

Universität Hamburg

Charakterisierung koinhibitorischer Moleküle und deren
Einfluss auf die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort in der
experimentellen Infektion mit *Trypanosoma cruzi*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Rosa Isela Grote-Gálvez
aus Lima, Peru

Hamburg, Oktober 2020

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Protozoen-Immunologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Christian Lohr
Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
Institut für Zoologie
Neurophysiologie
Martin-Luther-King-Platz 3
20146 Hamburg

2. Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Jacobs
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Arbeitsgruppe Protozoen-Immunologie
Bernhard-Nocht-Straße 74
20359 Hamburg

Tag der Disputation: 18. 12.2020

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel, insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen, benutzt. Diese Arbeit wurde von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich bin damit einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.

Rosa Isela Grote-Gálvez

Unterschrift: _____

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Rosa Isela Grote-Gálvez'.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
Zusammenfassung	x
Summary.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Trypanosomen	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.3 Vektoren	3
1.4 Übertragung.....	3
1.5 Chagas-Krankheit	4
1.5.1 Krankheitsverlauf	4
1.5.2 Pathophysiologie der Chagas-Krankheit	6
1.5.3 Therapie	6
1.6 Immunantwort in der <i>T. cruzi</i> Infektion	7
1.6.1 T-Zellen.....	7
1.7 T-Zell-Erschöpfung	10
1.7.1 CD39.....	12
1.7.2 PD-1.....	13
1.7.3 Lag-3.....	14
1.7.4 Tim-3	15
1.8 Ziel der Arbeit	19
2 Materialien	20
2.1 Allgemeine Laborgeräte.....	20
2.2 Gebrauchswaren.....	22

2.3	Material für zellbiologischen Arbeiten.....	23
2.3.1	Enzyme	24
2.3.2	Medien und Gebrauchslösungen	24
2.3.3	Stimulations- und Blockreagenzien.....	26
2.3.4	Peptide	26
2.4	Antikörper für Durchflusszytometrie	27
2.5	Material für biochemische Arbeiten	28
2.6	Mausstämme	30
2.7	Parasitenstämme	30
2.8	Zelllinien.....	30
2.9	Software.....	30
3	Methoden.....	31
3.1	Tierversuche.....	31
3.1.1	<i>In vivo</i> Infektion der Mäuse mit <i>T. cruzi</i>	31
3.1.2	Monitoring des Gesundheitszustands.....	31
3.1.3	Behandlung mit Antikörpern.....	32
3.2	Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.1	Kultivierung der HG39 Zelllinie.....	32
3.2.2	Zellzahlbestimmung	32
3.2.3	Kultivierung von <i>T. cruzi</i> Parasiten	33
3.2.5	<i>T. cruzi</i> lösliches Antigen	33
3.3	Durchflusszytometrie.....	35
3.3.1	Extrazelluläre Färbung.....	36
3.3.2	Intrazelluläre Färbung	36
3.4	Biochemische Methoden	36
3.4.3	Quantitative Real-Time PCR	37
3.4.5	Legendplex	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Infektionsparameter und Gesundheitszustand nach der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	41
4.2	Infektionskinetik und Organtropismus von <i>T. cruzi</i> Brazil	45
4.3	Immunologische Kontrolle der Parasitenreplikation im Gewebe	46
4.4	Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD4 ⁺ T-Zellen.....	48

4.4.1	Zytokinproduktion von CD4 ⁺ T-Zellen nach der Stimulation	49
4.5	Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8 ⁺ T-Zellen.....	51
4.5.1	Zytokinproduktion der CD8 ⁺ T-Zellen nach Stimulation.....	55
4.6	Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8 ⁺ T-Zellen im Muskel während der akuten Phase.....	57
4.7	Blockade von Tim-3 während der akuten und chronischen Phase der Infektion	63
4.8	Charakterisierung von CD8 ⁺ T-Zellen im Muskel während der chronischen Phase.....	68
4.8.1	Aufteilung nach der Parasitenlast im Muskelgewebe	68
4.8.2	Phänotypisierung der CD8 ⁺ T-Zellen.....	71
4.9	Analyse des Zytokinprofils	82
5	Diskussion.....	86
5.1	Das Mausmodell	87
5.2	Die Persistenz.....	89
5.3	Die Untersuchung der T-Zellantwort und der Expression von koinhibitorischen Molekülen 92	
5.4	Analyse des Zytokinprofils	95
6	Anhang	98
7	Literaturverzeichnis.....	99
	Danksagung.....	111

Abkürzungsverzeichnis

APZ	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest	destilliertes Wasser
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
B-Zellen	B- Lymphozyten
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
CTLA-4	<i>cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Zellkulturmedium, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTU	discrete typing units
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	Antikörperfragment
F _c -Block	Fc-Rezeptor-Blockierungsreagenz zur Unterbindung von unerwünschter Bindungen von Antikörpern an Fc-Rezeptoren exprimierende Zellen
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	Vorwärtsscatter (<i>forward scatter</i>)
g	g-Zahl
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
Hepes	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hg	Humanes Neuroblastom (<i>human glioblastoma</i>)
i.p.	intraperitoneal
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
ko	knockout
L	Liter
Lag-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
Lamp-1	Lysosomen assoziiertes Membranprotein-1 (<i>Lysosome associated Membrane Protein-1</i>) auch CD107a
M	molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min	Minute

mL	milliliter
mM	millimolar
NaN ₃	Natriumazid
Nm	nanometer
ns	nicht (statistisch) signifikant
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH-Wert	<i>potentia Hydrogenii</i> (Maß für die sauren oder basischen Charakter einer Lösung)
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern-recognition receptor</i>)
PS	Petrischale
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
Rag-1	Rekombination aktivierendes Gen-1 (<i>recombination activating gene-1</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Zellkulturmedium, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Raumtemperatur
SHP	SH2-Domäne enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase
SSC	Seitwärtsscatter (<i>side scatter</i>)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>Transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor (<i>Tumor-necrosis-factor</i>)
Tris-HCl	Tris (Hydroxymethyl)- Aminoethan-Hydrochlorid
u.a.	unter anderem
VF	Verdünnungsfaktor
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf des Gewichts während der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	41
Abbildung 2: Charakteristische Gewebeveränderungen in der akuten Phase der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	42
Abbildung 3: Untersuchung der Parameter für Muskel- und Leberschäden.	42
Abbildung 4: Untersuchung der Herzleistung <i>in vivo</i>	43
Abbildung 5: Verhältnis Herzgewichts zu Tibialänge.	44
Abbildung 6: Kinetik der Parasitenlast in Organen und Gewebe während der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	46
Abbildung 7: Kontrolle der Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen.	47
Abbildung 8: Wirkung auf die Gewebslast nach CD8 ⁺ T-Zell Depletion.....	47
Abbildung 9: Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD4 ⁺ T-Zellen in der akute Phase der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	49
Abbildung 10: IFN- γ Produktion der CD4 ⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.	50
Abbildung 11: TNF- α Produktion der CD4 ⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.	51
Abbildung 12: Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8 ⁺ T-Zellen in der akute Phase der <i>T. cruzi</i> Infektion.....	52
Abbildung 13: Darstellung der <i>gates</i> für die Tim-3 Analyse auf CD8 ⁺ T-Zellen.	53
Abbildung 14: Kinetik der Tim-3 Expression.	53
Abbildung 15: Longitudinale Analyse der Expression koinhibitorischer Moleküle.	54
Abbildung 16: Ko-Expression von Tim-3 mit PD-1 und Lag-3 in dem CD8 ⁺ T-Zellkompartiment.	55
Abbildung 17: IFN- γ Produktion der CD8 ⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.	56
Abbildung 18: TNF- α Produktion der CD8 ⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.	57
Abbildung 19: Charakterisierung von CD8 ⁺ T-Zellen aus dem Muskel <i>T. cruzi</i> infizierter Mäuse.....	59

Abbildung 20: Charakterisierung von <i>T. cruzi</i> spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus dem Muskel.....	60
Abbildung 21: Granzym B und CD107a Produktion bei Tim-3 ⁺ CD8 ⁺ und Tim-3 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen während der akuten Phase der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	62
Abbildung 22: Blockade von Tim-3 während der akuten Phase und ihr Einfluss auf die Parasitämie.	64
Abbildung 23: Analyse der TSKB20 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen und der Zytokinproduktion nach der Blockade mit α -Tim-3.	65
Abbildung 24: Untersuchung von pro-inflammatorischen Zytokinen im Serum nach Tim-3 Blockade.	66
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Blockadestrategien von Tim-3.	67
Abbildung 26: Vergleich der Parasitenlast zwischen Herz- und Muskelgewebe.	69
Abbildung 27: Korrelation der Gewebslast in dem Muskel und der Anzahl an aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.	70
Abbildung 28: Aufteilung der Tiere in Gruppen nach der Parasitenlast in dem Muskel.	70
Abbildung 29: Anzahl der T-Zellen abhängig von der Parasitämie.....	72
Abbildung 30: Vergleich der T-Zelleffektor- und Memory Populationen.....	74
Abbildung 31: Anzahl der CD8 ⁺ T-Effektorzellen in Abhängigkeit von der Parasitenlast.	75
Abbildung 32: Analyse von CD27 und Induktion von CD69 in CD8 ⁺ T-Effektorzellen aus dem Muskel.	76
Abbildung 33: Expression von PD-1, KLRG-1 und Granzyme B in aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	78
Abbildung 34: Analyse der TSKB20 ⁺ T-Zellen aus dem Muskel in der späten chronischen Phase der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	79
Abbildung 35: Funktionelle Analyse von PD-1 ⁺ Tox ⁺ T _{eff} aus der Muskel.....	81
Abbildung 36: Analyse von Zytokinen im Serum im Verlauf der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der eingesetzten Geräte.....	20
Tabelle 2: Liste der Gebrauchswaren	22
Tabelle 3: Liste der Reagenzien, Chemikalien und Kits Liste der Enzyme	23
Tabelle 4: Liste der Enzyme	24
Tabelle 5: Stimulationsreagenzien und blockierende Antikörper	26
Tabelle 6: <i>T. cruzi</i> Peptide.....	26
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Anwendung im FACS.....	27
Tabelle 8: Chemikalien für biochemische Arbeiten	28
Tabelle 9: Oligonucleotidsequenzen für die qPCR.....	29
Tabelle 10: <i>Trypanosoma cruzi</i> Stämme	30
Tabelle 11: Liste der benutzten Programme.....	30
Tabelle 12: Verlauf des Gewichts während der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	98

