permissivität der infizierten Zellen hat.

Siglecs werden auf fast allen Immunzellen in hoher Anzahl exprimiert, was für die Wichtigkeit dieser Immunregulatoren spricht. Eine überschießende Immunantwort wird durch die inhibierende Funktion von Siglecs reguliert, so dass keine Schäden an wirtseigenen Zellen durch aktivierte Immunzellen verursacht werden. Die endogene Ligation von Siglecs ist somit essentiell für die Kontrolle der Immunzellaktivierung.

In den letzten Jahren wurden viele neue CD33-verwandte Siglecs beim Menschen charakterisiert. Hierbei fällt auf, dass nicht nur inhibierende Siglecs, sondern auch aktivierende Siglecs auf Immunzellen exprimiert werden. Diese Siglecs (z.B. Siglec-5 und Siglec-14) zeigen die gleiche Bindungsspezifität und werden somit als Siglec-Paare beschrieben [207], die die Balance zwischen Inhibition und Aktivierung von Immunzellen herstellen [53]. Die schnelle Evolution der Siglec-Familie wird möglicherweise durch den evolutionären Druck durch sialylierte Pathogene, die die inhibitorische Funktion der Siglecs zum eigenen Vorteil nutzen, beeinflusst. Pathogene exprimieren Sialinsäuren oder besitzen Enzyme, wie die TS, zur Abspaltung von Wirtssialinsäuren. Die Imitation der Siglec-Ligation durch Liganden auf Pathogenen beeinflusst die CD33-verwandten Siglecs sich weiterzuentwickeln. Die Wechselwirkung von sialylierten Pathogenen und Siglecs ist ein interessantes Beispiel der Koevolution von Mikroben und Säugetieren.

6 Zusammenfassung

CD33-verwandte Siglecs (*Sialic acid-binding-Ig-like-lectins*) sind Sialinsäure-bindende Lektine, die in ihrer intrazellulären Domäne ein inhibitorisches Signalmotiv enthalten. Da sie vorwiegend auf Immunzellen vorzufinden sind, geht man von einer immunmodulatorischen Funktion der Siglecs aus. Einige Pathogene können durch die Synthese oder das Abspalten und den Transfer von Sialinsäuren (Sias) eine Interaktion mit Siglecs eingehen. Diese Wechselwirkung kann dem Pathogen ein Überlebensvorteil schaffen, da protektive Immunantworten des Wirts über Siglecs inhibiert werden können.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) ist ein einzelliger Parasit, der in Süd- und Mittelamerika die chronische Infektionserkrankung Chagas verursacht. Jährlich sterben mehr als 10.000 Menschen an der Chagas-Krankheit und vermutlich sind über 10 Millionen infiziert (WHO 2010).

Auf der Parasitenoberfläche von Trypanosomen befinden sich Mucin-artige Strukturen, die mit Sias verknüpft sind. *T. cruzi* kann Sias nicht selbst synthetisieren, daher exprimiert der Parasit ein einzigartiges Enzym, die *Trans*-Sialidase (TS). Dieses Enzym ist ein entscheidender Virulenzfaktor, da es Sias von Wirtszellen abspaltet und auf die Parasitenoberfläche überträgt. Die Expression der TS ist für das Überleben des Parasiten im Säugetierwirt essentiell.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der pathogene *T. cruzi* Stamm Tulahuen mit Siglec-E interagieren kann. Siglec-E wird vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten (PMNs), Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) exprimiert. Die Interaktion zwischen *T. cruzi* und Siglec-E führte zu einer Verminderung der Zytokinproduktion und einer verschlechterten T-Zell-Aktivierung.

In dieser Arbeit wurde die immunregulatorische Funktion von Siglec-E in einer *T. cruzi* Infektion weiterführend charakterisiert. So wurden zunächst verschiedene *T. cruzi* Stämme in Hinsicht auf die Sialylierung der Parasitenoberfläche untersucht. Zudem wurde der Sialylierungsgrad von Trypanosomen aus einer Zellkultur und aus dem Blut infizierter Mäuse analysiert. Hierbei fiel auf, dass enorme Unterschiede zwischen den einzelnen *T. cruzi* Isolaten vorlagen. Die Trypanosomen aus der Zellkultur waren kaum oder nicht sialyliert, dahingegen waren die Parasiten, die aus infiziertem Blut isoliert wurden, hoch sialyliert.