Zusammenfassung

Die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* und die daraus resultierende Chagas-Krankheit ist die wichtigste vernachlässigte Zoonose in Lateinamerika. Obwohl diese Infektion in der akuten Phase keine spezifischen Symptome zeigt, kann die Chagas-Krankheit mit kardialen und/oder gastrointestinalen Manifestationen tödlich verlaufen. CD8⁺ T-Zellen sind aufgrund ihrer antigenspezifischen Zytotoxizität die wichtigsten Immunmediatoren für die Kontrolle einer Infektion mit *T. cruzi*. Obwohl die CD8⁺ T-Zellen hochwirksam sind, gelingt es ihnen nicht, alle Parasiten vollständig zu eliminieren. Daher war es Ziel der Arbeit zu zeigen, wie die Funktion von CD8⁺ T-Zellen durch die Expression von koinhibitorischen Molekülen während der verschiedenen Stadien dieser Infektion beeinflusst wird. Dafür wurde in einem neu etablierten Mausmodell mittels *Multicolor* Durchflusszytometrie untersucht, ob CD8⁺ T-Zellen koinhibitorische Moleküle in dieser Infektion exprimieren und ob sie dadurch in ihrer Funktion beeinflusst werden. Während der akuten Phase der Infektion wird das T-Zellkompartiment durch die transiente Induktion von koinhibitorischen Molekülen reguliert. Es wurde hierbei ein hoher Prozentsatz an CD8⁺ Tim-3⁺ T-Zellen identifiziert. Mit verschiedenen therapeutischen Interventionsstrategien durch blockierende Antikörper gegen Tim-3 konnte eine verstärkte Eliminierung parasitärer Reservoirs erzielt werden. Während der frühen chronischen Phase der Infektion exprimierten CD8⁺ T-Zellen keine koinhibitorischen Rezeptoren. Allerdings führte die langanhaltende chronische Infektion zu dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen, welche durch eine hohe Expression des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 gekennzeichnet waren. Diese T-Zellen ko-exprimierten den Transkriptionsfaktor TOX. Dieser spielt bei der Bildung erschöpfter CD8⁺ T-Zellen und bei der Aufrechterhaltung des erschöpften Phänotyps eine entscheidende Rolle. Obwohl ein stark fortschreitender Entzündungsprozess zu beobachten war, zeigte das im Rahmen dieser Arbeit erprobte Modell keine Herzerkrankung. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass im Zusammenhang mit einer akuten Infektion die Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort nicht durch die Blockade von koinhibitorischen Rezeptoren wie Tim-3 gesteigert werden kann. Im Gegenteil dazu führt eine persistierende chronische Infektion im Muskel zu einer permanenten T-Zellaktivierung, was eine Anhäufung von erschöpften T-Zellen mit angepasster

Funktionalität bedingt. Dies spiegelt möglicherweise die Notwendigkeit des Wirtsimmunsystems wider, sich an den Zustand der chronischen T-Zellaktivierung anzupassen, um so den Schaden zu minimieren und gleichzeitig die Kontrolle des Erregers sicher zu stellen. Daher besteht nach wie vor eine dringende Notwendigkeit, die Regulationsprozesse der zellulären Immunität gegen *T. cruzi* besser zu verstehen, um neue therapeutische Strategien entwickeln zu können.

Summary

Infection with *Trypanosoma cruzi* and the resulting Chagas disease remains the most important neglected zoonosis in Latin America. Although this infection does not lead to specific symptoms in the acute phase, Chagas disease with its cardiac and/or gastrointestinal manifestations can lead to death. CD8⁺ T cells are essential immune mediators in the control of infection with *T. cruzi* due to their antigen-specific cytotoxic capacity. Although highly effective, they do not succeed in completely eliminating all parasites. How the function of CD8⁺ T cells is affected by the expression of coinhibitory molecules during the different stages of this infection was our research aim. Here we describe how T cells and their function are influenced by coinhibitory molecules during the different stages of *T. cruzi* infection in mice. During the acute infection of mice, the T cell compartment is modulated by transient induction of coinhibitory receptors. A high percentage of CD8⁺ Tim-3⁺ T cells was identified. Using different therapeutic intervention strategies with blocking antibodies against Tim-3, only an amplifying effect on the elimination of parasitic reservoirs could be achieved. During the early chronic phase of infection, CD8⁺ T cells did not express coinhibitory receptors, but the long-lasting chronic infection gave rise to dysfunctional CD8⁺ T cells, which were marked by high expression of the coinhibitory receptor PD-1. These T cells also co-expressed the transcription factor TOX, which plays a crucial role in the generation of exhausted CD8⁺ T cells and in the maintenance of the exhausted phenotype. Although we monitored a strong ongoing inflammatory process, our model did not show heart disease. Taken together, we show evidence that in the context of acute infection, the magnitude of CD8⁺ T cell response is strong enough and cannot be increased by targeting coinhibitory receptors like Tim-3. In contrast, persistent long-lasting chronic infection maintains long-lasting T cell effector activity and this leads to accumulation of exhausted T cells with adequate functionality located at the tissue of persistence. This may reflect the need of the host immune system to adapt to the state of chronic T cell activation by minimizing damage while ensuring pathogen control. Therefore, there is still an urgent need to better understand the regulation processes of cellular immunity against *T. cruzi*. in order to develop new therapeutic strategies.

1 Einleitung

1.1 Trypanosomen

Trypanosomen sind, evolutionsgeschichtlich betrachtet, ursprüngliche begeißelte Einzeller. Sie sind diploid und monophyletisch, das heißt, sie haben eine primär klonale Populationsstruktur, die aber sehr divers ist. Systematisch gehören sie zu der Ordnung der Kinetoplastida, deren Phylogenie zurzeit noch überarbeitet wird [1]. Die Ordnung der Kinetoplastida zweigte vor etwa einer Milliarde Jahre von den gemeinsamen Vorfahren ab. Charakteristisch ist, dass Kinetoplastida ein Organell besitzen, welches namensgebend ist: der Kinetoplast. Dieser enthält eine hoch organisierte Ansammlung von mitochondrialer DNA. Zu den wichtigsten Kinetoplastida gehören Parasiten von hoher medizinischer und tierärztlicher Bedeutung wie die Klassen *Trypanosomen* und *Leishmania*, welche Wirbeltiere zusammen mit einigen wirbellosen Tieren sowie auch Pflanzen infizieren können. Zu den wirbellosen Tieren gehören z.B. Fliegen, Sandmücken oder Wanzen, welche für ihre Rolle als Vektoren für jene Krankheitserreger bekannt sind [2].

1.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi ist ein promiskuer Parasit mit einer sehr geringen Wirtsspezifität. Er ist in der Lage, alle Vertebraten zu infizieren und nutzt als Wirt 175 unterschiedliche Kleinsäuger-Spezies und Reservoir-Tiere, welche keine Krankheitssymptome entwickeln. Um die phänotypische Vielfalt von *T. cruzi* besser zu verstehen und um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung gibt, wurden die *T. cruzi* Stämme (*strains*) vor zwanzig Jahren zunächst in zwei Gruppen eingeteilt, die die Namen *T. cruzi* I und *T. cruzi* II erhielten. Grundlage für diese Klassifizierung waren die wichtigsten biologischen und biochemischen Eigenschaften, die bis zu diesem Zeitpunkt mittels molekularer Techniken beschrieben worden waren. In den letzten zehn Jahren machten die wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Vielfalt von *T. cruzi*, die anhand von genetischen Sequenzierungstechniken gewonnen wurden, eine Reorganisation der Stämme und die Einführung einer homogenen Nomenklatur notwendig. So wurde als Konsens

vereinbart, die *T. cruzi* Stämme in *discrete type units* (DTUs genannt) aufzuteilen [3]. Die DTU I und DTU II werden definiert als Populationen, die genetisch stärker miteinander verwandt sind als jede andere Population und die durch gemeinsame Marker¹ zu identifizieren sind. Innerhalb dieser neuen Aufteilung ergeben sich sechs verschiedene Untergruppen, denn die *T. cruzi* DTU II wird ihrerseits in fünf Sub-DTUs unterteilt [4]. Trotz des erzielten Konsenses gibt es zusätzliche Studien, die noch mehr Unterteilungen innerhalb der DTU I nahelegen, die jedoch nicht in die Nomenklatur integriert wurden [5].

Einige Forscher stellen den Nutzen dieser Aufteilung und den der Nomenklatur in Frage. Obwohl die größere genetische Variabilität von *T. cruzi* als Ergebnis der klonalen Evolution verstanden wird, gibt es immer mehr Hinweise auf den genetischen Austausch zwischen Parasiten und darauf, dass diese Ereignisse die eigentliche Ursache der aktuellen Vielfalt sind [6]. Auch andere Studien zeigen, dass es bestimmte Gene und Genfamilien gibt, welche unter starkem immunologischem Druck stehen. Ein Beispiel hierfür sind die Proteinfamilie der trans-Sialidasen, weil sie die Hauptziele der schützenden Immunantwort des Wirtes sind und dieser konstante und selektive Druck die treibende Kraft ist, die die Expansion von Gensequenzen und die große genetische Variabilität zwischen den *T. cruzi* Stämmen bewirkt hat. Als Konsequenz sind die *T. cruzi* Karyotypen nicht stabil zwischen den Stämmen, was darauf hindeutet, dass es vielleicht keinen normalen vollständigen Chromosomensatz für *T. cruzi* geben kann. Diese karyotypische Plastizität kann eine Strategie oder ein weiterer Mechanismus sein, mit dem *T. cruzi* Vielfalt erzeugt, obwohl er anscheinend asexuell oder fast asexuell ist [7, 8]. All diese Aspekte und Unterschiede werden in den DTUs nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aktuelle genetische Klassifikation die große Variabilität zwischen den *T. cruzi* Stämmen nicht vollständig widerspiegeln kann. Bei Berücksichtigung wichtiger biologischer Merkmale weisen *T. cruzi* Stämme ein nahezu unbegrenztes Variationsspektrum im Mausmodell auf, z.B. in Bezug auf Parasitämie im peripheren Blut und in verschiedenen Geweben, Lokalisation der Entzündung während der akuten Phase der Infektion sowie Lokalisation und Persistenz der Parasiten in der chronischen Phase der Infektion. Die Beziehung zwischen der DTU

1 genetische, molekulare oder immunologische

und den biologischen Eigenschaften ist nicht konsistent. Weder die Virulenz, noch die Morbidität, noch die Mortalität in humanen Kohorte Studien hängen mit der DTU zusammen. Die beobachtete Resistenz gegen Benznidazol und Nifurtimox, die *in vivo* und/oder *in vitro* für einige *T. cruzi* Stämme nachgewiesen wurde, ist nicht mit einer bestimmten DTU assoziiert [4, 9].

1.3 Vektoren

Hämatophore Raubwanzen sind die Überträger von *T. cruzi*. Alle Entwicklungsstadien (fünf Larvalstadien, zwischen denen immer eine Häutung liegt) sind parasitisch und benötigen mindestens eine, später mehrere Blutmahlzeiten. Diese Insekten, sowohl die Weibchen als auch die Männchen, sind nachts aktiv und ernähren sich, wenn die Wirtstiere schlafen. Mit Vorliebe werden Stellen im Gesicht gestochen, an denen die Haut dünn und gut durchblutet ist. Dabei nehmen die Wanzen die Trypomastigoten Stadien der *T. cruzi* Parasiten auf. Die Entwicklung in der Wanze dauert 14 Tage und ist abhängig von der Umgebungstemperatur und dem Entwicklungsstadium der Wanze. Im Enddarm und Rektum der Wanze verbleiben die Epimastigoten bis sie zu metazyklischen Trypomastigoten gereift sind. Diese werden bei der nächsten Blutmahlzeit mit dem Urin und Fäzes ausgeschieden, denn die Raubwanzen brauchen viel Platz, um Blut aufzunehmen, weil sie das drei- bis zwölfwache ihres eigenen Körpergewichts saugen können. Der Stich ist schmerzfrei, dennoch verursacht er nach einiger Zeit starken Juckreiz. Durch das Kratzen werden die im Kot enthaltenen lebenden, infektiösen und mobilen Trypomastigoten in die Wunde eingeschmiert. Die Trypanosomen können sehr effektiv alle kernhaltigen Zellen aktiv infizieren [2].

1.4 Übertragung

Neben dem klassischen Infektionsweg durch den Vektor, welcher durch die Haut erfolgt, sind Ausbrüche aufgrund von oralen Infektionen mit schweren Krankheitsverläufen nicht ungewöhnlich und haben sogar in den letzten Jahren zugenommen. Zusätzlich gibt es den kongenitalen Übertragungsweg sowie Infektionen mit infiziertem Blut bei Transfusionen oder infizierten Organen bei Transplantationen. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Übertragungswege auf die klinischen Manifestationen der Chagas-Krankheit sind nur unzureichend untersucht worden.

Experimentelle Studien benutzen eine Vollblut-Infektion, welche intraperitoneal erfolgt und somit nicht den natürlichen Infektionswegen entsprechen.

1.5 Chagas-Krankheit

Die Chagas-Krankheit stellt eines der größten Probleme der öffentlichen Gesundheit in der Region Lateinamerika und der Karibik dar. Viele Jahrzehnte lang war die Chagas-Krankheit eine rein rurale Infektion. Sozioökonomische Veränderungen, Landflucht, Entwaldung und Urbanisierung haben das epidemiologische Profil der Infektion jedoch verändert und sie zu einem eher peri-urbanen Phänomen gemacht. Infektionen treten jetzt zunehmend in vielen peripheren städtischen Gebieten auf. Schätzungsweise sind weltweit acht Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert und jährlich kommen etwa 50.000 neue Fällen dazu. Eine unbehandelte *T. cruzi* Infektion führt in mehr als 14 000 Fällen pro Jahr zum Tode. Es ist zu erwarten, dass bis zu 5,4 Millionen Menschen eine chronische Chagas-Herzkrankheit und 900.000 Menschen ein Megakolon-Syndrom in den nächsten Jahren entwickeln werden [10, 11]. In den letzten Jahren wurde eine Infektion mit *T. cruzi* häufiger in Ländern festgestellt, in denen die Chagas-Krankheit nicht endemisch ist. Das Auftreten der Chagas-Krankheit außerhalb Lateinamerikas ist auf große Migrationsbewegungen in den letzten Jahrzehnten zurückzuführen. Obwohl die Krankheit in den meisten europäischen Ländern, einschließlich Deutschland, präsent ist, schenken die Gesundheitssysteme ihr nur wenig Beachtung. Es wird kein konsequentes Screening durchgeführt und daher wird nur selten eine Diagnose gestellt [12]. Bis 2009 wurden in Europa 4.290 *T. cruzi*-Fälle diagnostiziert, obwohl die Schätzungen zwischen 70.000 und 120.000 Fällen liegen. Die Unterdiagnose-Rate der *T. cruzi* Infektion liegt in Europa derzeit zwischen 94% und 96% [13, 14].

1.5.1 Krankheitsverlauf

Die Chagas-Krankheit verläuft in zwei Phasen. Zuerst erfolgt die akute Phase, die kurz nach dem Biss einer Raubwanze und dem Eintritt der Erreger in die Haut innerhalb der ersten 7-10 Tage stattfindet. Dabei kommt es zu einer kleinen Schwellung an der Eintrittsstelle und es treten unspezifische, grippeähnliche Symptome auf. Auch eine milde Myokarditis mit unspezifischen EKG-Veränderungen, eine Leber- und Milz-Beteiligung sowie generalisierte Lymphadenopathie sind möglich. In der Regel

sind die Symptome aber in der akuten Phase schwach ausgeprägt. Sie werden meist unbemerkt überstanden und nicht mit einer Chagas-Infektion in Verbindung gebracht. Bei immunsupprimierten Patienten, z.B. bei HIV-Infektion oder nach einer Organtransplantation, kann eine akute *T. cruzi* Infektion allerdings schnell tödlich verlaufen. In diesen seltenen Fällen zeigt sich auch eine Beteiligung des zentralen Nervensystems mit neurologischen Symptomen. Diese sind vielfältig und eher unspezifisch und können das zentrale, periphere oder autonome Nervensystem betreffen und Symptome wie Paresen, sensorische Ausfälle, Krampfanfälle, Schädigungen des Kleinhirns, fokale neurologische Defizite mit einer Störung der Exekutivfunktion, Meningismus und bis zu psychiatrischen Störungen auslösen [15]. Die chronische Phase der Infektion beginnt, wenn die Parasitenlast stark zurückgegangen ist und sich ein Gleichgewicht zwischen dem Parasiten und dem Immunsystem etabliert hat. Als Reservoir für den Parasiten dienen wenige Gewebenischen im Körper. Es besteht Beschwerdefreiheit und diese asymptomatische Periode, auch Latenzphase genannt, kann jahrzehntelang anhalten. Dies ist bei 70 % der infizierten Personen der Fall. Diese infizierten Personen können den Erreger dennoch übertragen. Nur bei etwa 30 % der Betroffenen kommt es zur klinischen Chagas-Krankheit mit pathologischen Veränderungen des Herzens oder des Darms. Die Schäden sind in der Regel nicht reversibel. Die Pathologie des Herzens zeigt sich in Form einer Kardiomegalie, die oft mit Reizleitungsstörungen und Herzrhythmusstörungen anfängt, und sich zu einer dilatativen Kardiomyopathie entwickeln kann. Diese geht mit einer Vergrößerung der Ventrikel einher, häufig mit Bildung eines apikalen Aneurysmas. Die häufigsten Elektro-Kardiogramm-Veränderungen sind atrioventrikuläre Blockierungen (AV-Blöcke), Rechtsschenkel- und bifaszikuläre Blöcke, polymorphe ventrikuläre Extrasystolen sowie ventrikuläre Tachykardien bis zu Kammerflimmern oder plötzlichem Herztod. Die typischen Symptome sind Dyspnoe, Schwindel, Palpitationen und Synkopen. Die Prognose der Chagas-Kardiomyopathie ist, obwohl heute gute Therapiemöglichkeiten für Herzinsuffizienz vorhanden sind, weiterhin schlecht [16, 17]. Die gastro-intestinalen Manifestationen der Chagas-Krankheit sind gekennzeichnet durch ein Megaösophagus und/oder Megakolon mit einer Erweiterung des Ösophagus und/oder Kolons aufgrund der Zerstörung des autonomen Nervensystems. Die ersten Symptome treten meist im Alter von 20 bis 40 Jahren auf und die Patienten zeigen

Dysphagie, Odynophagie und Dyspepsie. Es gleicht auch dem klinischen Bild einer Achalasie. Kennzeichnend ist auch eine verzögerte Entleerung, bedingt durch Hyperkontraktion bzw. erhöhten Muskeltonus Entwicklung. Die zirkuläre Muskelschicht des Oesophagus hypertrophiert, oft zeigt sich ein Versagen der ösophagealen Sphinkter mit Erbrechen. Es folgt eine Atrophie der Ösophaguswand mit Verlust der normalen Peristaltik und nachfolgender Dilatation. Darüber hinaus kann es zu mechanischen Komplikationen wie Volvulus oder Perforation kommen. Auch ein toxisches Megakolon ist möglich. Bei einer Magenbeteiligung kann es zur chronischen Gastritis kommen und bei einem Megaduodenum zu ungewöhnlichen Beschwerden im Oberbauch. Patienten haben bei dieser Ausprägung der Chagas-Krankheit einen erheblichen Verlust ihrer Lebensqualität. Gastro-intestinale Manifestationen der Chagas-Krankheit kommen vor allem in südlichen Ländern Lateinamerikas vor, jedoch tritt die Chagas-Kardiomyopathie insgesamt häufiger auf. Mischbilder sind möglich, jedoch kommt es häufig zu einem entweder kardial oder einem gastro-intestinal betonten Verlauf [18].