Desweiteren wurden verschiedene Zelltypen, die Siglec-E exprimieren, im Zusammenhang mit einer *T. cruzi* Infektion analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass *T. cruzi* mit DNA NETs (*neutrophil extracellular traps*), welche von PMNs produziert werden, assoziiert war. Die Depletion von PMNs während einer *T. cruzi* Infektion zeigte jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Parasitämie. Auch die Verwendung von MPO-defizienten Mäusen, die die Myeloperoxidase (MPO), ein Schlüsselenzym der PMNs, nicht exprimieren, zeigte keinen Einfluss auf den Parasitämieverlauf.

Anschließend sollte die Funktion von Siglec-E auf DCs und Makrophagen während einer *T. cruzi* Infektion genauer charakterisiert werden. Hierfür wurde ein anti-Siglec-E Antikörper verwendet, der spezifisch das inhibitorische Siglec-E Molekül bindet und den suppressiven Signalweg aktiviert. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des anti-Siglec-E Antikörpers zu einer signifikanten Erhöhung der Amastigoten Anzahl in infizierten Zellen führte. Zudem war die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-12 stark supprimiert. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die protektive Immunantwort durch die Ligation von Siglec-E mit einem spezifischen Antikörper supprimiert wurde, sondern dass auch ein direkter inhibitorischer Effekt auf die trypanoziden Eigenschaften von infizierten phagozytischen Zellen induziert wurde.

7 Abstract

CD33-related Siglecs (*Sialic acid-binding-Ig-like-lectins*) are sialic acid-binding lectins that contain an inhibitory signaling motif in their intracellular domain. As they are mainly expressed on immune cells it is suggested that they have an immune regulatory function.

Some pathogens are able to synthesize or transfer sialic acids (sias) to their surface to interact with Siglecs.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is a flagellated protozoan parasite that causes the chronic infectious Chagas disease in South- and Central America. 2008 over 10.000 people died from Chagas disease and it is estimated that over 10 million are infected (WHO 2010).

The parasite's surface is covered with mucin-like structures that are linked to sias. *T. cruzi* cannot synthesize sias itself, therefore it has a unique enzyme, called *trans*-sialidase (TS). This enzyme is one of the major virulence factors because it cleaves sias from host cells and transfers them to the parasite's surface. The expression of TS is essential for the survival of *T. cruzi* in the mammalian host.

Previous data have shown that the pathogenic strain *T. cruzi* Tulahuen interacts with Siglec-E. Siglec-E is mainly expressed on neutrophils (PMNs), macrophages and dendritic cells (DCs). The interaction between *T. cruzi* and Siglec-E resulted in a reduction of cytokine production as well as an impaired T-cell activation.

The aim of this dissertation was to continually characterize the immune regulatory function of Siglec-E in a *T. cruzi* infection. Initially the sialylation of different *T. cruzi* strains was analyzed. Furthermore the sialylation of trypanosomes out of a cell culture and from infected mice was compared. Interestingly significant differences between the compared *T. cruzi* isolates were found. Trypanosomes out of a cell culture were poorly or not sialylated whereas parasites which were isolated from infected blood showed a highly sialylated phenotype.

In addition the role of different cell types that express Siglec-E were analyzed in a *T. cruzi* infection. It was shown that *T. cruzi* was associated with DNA NETs (*neutrophil extracellular traps*) that were produced by PMNs. However the depletion of PMNs in a *T. cruzi* infection had no influence on the progression of the parasitemia. Neither the usage of MPO-deficient mice, that lack myeloperoxidase (MPO), a key enzyme of PMNs, showed an impact on the parasitemia.

Subsequently the function of Siglec-E on DCs and macrophages in a *T. cruzi* infection was characterized more precisely. Therefor an anti-Siglec-E antibody that specifically binds to the inhibitory Siglec-E molecule and activates the suppressive signaling pathway was used. It was shown that the application of the anti-Siglec-E antibody leads to a significant increase in the amount of amastigotes per infected cell. Moreover the release of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-12) was strongly suppressed. These results suggest that not only the protective immune response was suppressed due to the ligation of Siglec-E with a specific antibody but also a direct inhibitory effect on the trypanocidal properties of infected phagocytic cells was induced.

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A.K.e.a., *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. 2012: Elsevier.
2. Harrison, J.E. and J. Schultz, *Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase*. J Biol Chem, 1976. **251**(5): p. 1371-4.
3. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
4. Smith, J.A., *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(6): p. 672-86.
5. Ganz, T., *Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 390-5.
6. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
7. Volkman, A. and J.L. Gowans, *The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat*. Br J Exp Pathol, 1965. **46**: p. 62-70.
8. Van Furth, R., M.C. Diesselhoff-den Dulk, and H. Mattie, *Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction*. J Exp Med, 1973. **138**(6): p. 1314-30.
9. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
10. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
11. Nathan, C.F., H.W. Murray, and Z.A. Cohn, *The macrophage as an effector cell*. N Engl J Med, 1980. **303**(11): p. 622-6.
12. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
13. Billiau, A. and P. Matthys, *Interferon-gamma: a historical perspective*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 97-113.
14. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
15. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
16. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.

17. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
18. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
19. Bacchetta, R., S. Gregori, and M.G. Roncarolo, *CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(8): p. 491-6.
20. Levings, M.K., et al., *The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(4): p. 263-76.
21. Crocker, P.R., *Siglecs and their roles in the immune system*. NATURE REVIEWS, 2007. **VOLUME 7 APRIL 2007 255**.
22. Cao, H., et al., *SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans*. Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2303-15.
23. Cao, H. and P.R. Crocker, *Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation?* Immunology, 2012. **132**(1): p. 18-26.
24. Razi, N. and A. Varki, *Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7469-74.
25. Crocker, P.R., *Siglecs in innate immunity*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(4): p. 431-7.
26. Crocker, P.R., S.J. McMillan, and H.E. Richards, *CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1253**: p. 102-11.
27. Stamenkovic, I., et al., *The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1133-44.
28. Mitra, N., et al., *SIGLEC12, a human-specific segregating (pseudo)gene, encodes a signaling molecule expressed in prostate carcinomas*. J Biol Chem. **286**(26): p. 23003-11.
29. Freeman, S.D., et al., *Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules*. Blood, 1995. **85**(8): p. 2005-12.
30. Munday, J., et al., *Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 2): p. 489-97.

31. Nicoll, G., et al., *Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34089-95.
32. Zhang, J.Q., et al., *Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22121-6.
33. Zhang, J.Q., et al., *The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils.* Eur J Immunol, 2004. **34**(4): p. 1175-84.
34. Falco, M., et al., *Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells.* J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 793-802.
35. Taylor, V.C., et al., *The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11505-12.
36. Ulyanova, T., et al., *The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor.* Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3440-9.
37. Paul, S.P., et al., *Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2.* Blood, 2000. **96**(2): p. 483-90.
38. Whitney, G., et al., *A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signaling properties similar to CD33.* Eur J Biochem, 2001. **268**(23): p. 6083-96.
39. Yu, Z., et al., *Identification and characterization of S2V, a novel putative siglec that contains two V set Ig-like domains and recruits protein-tyrosine phosphatases SHPs.* J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23816-24.
40. Angata, T. and E. Brinkman-Van der Linden, *I-type lectins.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 294-316.
41. Kitzig, F., et al., *Cloning of two new splice variants of Siglec-10 and mapping of the interaction between Siglec-10 and SHP-1.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(2): p. 355-62.
42. Ikehara, Y., S.K. Ikehara, and J.C. Paulson, *Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43117-25.
43. Doody, G.M., et al., *A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP.* Science, 1995. **269**(5221): p. 242-4.
44. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes.* Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.

45. Lock, K., et al., *Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells.* Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 199-207.
46. Zhang, M. and A. Varki, *Cell surface sialic acids do not affect primary CD22 interactions with CD45 and surface IgM nor the rate of constitutive CD22 endocytosis.* Glycobiology, 2004. **14**(11): p. 939-49.
47. Blasius, A.L., et al., *Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12.* Blood, 2006. **107**(6): p. 2474-6.
48. Angata, T., et al., *Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution.* Glycobiology, 2007. **17**(8): p. 838-46.
49. Angata, T., et al., *Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia.* J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24466-74.
50. Angata, T., et al., *Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates.* Faseb J, 2006. **20**(12): p. 1964-73.
51. Varki, A., *Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution.* Am J Phys Anthropol, 2001. **Suppl 33**: p. 54-69.
52. Brinkman-Van der Linden, E.C., et al., *Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs.* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8633-40.
53. Pillai, S., et al., *Siglecs and immune regulation.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 357-92.
54. Blixt, O., et al., *Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein.* J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31007-19.
55. Angata, T., N.M. Varki, and A. Varki, *A second uniquely human mutation affecting sialic acid biology.* J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40282-7.
56. Crocker, P.R. and A. Varki, *Siglecs, sialic acids and innate immunity.* Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 337-42.
57. Munday, J., H. Floyd, and P.R. Crocker, *Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 705-11.
58. Floyd, H., L. Nitschke, and P.R. Crocker, *A novel subset of murine B cells that expresses unmasked forms of CD22 is enriched in the bone marrow: implications for B-cell homing to the bone marrow.* Immunology, 2000. **101**(3): p. 342-7.
59. Collins, B.E., et al., *Ablation of CD22 in ligand-deficient mice restores B cell receptor signaling.* Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 199-206.