1.5.2 Pathophysiologie der Chagas-Krankheit

Die Pathogenese der Chagas-Krankheit ist bis heute nicht vollständig erforscht; es wird angenommen, dass all die im oberen Abschnitt beschriebenen Organkomplikationen im Wesentlichen durch eine chronische Inflammation hervorgerufen werden, welche durch die Persistenz der Parasiten im Gewebe bedingt ist. Einer der zusätzlichen relevanten Prozesse, der unabhängig von der Parasiten-Persistenz und der anhaltenden Immunantwort stattfindet, könnten neurogene Veränderungen aufgrund einer autoimmunen Reaktion sein [19].

1.5.3 Therapie

Es gibt zwei Präparate zur antiparasitären Behandlung der Chagas-Krankheit: Benznidazol von der F. Hoffmann-La Roche AG und Nifurtimox von der Bayer AG. Beide Medikamente wurden Ende der 1960er Jahre entwickelt. Außerhalb der akuten Phase der Infektion besteht keine Indikation für die Therapie, denn es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob es sinnvoll ist, Patienten in der chronischen Phase zu behandeln. Beide Substanzen müssen lange eingenommen werden (Einnahmedauer bis zu 90 Tagen) und die Einnahme ist in beiden Fällen mit erheblichen Nebenwirkungen wie

Gewichtsverlust und Anorexie, psychischen Veränderungen, Fatigue, gastrointestinalen Störungen, ZNS Neurotoxizität, peripheren Polyneuropathien, Exantheme, Thrombozytopenie, Geschmacksstörungen sowie Arthralgien, Pruritus, Photodermatosen, generalisierten Erythemen und Urtikaria, Erbrechen und Mutagenität verbunden.

1.6 Immunantwort in der *T. cruzi* Infektion

Die Immunität gegen *T. cruzi* wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus löslichen Molekülen, Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und hauptsächlich durch Zellen des adaptiven Immunsystems vermittelt. In der akuten Phase kontrolliert eine robuste Immunreaktion durch CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) erfolgreich die Replikation des Parasiten, was in den meisten Fällen nur zu unspezifischen Symptomen führt. Dennoch findet eine vollständige Eliminierung des Parasiten praktisch nicht statt. Während der chronischen Phase der Infektion ist eine angemessen regulierte T-Zellantwort unerlässlich, um den Parasiten unter Kontrolle zu halten [20, 21].

1.6.1 T-Zellen

Die adaptive Immunantwort gegen *T. cruzi* wird hauptsächlich von T-Lymphozyten durchgeführt. Diese Zellen können ein Leben lang Immunität vermitteln. T-Zellen sind spezialisierte Lymphozyten, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) mit einer hochspezifischen Antigenbindungsstelle besitzen. Die Vielfalt der Rezeptoren ist hauptsächlich auf die Reorganisation der DNA während der Entwicklung der T-Zellen zurückzuführen. Im Allgemeinen eliminiert die adaptive T-Zellantwort Pathogene durch zellkontaktabhängige Mechanismen und Sekretion von Effektorzytokinen und zytotoxischen Granula. Darüber hinaus werden unterschiedliche Populationen von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), die Toleranz vermitteln, von T-Helferzellen (T_H-1, T_H-17) sowie von Gedächtnis-T-Zellen, die im Falle einer erneuten Infektion eine schnellere und effektivere Immunantwort hervorrufen, gebildet. Bei der Ontogenese in dem Thymus werden autoreaktive T-Zellen durch negative Selektion eliminiert, denn Immuntoleranz² ist eine der elementaren Aufgaben des

² Wenn körpereigene Substanzen toleriert werden, d.h. eine Immunantwort gegen Selbstantigene nicht stattfindet.

Immunsystems. Dieser Prozess wird als zentrale Toleranz bezeichnet, aber bietet keinen absoluten Schutz gegenüber Autoimmunität³. Daher gibt es andere Mechanismen, welche zur Induktion einer peripheren Toleranz führen. Die periphere Toleranz wird außerhalb der lymphatischen Organe induziert. Zu den Mechanismen der peripheren Toleranz gehören die Induktion von Anergie, die Ignoranz gegenüber kryptischen und sequestrierten Antigenen⁴ und die Immunregulation durch T_{regs}. Anergie wird durch das Fehlen von kostimulatorischen Signalen induziert. Die Ignoranz von kryptischen Antigenen⁵ hängt von der Konzentration des Antigens ab. T_{regs} induzieren periphere Toleranz durch Zytokinsekretion mit subsequenter klonaler Suppression von Effektorzellen sowie durch direkten Kontakt. Zusätzlich zu diesen Mechanismen ist die Expression von koinhibitorischen Moleküle d.h. Proteine, die die Immunantwort negativ modulieren, ein wesentlicher Bestandteil der Zell-Zell-Interaktion und für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz höchst relevant. Die bekanntesten koinhibitorischen Moleküle, die auf T-Zellen exprimiert werden, sind CTLA-4 (*engl. für cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) und PD-1 (*engl. Programmed cell death 1*). Wenn T-Zellen ihre Entwicklung und Reifung im Thymus abgeschlossen haben, exprimieren sie unter anderem die CD4 oder CD8 Rezeptoren. Diese beiden Rezeptoren stellen die wichtigsten T-Zell-Populationen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen aus, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Wenn T-Zellen gereift sind, aber keinen Kontakt zum kognitiven Antigen haben, zirkulieren T-Zellen zwischen Blut und sekundärem Lymphgewebe. CD4⁺ T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, werden durch die Erkennung von Antigen auf Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Molekülen aktiviert, welche auf der Oberfläche von professionellen APZ wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Dieser Prozess findet in der Regel in den peripheren lymphatischen Organen statt. CD8⁺ T-Zellen erkennen das prozessierte Antigen, welches präsentiert als kurzes Peptid auf MHC-I-Moleküle geladen wurde. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen im Körper exprimiert.

³ Immunreaktionen gegen Autoantigene

⁴ Sequestrierung bezieht sich auf die passive Immuntoleranz, die darauf zurückzuführen ist, dass sich Antigene hinter physiologischen und anatomischen Barrieren befinden.

⁵ Antigen-spezifische Zellen werden durch Apoptose durch wiederholte kurzfristige Aktivierung des Antigens oder durch hohe Konzentrationen des Antigens eliminiert.

CD8⁺ T-Zellen können pro-inflammatorische Zytokine (IFN- γ und TNF- α) oder zytotoxische Moleküle (Granzym B und Perforin) sezernieren und somit infizierte somatische Zellen im Gewebe selektiv abtöten. Im Allgemeinen benötigen T-Zellen mehr als den MHC-TZR-Peptidkomplex, um vollständig aktiviert zu werden. Außerdem werden zusätzliche Signale wie kostimulatorische Moleküle, um die Proliferation zu fördern und zu unterschiedlichen Antworten zu führen. Kostimulatorische Signale werden durch Moleküle der B7-Familie (CD80 und CD86) und verschiedene andere Liganden vermittelt. Diese Moleküle befinden sich auf APZ oder somatischen Zellen und interagieren mit den T-Zellen. Sie unterstützen die Polarisierung der T-Zellantwort. Zusätzlich sezernieren APZ Zytokine, um die Polarisierung weiter zu fördern und die Proliferation der T-Zellen zu induzieren. Erst nachdem sie alle erforderlichen Informationen von Antigenen und Ko-Stimulationssignalen erhalten haben, tritt die T-Zelle wieder in den Zellzyklus ein und expandiert klonal. Der vielleicht wichtigste Ko-Rezeptor für eine korrekte Expansion der T-Zellen ist CD28, der an B7-Proteine bindet und für die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) wesentlich ist. Die erfolgreiche Aktivierung der T-Zelle induziert auch die Synthese der hochaffinen α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) [22]. Die wichtigsten Zytokine für das Überleben von T-Zellen sind Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-7 (IL-7) und Interleukin 15 (IL-15). Diese Interleukine spielen komplementäre Rollen bei der T-Zellaktivierung und Erhaltung. IL-2 ist ein wichtiger Überlebensfaktor in aktivierten T-Zellen, wird von diesen sezerniert und fördert daher das Zellwachstum auf autokrine Weise. Das weitere Überleben von T-Zellen ist auch von IL-7 abhängig. Effektorzellen, die zu Gedächtniszellen werden sollen, exprimieren den IL-7-Rezeptor (CD127) [23]. IL-7 und IL-15 sind für die Ontogenese von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* unverzichtbar. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-15 ein homöostatisches Zytokin ist, welches die schnelle Proliferation von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise steuert. Diese Zytokine können bestimmte Untergruppen von T-Zellen unterschiedlich regulieren, was sich vor allem auf die Aufrechterhaltung während der Kontraktionsphase⁶ der Immunantwort auswirkt, denn schließlich muss die T-Zell-Antwort zeitlich begrenzt werden [24]. Nach einer antigenspezifischen Aktivierung über

⁶ Die entstandene Immunantwort wird ausgeschaltet und ein Zustand der Homöostase wird erneut herbeigeführt.

den TZR expandiert die Mehrheit der T-Effektorzellen. Anschließend wird aufgrund von sinkenden Antigenmengen (Vernachlässigung), durch Fas/Fas-Ligand Interaktionen (Brudermord) oder durch Signale, die durch koinhibitorische Moleküle (negativen-Feedback-Schleifen) erhalten werden, die Apoptose eingeleitet [25].