60. Carlin, A.F., et al., *Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes*. J Bacteriol, 2007. **189**(4): p. 1231-7.
61. Carlin, A.F., et al., *Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response*. Blood, 2009. **113**(14): p. 3333-6.
62. Jones, C., M. Virji, and P.R. Crocker, *Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake*. Mol Microbiol, 2003. **49**(5): p. 1213-25.
63. Monteiro, V.G., et al., *Increased association of Trypanosoma cruzi with sialoadhesin positive mice macrophages*. Parasitol Res, 2005. **97**(5): p. 380-5.
64. O'Keefe, T.L., et al., *Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1307-13.
65. Nitschke, L., et al., *CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling*. Curr Biol, 1997. **7**(2): p. 133-43.
66. Zhang, M., et al., *Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4280-7.
67. Hoffmann, A., et al., *Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 695-704.
68. von Gunten, S., et al., *Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1423-31.
69. Nutku, E., et al., *Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5014-20.
70. Zhang, J., et al., *Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3600-8.
71. Boyd, C.R., et al., *Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7703-9.
72. Yu, Z., et al., *mSiglec-E, a novel mouse CD33-related siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) that recruits Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2*. Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 483-92.
73. Erdmann, H., *Untersuchungen zur Funktion von Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E) im Verlauf der Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) - Infektion in der Maus (Mus musculus, Linnaeus, 1758)*, in Department Biologie 2008, Universität Hamburg: Hamburg. p. 117.

74. Vimr, E. and C. Lichtensteiger, *To sialylate, or not to sialylate: that is the question*. Trends Microbiol, 2002. **10**(6): p. 254-7.
75. Edwards, M.S., et al., *Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci*. J Immunol, 1982. **128**(3): p. 1278-83.
76. Tomlinson, S., et al., *Role of sialic acid in the resistance of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to complement*. J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3141-7.
77. Rempel, H., et al., *Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity*. PLoS ONE, 2008. **3**(4): p. e1967.
78. Erdmann, H., et al., *Sialylated ligands on pathogenic Trypanosoma cruzi interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E)*. Cell Microbiol, 2009. **11**(11): p. 1600-11.
79. (WHO), W.H.O. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 2012 [cited; Fact sheet N°340 August 2012]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
80. Chagas, C., *Nova Tripanosomiase Humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolution do Schizotrypanum cruzi n. gen., n., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem*. Mem Inst Oswaldo Cruz., 1909. **1**: p. 159-218.
81. DNDi, D.f.N.D.i. [cited; Available from: <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>].
82. Burleigh, B.A. and N.W. Andrews, *The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 175-200.
83. Brener, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol, 1973. **27**: p. 347-82.
84. Macedo, A.M. and S.D. Pena, *Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease*. Parasitol Today, 1998. **14**(3): p. 119-24.
85. Tafuri, W.L., *Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies*. Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(3): p. 405-17.
86. da Silveira, A.B., et al., *Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells*. Hum Pathol, 2007. **38**(8): p. 1256-64.
87. Combs, T.P., et al., *The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24085-94.
88. Bonney, K.M. and D.M. Engman, *Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?* Curr Mol Med, 2008. **8**(6): p. 510-8.
89. Cunha-Neto, E. and J. Kalil, *Autoimmunity in Chagas' heart disease*. Sao Paulo Med J, 1995. **113**(2): p. 757-66.

90. Kierszenbaum, F., *Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 210-23.
91. McCormick, T.S. and E.C. Rowland, *Trypanosoma cruzi: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice*. Exp Parasitol, 1989. **69**(4): p. 393-401.
92. Rizzo, L.V., E. Cunha-Neto, and A.R. Teixeira, *Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2640-4.
93. Viotti, R., et al., *Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up*. Am Heart J, 1994. **127**(1): p. 151-62.
94. Bellotti, G., et al., *In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease*. Am Heart J, 1996. **131**(2): p. 301-7.
95. Tarleton, R.L. and L. Zhang, *Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?* Parasitol Today, 1999. **15**(3): p. 94-9.
96. Dvorak, J.A. and T.P. Hyde, *Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels*. Exp Parasitol, 1973. **34**(2): p. 268-83.
97. Ley, V., et al., *Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infective cycle in mammalian cells*. J Exp Med, 1988. **168**(2): p. 649-59.
98. Yoshida, N., *Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc, 2006. **78**(1): p. 87-111.
99. Rodriguez, A., et al., *Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 93-104.
100. Rodriguez, A., et al., *cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16754-9.
101. Reddy, A., E.V. Caler, and N.W. Andrews, *Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes*. Cell, 2001. **106**(2): p. 157-69.
102. Tam, C., et al., *Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair*. J Cell Biol, 2010. **189**(6): p. 1027-38.
103. Schenkman, S., E.S. Robbins, and V. Nussenzweig, *Attachment of Trypanosoma cruzi to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton*. Infect Immun, 1991. **59**(2): p. 645-54.
104. Tardieux, I., et al., *Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1117-30.

105. Tyler, K.M., et al., *Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol, 2005. **7**(11): p. 1579-91.
106. Tardieux, I., M.H. Nathanson, and N.W. Andrews, *Role in host cell invasion of Trypanosoma cruzi-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1017-22.
107. Rodriguez, A., et al., *A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells*. J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1263-73.
108. Burleigh, B.A., et al., *A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 609-20.
109. Idone, V., et al., *Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis*. J Cell Biol, 2008. **180**(5): p. 905-14.
110. Holopainen, J.M., M.I. Angelova, and P.K. Kinnunen, *Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes*. Biophys J, 2000. **78**(2): p. 830-8.
111. Fernandes, M.C., et al., *Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion*. J Exp Med, 2011. **208**(5): p. 909-21.
112. McNeil, P.L. and R.A. Steinhardt, *Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 697-731.
113. Bansal, D. and K.P. Campbell, *Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 206-13.
114. Caler, E.V., et al., *Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Embo J, 1998. **17**(17): p. 4975-86.
115. Scharfstein, J. and A.P. Lima, *Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem, 2008. **47**: p. 140-54.
116. Rodriguez, A., et al., *Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 349-62.
117. Andrews, N.W. and M.B. Whitlow, *Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH*. Mol Biochem Parasitol, 1989. **33**(3): p. 249-56.
118. Tomlinson, S., et al., *The induction of Trypanosoma cruzi trypomastigote to amastigote transformation by low pH*. Parasitology, 1995. **110** (Pt 5): p. 547-54.
119. Rubin-de-Celis, S.S., et al., *Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi increases parasite escape from its parasitophorous vacuole*. Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1888-98.

120. Risso, M.G., et al., *Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages*. J Infect Dis, 2004. **189**(12): p. 2250-9.
121. Schauer, R., et al., *The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in Trypanosoma cruzi*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1983. **364**(8): p. 1053-7.
122. Buscaglia, C.A., et al., *Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(3): p. 229-36.
123. Schenkman, S. and D. Eichinger, *Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion*. Parasitol Today, 1993. **9**(6): p. 218-22.
124. Pereira, M.E., *A developmentally regulated neuraminidase activity in Trypanosoma cruzi*. Science, 1983. **219**(4591): p. 1444-6.
125. Colli, W., *Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan Trypanosoma cruzi*. Faseb J, 1993. **7**(13): p. 1257-64.
126. Vandekerckhove, F., et al., *Substrate specificity of the Trypanosoma cruzi trans-sialidase*. Glycobiology, 1992. **2**(6): p. 541-8.
127. El-Sayed, N.M., et al., *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science, 2005. **309**(5733): p. 409-15.
128. Schenkman, S., et al., *A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1117-25.
129. de Titto, E.H. and F.G. Araujo, *Mechanism of cell invasion by Trypanosoma cruzi: importance of sialidase activity*. Acta Trop, 1987. **44**(3): p. 273-82.
130. Mucci, J., et al., *The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi triggers apoptosis by target cell sialylation*. Cell Microbiol, 2006. **8**(7): p. 1086-95.
131. Todeschini, A.R., et al., *trans-Sialidase from Trypanosoma cruzi binds host T-lymphocytes in a lectin manner*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45962-8.
132. Jacobs, T., H. Erdmann, and B. Fleischer, *Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on Trypanosoma cruzi*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**(1): p. 113-6.
133. Macedo, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(1): p. 1-12.
134. Anonymous, *Recommendations from a Satellite Meeting*. mem Inst Oswaldo Cruz, 1999. **94**: p. 429-432.
135. Tibayrenc, M., *Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach*. Int J Parasitol, 1998. **28**(1): p. 85-104.