1.7 T-Zell-Erschöpfung

Das Phänomen der T-Zell-Erschöpfung wurde in Modellen von chronischen Virusinfektionen und Tumorerkrankungen beschrieben. Die Tatsache, dass chronische Infektionen mit einer Verringerung der T-Zell-Immunität einhergehen, ist zum Teil auf die Expression von koinhibitorischen Molekülen wie PD-1, CTLA-4, Tim-3, Lag-3 u.a. und ihre inhibitorische Wirkung zurückzuführen [26-28]. Dieser fortschreitender Funktionsverlust wird durch eine verminderte Produktion von Zytokinen gekennzeichnet und könnte die Notwendigkeit widerspiegeln, sich an den Zustand der chronischen Infektion anzupassen, um einerseits den Schaden am Wirt zu minimieren und andererseits die Kontrolle der Krankheitserreger weiter zu vermitteln. T-Zell-Erschöpfung stellt im Kontext von chronischen Infektionen ein optimiertes Gleichgewicht dar [29]. Jüngste Studien im murinen Modell mit dem Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV) haben gezeigt, dass erschöpfte CD8⁺ T-Zellen durch die Expression des Transkriptionsfaktors engl. *thymocyte selection-associated high mobility group box Protein* (TOX), epigenetisch *imprinted*⁷ werden. Dies findet während des Übergangs zwischen akuter Phase und des Beginns einer chronischen Infektion statt. Somit ist die T-Zell-Erschöpfung eine durch TOX epigenetisch erzwungene Anpassung der Effektorfunktionen [30, 31]. Ein Teil der erschöpften T-Zellen, welche in der Effektorphase entstehen und die Kontraktionsphase überleben, exprimieren den Transkriptionsfaktor engl. *T cell factor 1* (TCF-1) und weisen so Stammzell-Eigenschaften auf [32, 33]. Sie können ohne permanenten Antigen-Stimulus überleben, sich teilen, ggf. expandieren und haben zudem die Fähigkeit, zytotoxisch zu wirken und Granzym B zu produzieren [34]. T-Zell-Erschöpfung kann auch bei Protozoen-Infektionen auftreten. Es gibt Studien, die dysfunktionale T-Zellantworten gegen

⁷ Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, bei dem bestimmte Genregionen durch Histonmodifikationen und DNA-Methylierung so geprägt werden, was zu einer veränderten Expression führt.

Toxoplasma gondii, *Plasmodium sp.* und *Leishmania sp.* zeigen. Diese T-Zellen weisen eine erhöhte Expression mehrerer koinhibitorischer Moleküle auf [35]. Um die Funktionsfähigkeit erschöpfter CD8⁺ T-Zellen wiederherzustellen, lassen sich *in vivo*-Blockaden von unterschiedlichen koinhibitorischen Signalwegen mittels monoklonaler Antikörper durchführen [28, 36, 37]. Die Erkenntnisse über die Möglichkeit der Aufhebung des Erschöpfungszustandes trieb die Entwicklung von Immunotherapien voran, die gegen gut untersuchte koinhibitorische Moleküle wie engl. *Programmed cell death 1* (PD-1) gerichtet sind. Koinhibitorische Moleküle werden „Checkpoint-Inhibitoren“ genannt und in der Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen erfolgreich eingesetzt.

Bisher ist die T-Zell-Erschöpfung im Verlauf von der *T. cruzi* Infektion sowie deren Relevanz für die Entwicklung der Chagas-Erkrankung nicht ausreichend untersucht worden. Es gibt zurzeit wenige Studien mit kleinen Kohorten von chronischen Chagas Patienten, welche über Jahrzehnte infiziert sind. Lasso *et al.* haben gezeigt, dass die CD8⁺ T-Zellen während des Fortschreitens der Chagas Erkrankung eine sukzessive Dysfunktion durchlaufen. Die CD8⁺ T-Zellen weisen einen terminal differenzierten Phänotyp und die Expression von mehreren koinhibitorischen Molekülen auf. Mit zunehmender Symptomatik zeigen die CD8⁺ T-Zellen der Patienten einen Verlust der Polyfunktionalität, denn die Kapazität, die entzündungsfördernden Zytokine IFN- γ und TNF- α zu produzieren, ist beeinträchtigt, wohingegen die Expression von zytolytischen Mediatoren, wie Granzym B und Perforin, verstärkt ist. Die Autoren schlagen vor, dass diese progressiven Veränderungen des CD8⁺ T-Zellkompartiments und die T-Zell-Erschöpfung die treibende Kraft der Herzkrankheit und der Chagas-Myokarditis ist [38]. Der Verlust der IFN- γ Produktion von *T. cruzi* spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Korrelation mit der Schwere der Herzerkrankung wurden ebenfalls in anderen Studien bestätigt [39, 40]. Die These der Erschöpfung der CD8⁺ T-Zellantwort durch die lange Zeit der chronischen Phase wird durch Studien an *T. cruzi* infizierten Kindern unterstützt. Diese haben deutlich kürzere Infektionszeiten und ihre CD8⁺ T-Zellen haben polyfunktionale *T. cruzi* spezifische Antworten [41]. Im Mausmodell für die chronische *T. cruzi* Infektion⁸ gibt es zurzeit zwei kontroverse Positionen. Pack *et al.*

⁸ >100 - 750 Tage post Infektion mit den Stamm *T. cruzi* Brazil

zeigen keine Expression von koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺ T-Zellen. Diese können trotz chronischer Antigenstimulation die essenziellen Funktionen ausüben und tragen langfristig zur Kontrolle von *T. cruzi* Parasiten im Gewebe bei. Die Autoren präsentieren ein Model, in dem die CD8⁺ T-Zell-Erschöpfung keine Rolle spielt für die Fähigkeit von *T. cruzi* in Mäusen zu persistieren [42]. Mateus *et al.* zeigen in ihren Untersuchungen an chronisch infizierten Mäusen⁹ das Gegenteil. Sie beschreiben monofunktionelle Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit hoher zytotoxischer Aktivität (Granzyme B und Perforin) und erhöhter Expression von koinhibitorischen Rezeptoren (vorwiegend CTLA-4 und PD-1) [43]. Welches der definitive Beitrag von koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺ T-Zellen für die Balance zwischen Protektion und Pathologie ist und, ob eine *in vivo* Blockade von koinhibitorischen Signalwegen die Persistenz der Parasiten und damit die Entstehung der Chagas Erkrankung beeinflussen kann, ist noch nicht geklärt worden. Aus dieser eben beschriebenen Forschungslage stellt sich die Aufgabe der vorliegenden Arbeit: das regulatorische Netzwerk der adaptiven Immunantwort im Mausmodel funktionell zu untersuchen. Aus diesem Grund werden im Folgenden die wichtigste koinhibitorischen Molekülen für diese Arbeit beschrieben.

1.7.1 CD39

CD39 (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/* NTPDase1) ist eine membranständige Ekto-Apyrase, die die Umwandlung von extrazellulärem ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) katalysiert. CD39 wirkt als „immunologischer Schalter“, wenn ATP als pro-inflammatorisches Signal in ADP umgewandelt wird, ist damit der weitere Weg zur Entstehung von Adenosin, als anti-inflammatorisches Signal, ermöglicht [44]. CD39 besteht aus 510 Aminosäuren und ist Ca²⁺ und Mg²⁺ abhängig. Zum einen ist die Aktivität von CD39 entscheidend für die Modulierung der Immunantwort durch den purinergen Signalweg [45] und zum anderen ist CD39 ein Marker für erschöpfte CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für chronische virale Erkrankungen sind, haben hohe Konzentrationen an CD39, sind enzymatisch aktiv, ko-exprimieren PD-1 und weisen ein Transkriptom entsprechend der Signatur der T-Zell-Erschöpfung auf [46, 47].

⁹ > 100 -260 Tage post Infektion mit den Stamm *T. cruzi* Y

1.7.2 PD-1

PD-1 (CD279) ist ein Molekül mit hemmender Wirkung. Es gehört zur B7-Familie und bindet an PD-1-L1 und PD-2-L2. Die Induktion von PD-1 auf der Oberfläche von T-Zellen findet innerhalb von 24 bis 72 Stunden nach der Aktivierung durch den TZR statt. PD-1 trägt zur Begrenzung der sich entwickelnden Effektor T-Zellantworten und zur Eindämmung von Gewebeschäden bei. Die Expression der PD-1-Liganden ist ebenfalls dynamisch und wird durch das Entzündungsmilieu reguliert. PD-L1 und PD-L2 werden auf vielen Zelltypen hochreguliert, einschließlich professioneller APZs [48, 49]. Die Bindung von PD-1 an seinen Liganden führt zu einer Hemmung der Zytokinproduktion und der T-Zell-Proliferation. PD-1 ist ein klassischer Marker für T-Zell-Erschöpfung [27] aber abhängig vom Kontext auch ein Marker für aktivierte T-Zellen oder *Type 1 regulatory T cells* (Tr1)¹⁰. Auch klassische Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (T_{regs}) exprimieren PD-1. Eine gestörte Expression von PD-1 kann zur Entwicklung von pathologischen Zuständen wie Autoimmunerkrankungen führen oder das Fortschreiten von Tumoren fördern [50]. Die therapeutische Blockade von PD-1 und dem Liganden PD-L1 zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen beim Menschen wird vielfältig eingesetzt, jedoch mit limitiertem Erfolg [36, 51-53]. Bei der akuten Malaria konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl von Plasmodien-spezifischen T-Zellen mit Effektorfunktion die koinhibitorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1 ko-exprimieren. Darüber hinaus üben diese PD-1⁺ CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen eine suppressive Aktivität auf anderen T-Effektorzellen aus und regulieren ihre Proliferation [54]. Bei der Infektion mit *T. cruzi* wurde gezeigt, dass während der akuten Phase der Infektion PD-1 auf im Herzen infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhöht exprimiert wird. Eine Blockade oder ein totaler Verlust des PD-1/PD-L1 Signalweges (PD-1^{-/-} Ko Mäuse) führt zu einer verringerten peripheren Parasitämie sowie geringerem Herzparasitismus, entfacht aber kardiale Entzündungsreaktionen. Dies geht mit einer erhöhten Mortalitätsrate einher [55]. Während der chronischen Phase¹¹ führte eine PD-1/PD-L1-Blockade zusammen mit einer Immunisierung mit bestrahlten *T. cruzi* Parasiten nur zu einer Verringerung der

¹⁰ Regulatorische T-Zellen vom Typ 1 (Tr1) sind eine einzigartige Population von CD4⁺ Foxp3⁺ Zellen, die hohe Mengen an IL-10 exprimieren und auf der Grundlage ihrer Expression von CD49b und LAG-3 charakterisiert werden.

¹¹ > 300 Tage nach Infektion

Blutparasitämie aber nicht zu einer besseren Eliminierung der Parasiten im Herzgewebe oder zu einer veränderten Zytokinproduktion [56].

1.7.3 Lag-3

Das Molekül engl. *Lymphocyte-activation gene 3* (Lag-3 oder auch CD223) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und strukturell dem CD4 Rezeptor auf T-Zellen sehr ähnlich. Die Lag-3 Expression wird durch die T-Zell-Aktivierung auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induziert. Lag-3 vermittelt und reguliert diverse biologische Effekte von der T-Zell-Aktivierung bis zur Homöostase [57]. Die Rolle von Lag-3 bei der Induktion, Expansion und Aufrechterhaltung von T_{regs} ist entscheidend [58]. Lag-3 kann zusammen mit CD49b als Marker für IL-10-produzierende regulatorische Tr1-Zellen sowohl in Mäusen als auch im Menschen verwendet werden [59]. Die Blockade von Lag-3 oder eine Lag-3 Defizienz verstärkt die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion. Das Fehlen des Lag-3 Signalweges führte zu eines T_H1-Phänotyps einer Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [57]. Lag-3 bindet selektiv an stabile Komplexe von Peptid- und MHC-Klasse II (MHC-II). Anders als früher angenommen, bindet Lag-3 nicht mit höherer Affinität an MCH-II und interferiert auf diesem Weg direkt mit der Interaktion zwischen CD4 und MHC-Klasse II oder zwischen dem T-Zell-Rezeptor und der MHC-Klasse II [60]. Wie genau die molekularen Aspekte der hemmenden Wirkung von Lag-3 vermittelt werden, sind noch weitgehend unbekannt, da kein inhibitorisches Motiv im zytoplasmatischen Bereich vorhanden ist. Die wenigen Bereiche die zwischen Menschen und Maus konserviert sind, und daher wahrscheinlich an der Signalübertragung beteiligt sind, weisen ein „KIEELE- Motiv“ auf [61]. Lag-3 trägt funktionell zur T-Zell-Erschöpfung in chronischen viralen Infektionen und Krebs bei. Studien zeigen, dass die Lag-3-Blockade mit der PD-1-Blockade während einer chronischen LCMV-Infektion synergistisch wirkt, die T-Zellaktivität wiederherstellt und die Viruskontrolle verbessert [62]. Auch eine doppelte Blockade (Lag-3/PD-1) von in tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen im Mausmodell konnte den erschöpften Phänotyp umkehren und die Tumorkontrolle sowie die Regression verbessern [63]. Bei der von *Plasmodium yoelii* verursachten Malaria führte die *in vivo* Blockade des PD-1-Liganden PD-L1 und Lag-3 zu einer verbesserten Funktion der CD4⁺-T-Zellen und somit zu einer rapiden Abnahme der Parasitämie und zu einer

erhöhten Anzahl der folliculären T_H-Zellen, B-Zellen und Plasmablasten mit verstärkter Produktion schützender Antikörper [64]. Zu dem Einfluss von Lag-3 während einer *T. cruzi* Infektion liegen bisher keine Informationen vor.

1.7.4 Tim-3

Tim-3 (CD336) ist ein membranständiges Typ I Glykoprotein und Mitglied der Tim-Genfamilie. Es wurde als Rezeptor beschrieben, welcher auf IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wurde [65]. Aufgrund des Fehlens von bekannten inhibitorischen Signalmotiven wurde vermutet, dass Tim-3 auch als kostimulatorisches Molekül fungieren kann. Tim-3 ist ein Marker für T_H1 Zellen sowie für zytotoxische T-Zellen. Tim-3 wird in naiven, nicht infizierten Mäusen, in geringen Mengen auf T_{regs} und NK-Zellen und besonders hoch auf Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ) exprimiert. In geringem Maß ist es auch auf CD4⁺ Effektor-Gedächtnis- und CD8⁺ T-Zellen (charakterisiert durch folgende Marker: CD44^{hoch}CD62L^{niedrig}) zu finden. Im Menschen ist Tim-3 in hohen Mengen auch auf DZs und in geringeren Mengen auf Monozyten vorzufinden. Notwendig für die Expression von Tim-3 ist das Vorhandensein von Interleukin 27 (IL-27) und dem Transkriptionsfaktor NFIL3 [66]. In der Maus sind vier funktionelle Familienmitglieder (Tim-1, Tim-2, Tim-3 und Tim-4) und beim Menschen sind drei (Tim-1, Tim-3 und Tim-4) vorhanden. Tim-3 besteht in der Maus aus 281 Aminosäuren während humanes Tim-3 aus 302 Aminosäuren besteht. Die Aminosäuresequenz weist eine Homologie von 63 % zwischen den beiden Spezies auf. Die zytoplasmatische Region ist bei Tim-3 in Maus und Mensch stark konserviert und enthält fünf Tyrosinreste (Y), welche bei der Signalübertragung von Tim-3 eine entscheidende Rolle spielen. Die Tim-Gene sind in einem zusammenhängenden Locus kodiert und sind sehr polymorph [31]. Im Menschen sind drei Polymorphismen mit allergischen und autoimmunen Erkrankungen sowie mit verschiedenen Krebsentitäten assoziiert worden [67]. Besonders bei Arthrose-Patienten wurde der Polymorphismus Tim-3+4259 T→G gefunden, welcher mit einem signifikant höheren IFN- γ mRNA Gehalt und Protein Expression in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp mit GG Genotyp und auch zu gesunden Spendern einherging [68]. Tim-3 besitzt eine variable IgV-Domäne sowie eine Mucindomäne. Außerdem besitzt Tim-3 kein klassisches ITIM Motiv für die Übertragung inhibitorischer Signale. Stattdessen weist Tim-3 fünf Tyrosinreste (Y) am

zytoplasmatischen Ende auf. Das Protein Bat3 ist an den dephosphorylierten zytoplasmatischen Teil von Tim-3 gebunden, rekrutiert Lck und bewahrt oder fördert möglicherweise sogar den T-Zell-Rezeptor-Signalweg. Nach Bindung eines Liganden findet die Phosphorylierung von Y256 und Y263 statt. Durch diesen Schritt wird das Protein Bat3 (engl. *HLA-B associated transcript 3*) freigegeben und die in SH2-Domäne enthaltende Src-Kinasen ermöglichen eine negative Regulation der Signale durch den TZR [61, 69, 70]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass nach einer Polarisierung zu einer T_H1 Antwort die Expression von Tim-3 stetig zunahm, bis diese T-Zellen ein hohes, stabiles Expressionsniveau des Markers KLRG1 zeigten und einen terminal differenzierten T_H1 Phänotyp hatten [71]. Bei chronischen Virusinfektionen und Krebserkrankungen wurden dysfunktionalen oder "erschöpfte" T-Zellen beschrieben, welche PD-1 und Tim-3 ko-exprimieren [72, 73]. Darüber hinaus führte die doppelte Blockade von Tim-3 und PD-1 in präklinischen Modellen zur Tumorregression und einer Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zellfunktionalität [74]. Auch eine Verbesserung der Viruskontrolle wurde bestätigt [75]. Auch bei Patienten mit HIV (engl. *Human immunodeficiency virus*) führte eine Blockade von Tim-3 zu einer Wiederherstellung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation und zu einer gesteigerten Zytokin Expression [76, 77]. Es wurden vier Liganden beschrieben, die mit Tim-3 interagieren. Das Zelloberflächenmolekül Galectin-9 (Gal-9) war der erste identifizierte Ligand. Dieser gehört zur Gruppe der S-Lektine, einer Familie von kohlenhydratbindenden Proteinen, von denen man annimmt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entzündungen und der Homöostase von Immunzellen spielen. Gal-9 wird ubiquitär exprimiert und durch IFN- γ hochreguliert. Es ist hervorzuheben, dass die Glykosylierung der IgV Region für die Bindung von Gal-9 entscheidend ist. Die Bindung von Gal-9 führt zu Apoptose. Als zweiter Ligand wurde das Molekül Phosphatidylserin (PtdSer) beschrieben. PtdSer ist ein Phospholipid und ein zentraler Bestandteil biologischer Membranen. Es spielt eine Schlüsselrolle als Gefahren-Signal in der Zellkommunikation und ist besonders im Prozess der *Clearance* (Beseitigung) von sterbenden Zellen beteiligt. Apoptotische und nekrotische Zellen verlieren ihre Membrandichtigkeit, exponieren immer PtdSer extrazellulär und fördern dadurch die Phagozytose durch Makrophagen und auch Granulozyten [78]. PtdSer fördert auch die Kreuzantigenpräsentation durch DZ. PtdSer bindet in einer Tasche innerhalb der