136. Zingales, B., et al., *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications*. Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 240-53.
137. Zingales, B., et al., *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
138. Zingales, B., et al., *Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences*. Int J Parasitol, 1998. **28**(1): p. 105-12.
139. Fernandes, O., et al., *Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **58**(6): p. 807-11.
140. Bosseno, M.F., et al., *Predominance of Trypanosoma cruzi lineage I in Mexico*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 627-32.
141. Di Noia, J.M., et al., *A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 401-13.
142. Freitas, J.M., et al., *Real time PCR strategy for the identification of major lineages of Trypanosoma cruzi directly in chronically infected human tissues*. Int J Parasitol, 2005. **35**(4): p. 411-7.
143. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
144. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 416-23.
145. Bartholomeu, D.C., et al., *Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1333-44.
146. Frosch, S., S. Kraus, and B. Fleischer, *Trypanosoma cruzi is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages*. Med Microbiol Immunol, 1996. **185**(3): p. 189-93.
147. Aliberti, J.C., et al., *Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 1961-7.
148. Kumar, S. and R.L. Tarleton, *Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4596-603.
149. Golden, J.M. and R.L. Tarleton, *Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity*. Exp Parasitol, 1991. **72**(4): p. 391-402.

150. Silva, J.S., et al., *Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages*. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4862-7.
151. Holscher, C., et al., *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, 1998. **66**(3): p. 1208-15.
152. Saeftel, M., B. Fleischer, and A. Hoerauf, *Stage-dependent role of nitric oxide in control of Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2252-9.
153. Lieke, T., et al., *NK cells contribute to the control of Trypanosoma cruzi infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6817-25.
154. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
155. Michailowsky, V., et al., *Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1723-33.
156. Cardillo, F., et al., *Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 128-34.
157. Weber, K., et al., *A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis*. Mol Ther, 2008. **16**(4): p. 698-706.
158. WHO, W.H.O. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 2012 [cited; Fact sheet N°340]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
159. Montes, C.L., E. Vottero-Cima, and A. Gruppi, *Trypanosoma cruzi cytosolic alkaline antigens (FI) induce polyclonal activation in murine normal B cells*. Scand J Immunol, 1996. **44**(2): p. 93-100.
160. Montes, C.L., et al., *A Trypanosoma cruzi alkaline antigen induces polyclonal B-cell activation of normal murine spleen cells by T-cell-independent, BCR-directed stimulation*. Scand J Immunol, 1999. **50**(2): p. 159-66.
161. Da Silva, A.C., et al., *A 24,000 MW Trypanosoma cruzi antigen is a B-cell activator*. Immunology, 1998. **94**(2): p. 189-96.
162. Zuniga, E., et al., *Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(3): p. 507-15.
163. Minoprio, P., et al., *Most B cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack parasite specificity*. Scand J Immunol, 1988. **28**(5): p. 553-61.

164. Grauert, M.R., M. Houdayer, and M. Hontebeyrie-Joskowicz, *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin Exp Immunol*, 1993. **93**(1): p. 85-92.
165. Garcia, I.E., et al., *Role of membrane-bound IgM in Trypanosoma cruzi evasion from immune clearance*. *J Parasitol*, 1997. **83**(2): p. 230-3.
166. Kierszenbaum, F., *Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (Trypanosoma cruzi infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells*. *J Immunol*, 1982. **129**(5): p. 2202-5.
167. Cetron, M.S., et al., *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*, 1993. **49**(3): p. 370-82.
168. Kierszenbaum, F., H. Mejia Lopez, and M.B. Szein, *Does interleukin-2 restore lymphocyte responses suppressed by Trypanosoma cruzi?* *Immunology*, 1993. **80**(3): p. 445-50.
169. Rottenberg, M.E., et al., *Organ-specific regulation of interferon-gamma, interleukin-2 and interleukin-2 receptor during murine infection with Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*, 1993. **37**(5): p. 559-68.
170. Rottenberg, M., et al., *Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine Trypanosoma cruzi infection*. *Scand J Immunol*, 1989. **30**(1): p. 65-72.
171. Harel-Bellan, A., et al., *T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2*. *Eur J Immunol*, 1985. **15**(5): p. 438-42.
172. Tarleton, R.L., *Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells*. *J Immunol*, 1988. **140**(8): p. 2769-73.
173. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?* *Trends Microbiol*, 2003. **11**(5): p. 210-4.
174. Fruth, U., N. Solioz, and J.A. Louis, *Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages*. *J Immunol*, 1993. **150**(5): p. 1857-64.
175. Camargo, M.M., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages*. *J Immunol*, 1997. **158**(12): p. 5890-901.
176. Van Overtvelt, L., et al., *Trypanosoma cruzi down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes*. *Int Immunol*, 2002. **14**(10): p. 1135-44.