IgV-Domäne von Tim-3 und bewirkt eine Konformationsänderung, welche mit einer elektrostatischen Schaltung vergleichbar ist. Diese neue Arbeit suggeriert eine weitere Art und Weise Tim-3 zu aktivieren [79]. Als dritter Ligand wurde das Molekül *engl. High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1) identifiziert. HMGB1 ist ein DNA bindendes Protein, welches an der Modellierung von Chromatin und wichtigen nukleären Ereignissen beteiligt ist. HMGB1 wirkt im extrazellulären Milieu als Immunmediator, indem es als Alarmin oder *Damage associated molecular pattern* (DAMPs) fungiert [80]. Es wird nach einem pro-inflammatorischen Stimulus von abgestorbenen Zellen z. B. im Kontext von Sepsis oder bei schweren Verläufen der Malaria freigesetzt [80, 81]. HMGB1 spielt auch bei Tumorentwicklung und Immunabwehr eine wichtige Rolle [82]. Im Tiermodell und in klinischen Studien konnte auch gezeigt werden, dass HMGB1 an der Pathogenese von autoimmunen entzündlichen chronischen Erkrankungen beteiligt ist [83]. Sehr interessant im Kontext dieser Arbeit ist, dass *T. cruzi* ein eigenes HMGB Protein hat, welches von Cribb *et al.* als TcHMGB beschrieben wurde. Die Autoren konnten zeigen, dass TcHMGB in das Zytoplasma der Parasiten transloziert und anschließend ausgeschieden werden kann. Sie berichten, dass rekombinantes TcHMGB in der Lage ist, *in vitro* und *in vivo* Entzündungsreaktionen zu induzieren, welche durch die Produktion von Stickstoffmonoxid und entzündliche Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IFN- γ charakterisiert sind. Auch die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- β und IL-10, welche mit einer geringeren Anfälligkeit zur Entwicklung der Chagas-Krankheit in Verbindung gebracht werden [84, 85], konnten durch rTcHMGB induziert werden [86]. Als vierter und letzter Ligand wurde *engl. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (Ceacam-1) beschrieben. Dieses Oberflächenprotein und Zelladhäsionsmolekül wird zum Teil mit Tim-3 auf aktivierten T-Zellen ko-exprimiert und bildet in *cis* und *trans* ein Heterodimer (beide N-terminale Domänen jedes Moleküls). Das Vorhandensein von Ceacam-1 verleiht Tim-3 eine inhibitorische und toleranzbildende Funktion, denn Ceacam-1 stabilisiert die Expression von Tim-3 auf der Zelloberfläche [87]. Die größte Herausforderung für diese Untersuchung von Tim-3 und die weitere klinische Entwicklung von anti-Tim-3 basierten Therapien ist die große Vielfalt und breite Verfügbarkeit der vier Liganden *in vivo* und die daraus folgenden multiplen Interaktionen. Der in dieser Arbeit eingesetzte

blockierende Antikörper (anti-murines-Tim-3)¹² stellt die zurzeit effektivste Methode dar, die Signaltransduktion durch Tim-3 zu unterbinden. Zudem blockiert er die Interaktion mit PdtSer und Ceacam-1 gleichermaßen ohne zu einer Depletion der Tim-3⁺ T-Zellen zu führen [88]. Die Erzeugung einer genetisch modifizierten Tim-3-defizienten Maus (Tim-3 KO) wurde in einer einzigen Arbeit beschrieben und benutzt, um mit Hilfe eines OVA- *Listeria monocytogenes* (LM) Systems die Effektor Funktion von CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ Produktion sowie die Freisetzung zytotoxischer Granula zu untersuchen. Der Vergleich der Antworten auf die LM Infektion zwischen WT und Tim-3^{-/-} Mäusen zeigte, dass das Fehlen von Tim-3 die CD8⁺ T-Zellantworten signifikant reduzierte, was mit einer verminderten IFN- γ Produktion und Degranulation nach der *ex vivo* Antigen Stimulation einherging. Auch ein adoptiver Transfer von WT und Tim-3^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in einen gemeinsamen WT wurde durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird Tim-3 eine direkte verstärkende Wirkung auf die Signaltransduktion über den TZR zugeschrieben. Durch das Fehlen von Tim-3 ist eine signifikante Reduktion der Proliferation und die Bildung von Zytokinen zu beobachten. Die Ergebnisse von *Gorman et al.* belegen, dass Tim-3 eine direkte Auswirkung auf die Funktion der CD8⁺ T-Zellen hat und dass Tim-3 auch einen stimulierenden Effekt auf die Antworten der CD8⁺ T-Zellen im Rahmen einer akuten Infektion vermitteln kann. Die größte Kritik ist die mögliche Übertragung von Tim-3 Polymorphismen von dem 129S1 Mausstamm (genetische Hintergrund der benutzt wurde für die *targeted Mutation* in embryonalen Stammzellen) auf den B6 Mausstamm (Kreuzung in das Ziel Allel auf den C57BL/6-Hintergrund). Tim-3 Polymorphismen bei der Maus und daraus folgende Unterschiede in der Immunantwort werden bereits dokumentiert und haben entscheidende Auswirkungen bei der Regulierung der T-Zellantwort [89]. Das Fehlen einer geeigneten Tim-3^{-/-} Maus erschwert die Untersuchung dieses Moleküls. Die kontradiktorischen Beschreibungen der Funktion von Tim-3 bei der Regulierung der T-Zellantworten deuten darauf hin, dass die Rolle von Tim-3 *in vivo* viel komplexer ist, als es bisher angenommen wurde.

¹² RMT3-23 ist ein Ratten IgG2a Antikörper

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Mausmodells zur immunologischen Charakterisierung der chronischen Phase der *T. cruzi* Infektion. Unter Verwendung der Multiparameter-Durchflusszytometrie soll eine detaillierte Analyse der koinhibitorischen Moleküle auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der experimentellen Infektion mit dem *T. cruzi* Stamm *Brazil* (DTU I) in der Maus durchgeführt werden. Dabei soll geklärt werden, welchen Beitrag koinhibitorische Moleküle auf T-Zellen haben, um das Gleichgewicht zwischen effizientem Schutz und möglichst geringer Pathologie aufrecht zu erhalten und ob eine Störung dieses Gleichgewichts die Entstehung der Chagas-Krankheit begünstigt. Von besonderem Interesse war die Frage, ob das Phänomen der T-Zell-Erschöpfung während der *T. cruzi* Infektion auftritt und ob eine therapeutische Intervention durch die Blockade bestimmter koinhibitorischer Moleküle durch monoklonale Antikörper die Persistenz der Parasiten und damit die Entwicklung der Chagas-Krankheit beeinflussen kann. Weitere funktionelle Analysen der T-Zellantworten, der antigenspezifischen Zytokinproduktion und der pro-inflammatorischen Zytokine im Serum sollen tieferen Einblick in die immunologischen Abwehrmechanismen ermöglichen.

2 Materialien

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 1: Liste der eingesetzten Geräte

Geräte	Art/Typ/Model	Hersteller
Autoklav	6464L	Schlumbohm Medizintechnik (Hamburg)
CO ₂ -Inkubator	Heracell150	Thermo Scientific (Waltham/USA)
Durchflusszytometer	AccuriTM C6	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)
Durchflusszytometer	LSR II	
Elisa Photometer	MRX II	Dynex Technologies (Berlin)
Fluoreszenzmikroskop	BZ-9000	Keyence GmbH (Insenburg)
Flüssigstickstoffbehälter		Air Liquide Medical (Düsseldorf)
H ₂ O Purificationssystem	MilliQ	Millipore (Darmstadt)
Hämozytometer		Marienfeld (Lauda-Königshafen)
Kühl-/Gefrieranlagen		Liebherr, Bulle (Schweiz)
Mikroskop	H500	Helmut Hund (Wetzlar)
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop	CKX41SF	Olympus (Hamburg)
Mikrowelle		Panasonic (Wiesbaden)
Multifuge	X3R Heraeus	Thermo Fischer Scientific (Waltham/USA)
Nanodrop	2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham/ USA)
pH-Meter	pH211	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Pipetten		Gilson (Middletown)/ Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettierhilfe	SWIFTPET+	HTL S.A. (Warschau)

Präparierbesteck		Neolab (Heidelberg)
Präzisionswaage	SI-2002	Denver Instrument (Göttingen)
Präzisionswaage	CS200	Ohaus, Nänikon (Schweiz)
Reflotron®	Plus	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Rotor Gene	6000	QIAGEN (Hilden)
Sicherheitsbank	Flowsafe© B- [MaxPro] ³ -130	Berner International GmbH (Elmshorn)
Sterilbank	B-[MaxPro] ³ -130	Berner (Elmshorn)
Sicherheitsklasse II	LaminAir HB2448	Thermo Scientific (Schwerte)
Thermomagnetrührer	RET-GS	IKA®-Werke (Staufen)
Thermomixer	comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank	HS6686	Hettich (Tuttlingen)
Vevo LAZR-X		Fujifilm VisualSonics (Japan)
Vortexmischer	V1 plus	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, (Steinfurt)
Wasserbad		B Braun (Melsungen)
Wasserbad		Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Zentrifuge	5415C, 5415D, 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Hereaus Multifuge X3R	Thermo Fischer Scientific (Osterode)

2.2 Gebrauchswaren

Alle Chemikalien und Materialien, deren Ursprungsländer nicht aufgeführt sind, wurden aus Deutschland bezogen.