177. Van Overtvelt, L., et al., *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun*, 1999. **67**(8): p. 4033-40.
178. Buschiazzo, A., et al., *The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis*. *Mol Cell*, 2002. **10**(4): p. 757-68.
179. Frasch, A.C., *Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*, 2000. **16**(7): p. 282-6.
180. Schenkman, S., et al., *Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase*. *Annu Rev Microbiol*, 1994. **48**: p. 499-523.
181. Wilson, J.C., et al., *Preliminary 1H NMR investigation of sialic acid transfer by the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000. **10**(24): p. 2791-4.
182. Hanson, W.L., W.L. Chapman, Jr., and V.B. Waits, *Immunization of mice with irradiated Trypanosoma cruzi growth in cell culture: relation of numbers of parasites, immunizing injections, and route of immunization to resistance*. *Int J Parasitol*, 1976. **6**(4): p. 341-7.
183. Ny, L., et al., *A magnetic resonance imaging study of intestinal dilation in Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in nitric oxide synthase*. *Am J Trop Med Hyg*, 2008. **79**(5): p. 760-7.
184. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. *Cell Microbiol*, 2006. **8**(4): p. 668-76.
185. Hasenberg, M., et al., *Direct observation of phagocytosis and NET-formation by neutrophils in infected lungs using 2-photon microscopy*. *J Vis Exp*, (52).
186. Bruns, S., et al., *Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(4): p. e1000873.
187. Ermert, D., et al., *Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections*. *J Innate Immun*, 2009. **1**(3): p. 181-93.
188. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(2): p. 231-41.
189. Boxio, R., et al., *Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(4): p. 604-11.
190. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
191. Chen, L., et al., *Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 265-75.

192. Parry, M.F., et al., *Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance*. Ann Intern Med, 1981. **95**(3): p. 293-301.
193. Lehrer, R.I. and M.J. Cline, *Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to Candida infection*. J Clin Invest, 1969. **48**(8): p. 1478-88.
194. Aratani, Y., et al., *Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase*. J Infect Dis, 2000. **182**(4): p. 1276-9.
195. Metzler, K.D., et al., *Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity*. Blood, 2011. **117**(3): p. 953-9.
196. Munoz-Fernandez, M.A., M.A. Fernandez, and M. Fresno, *Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism*. Immunol Lett, 1992. **33**(1): p. 35-40.
197. Munoz-Fernandez, M.A., M.A. Fernandez, and M. Fresno, *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, 1992. **22**(2): p. 301-7.
198. Tarleton, R.L., *Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease*. Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 186-90.
199. Burleigh, B.A. and A.M. Woolsey, *Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion*. Cell Microbiol, 2002. **4**(11): p. 701-11.
200. Scharfstein, J., et al., *Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1289-300.
201. Ruiz, R.C., et al., *Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 1): p. 505-11.
202. Kayama, H., et al., *NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during Trypanosoma cruzi infection*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000514.
203. Aliberti, J., et al., *Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5349-53.
204. Gupta, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation*. Immunobiology, 2012. **217**(3): p. 363-74.
205. Zimmermann, N., et al., *Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils*. Allergy, 2008. **63**(9): p. 1156-63.

-
206. Hudson, S.A., et al., *Eosinophil-selective binding and proapoptotic effect in vitro of a synthetic Siglec-8 ligand, polymeric 6'-sulfated sialyl Lewis x*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **330**(2): p. 608-12.
207. Angata, T., *Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins*. Mol Divers, 2006. **10**(4): p. 555-66.