Tabelle 2: Liste der Gebrauchswaren

Waren	Hersteller/Lieferant
96-well Zellkulturplatten (Rundboden, Flachboden)	Sarsted (Nümbrecht)
Cell Strainer 70 µm	BD Bioscience (Heidelberg)
Deckgläser	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einweg-Handschuhe	Kimberly-Clark (Roswell, USA)
ELISA 96-well-Platte	Greiner Bio One (Frickenhausen)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon (15 mL, 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasflaschen Schott Duran	Schott AG (Mainz)
Kryo-Tubes (1.5 mL)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm ² / 0,02 mm x 0,0025 mm ²)	Paul Marienfeld, (Lauda- Königshofen)
Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht (Edermünde)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (0,5 mL/1,5 mL/2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Glaspipetten (5 mL, 10 mL, 20 mL)	Brand (Wertheim)
Serologischen Kunststoffpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (T25, T75, T125)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.3 Material für zellbiologischen Arbeiten

Alle Puffer und Gebrauchslösungen wurden mit sterilem, destilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt. Bei fehlenden Angaben über die Lagerung wurden die Chemikalien bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 3: Liste der Reagenzien, Chemikalien und Kits Liste der Enzyme

Reagenzien	Hersteller
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva GmbH & Co. KG. (Heidelberg)
Mouse MCP-1/CCL2 ELISA MAX #432701	Biolegend (San Diego, USA)
Cohn-Fraktion II Globuline	Sigma-Aldrich (St. Luis/USA)
DAPI (2,6-Diamidin-2-Phenylindol)	Thermo Fischer (Waltham/USA)
DMEM (ohne Glutamin)	PAA (Pasching/ Österreich)
Descosept Pur	Dr. Schumacher (Malsfeld)
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
EDTA	Millipore (Burlington/ USA)
Fc-Block (RPMI + Hybridom Fc)	BNITM, Abt. Immunologie (Hamburg)
FCS (Fötales Kälberserumalbumin)	Thermo Fischer Scientific (Waltham/USA)
Flow Sheath Puffer	BD Bioscience (Heidelberg)
Foxp3 Staining Buffer Set (Cat. N° 00-5523-00) Permeabilization buffer (10X) Fixation/Permeabilization (concentrate) eBioscience™ Fixation/Perm (diluent)	eBioscience (Frankfurt)
Gentamycin (10 mg/mL)	GE Healthcare (Freiburg)
Hepes (1 M)	Sigma-Aldrich (St.Luis/USA)
Incidin Liquid	Ecolab (Düsseldorf)
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies (Darmstadt)
Legendplex 13-Zytokine	Biolegend

Cat. N° 740005	(San Diego, USA)
Live/Dead TM Blue Fluorescent reactive dye	Invitrogen, (Carlsbad/USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
PFA (Paraformaldehyd)	Merck (Darmstadt)
Refloton Stripes (AST, CK)	Roche
Roti-Mount FuorCare Dapi	eBioscience (Frankfurt am Main)
RPMI 1640 (ohne Glutamin)	PAA (Pasching/ Österreich)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Luis /USA)
Trypan Blau (0,4 %)	Serva (Heidelberg)
Trypsin-EDTA (0,05 % in PBS)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Waschpuffer Durchflusszytometer	BD Bioscience (Heidelberg)

2.3.1 Enzyme

Tabelle 4: Liste der Enzyme

Name	Hersteller
Kollagenase II <i>Clostridium hystolitycum</i> Cat. No. C 2-22	Biochrom (Berlin)
Dispase (Cat. No 17105-041)	Thermo Fisher (Waltham/USA)

2.3.2 Medien und Gebrauchslösungen

RPMI 1640

Für 500 mL gebrauchsfertiges Medium

10 % Hitzeinaktiviertes FCS	50 mL
1 % L-Glutamin (200mM)	5 mL
0,5 % Gentamycin (10mg/mL)	2,5 mL

steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Verdauungsmedium für Muskelgewebe in DMEM

0,2 % Kollagenase Typ II (Stocklösung 200 mg / ml)

0,05 % Dispase (Stocklösung 50 mg / ml)

Erythrozytenlysepuffer

10 % 0,1 M Tris /HCL (pH 7,5)

90 % 0,16 M NH₄Cl (0,83 g/100 mL in Aqua dest.)

autoklaviert, steril filtriert und bei RT gelagert.

FACS Puffer

Für 1000 mL

1 % FCS (10 mL)

0,1 % Natriumazid (NaN₃) in PBS (1 mL)

steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Einfriermedium für Parasiten / Vollblut mit Parasiten

40 % FCS (v/v)

10 % DMSO (v/v)

in entsprechendem Zellkulturmedium 50 %

20 x PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

160 g Natriumchlorid (NaCl)

4 g Kaliumchlorid (KCl)

28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

ad 1 L ddH₂O

pH 7,4

steril filtriert und bei RT gelagert.

Blockierungspuffer

2 % BSA

0,1 % Triton X-100

in DPBS

Permeabilisationspuffer

01, % Triton X-100

in DPBS

2.3.3 Stimulations- und Blockreagenzien

Tabelle 5: Stimulationsreagenzien und blockierende Antikörper

Material	Hersteller
Ionomycin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Monensin	Biolegend (San Diego/USA)
Ultra-Leaf Anti-Maus CD366 (Tim-3) Klon: RMT3-23	Biolegend (San Diego/USA)
LEAF Purified Rat IgG2a, k Isotype Ctrl Klon: RTK2758	Biolegend (San Diego/USA)

2.3.4 Peptide

Die Peptide wurden bei JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin bestellt. Die Sequenzen entsprechen Epitope der trans-Sialidasen Familie und gehören zu den am stärksten vertretenen H-2K^b-bindenden Peptide im Proteom und lösen die stärkste CD8⁺ T-Zellantwort nach einer Infektion mit dem Stamm *T. cruzi* Brazil aus [90].

Tabelle 6: *T. cruzi* Peptide

Name	Sequenz
TSKB10	ANYDFTLV
TSKB20	ANYKFTLV

2.4 Antikörper für Durchflusszytometrie

Für die FACS-Analysen sind in folgende Tabelle alle Primärantikörper aufgeführt in den entsprechenden Verdünnungen verwendet wurden.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Anwendung im FACS

Target	Klon	Verdünnung	Fluorochrome	Hersteller
BTLA	6F7	1:200	PE	Biolegend
CD103	2E7	1:100	PeDazzle	Biolegend
CD107a	1D4B	1:200	BV421	Biolegend
CD11a	M17/4	1:500	V450	eBioscience
CD160	7H1	1:200	PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD27	LG.3A10	1:200	FITC	Biolegend
CD3	145-2C11	1:200	AF488	Biolegend
		1:300	BUV395	BD
		1:300	PE	BD
		1:200	eFluor 610	Invitrogen
CD3	17A2	1:300	Pe/Cy7	Biolegend
CD39	Duha59	1:100	PE	Biolegend
CD4	RM4-5	1:400	V500	Biolegend
CD44	IM7	1:400	PE/Cy7	Biolegend
			AF700	
			BV421	
CD45	30.F11	1:300	APC-Cy7	BD
CD62L	Mel-14	1:300	PerCP	Biolegend
			PerCp-Cy5.5	
			Pe	
CD69	H1.2f3	1:100	BV785	Biolegend
CD73	TY/11.8	1:200	APC	Biolegend
CD8	53-6.7	1:200	AF700	Biolegend
CD8	53.67	1:400	V450	eBioscience

CTLA-4 (CD152)	UC10- 4F10-111	1:200	PE	BD
Foxp3	FJK16a	1:100	FITC AF700	eBioscience
Granzym B	NGZB	1:200	Pe610	Invitrogen
H-2k ^b - ANYKFTLV Dextramer	---	1:50	PE	Immudex
IFN γ	XMG1.2	0,3 μ L/well	AF 488	Biolegend
KLRG1	2F1	1:200	e780	eBioscience
LAG-3	C9B7W	1:200	PerCP-Cy5.5	Biolegend
NK1.1	PK136	1:400	Pe-Cy7	BD
PD-1 (CD279)	RMP1-30	1:200	PE/Cy7	Biolegend
Tim-3 (CD366)	RMT3-23	1:200	APC Pe-Cy7	Biolegend
TNF- α	MP6XT22	1:200	AF700	Biolegend
TOX	REA473	1:100	PE	Miltenyi Biotec

2.5 Material für biochemische Arbeiten

Tabelle 8: Chemikalien für biochemische Arbeiten

Reagenzien	Hersteller
BSA	GE Healthcare (Freiburg)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Tetra-Methyl-Benzidin (TMB)	BD Bioscience (Heidelberg)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Ampuwa Wasser	Fresenius, Graz (Austria)

2.5.1 Gebrauchslösungen und Puffer

PBSA 0,1 % und 1 %

BSA in PBS, steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

ELISA-Substrat-Puffer

Für 500 mL

15,6 g NaH₂PO₄ in H₂O

pH 4 – 5,5

Substrat

200 µL TMB (Tetra-Methyl-Benzidin 6 mg/mL in DMSO)

12 mL Substratpuffer (0,1 M Natriumphosphat, pH 5,5)

1,2 µL H₂O₂

ELISA Wasch-Puffer

Für 1000 mL

0,1% Tween 20 (1 mL)

in 1000 mL 1x PBS

2.5.2 DNA Oligonucleotide für qPCR

Alle Oligonucleotide wurden von Eurofins synthetisiert. Die Primer Sequenzen zielten auf die *T. cruzi* Kinetoplast DNA und mausspezifische primer GAPDH ab [91-93].

Tabelle 9: Oligonucleotidsequenzen für die qPCR

Target	Name		Sequenz	Länge (bp)
kDNA	kDNA	121F	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	330
		121R	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA	
GAPDH	GAPDH	GAPDH_F	GTCGGTGTGAACGGATTTGG	182
		GAPDH_R	TTCCCATTCCTCGGCCTTGAC	

2.5.3 Kits

Alle Kits wurden nach Hersteller Angaben benutzt.

Name	Hersteller
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)

2.6 Mausstämme

Mus musculus (BNITM) C57Bl/6J
RAG^{-/-}

2.7 Parasitenstämme

Tabelle 10: *Trypanosoma cruzi* Stämme

Bezeichnung	Herkunft
<i>Trypanosoma cruzi</i> Brazil [94]	Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén Buenos Aires, Argentinien

2.8 Zelllinien

86HG39 Immortalisierte humane Glioblastoma BNITM Hamburg

2.9 Software

Tabelle 11: Liste der benutzten Programme

Software	Hersteller
BD FACS DIVA 6.2	BD Bioscience (Heidelberg)
FlowJo Version 10.0.7	Tree Star, Inc. (Ashland/USA)
Prism Version 8.0c	GraphPad Software, Inc. (La Jolla/USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond/USA)
Endnote X7.1	Thomson Reuters (New York/USA)

3 Methoden

3.1 Tierversuche

Alle Infektionsexperimente wurden von der Behörde für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg genehmigt (TVV 52/17). Mäuse (vgl. 2.6) wurden im Tierhaus des BNITM gezüchtet. Mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse in die Tierhaus-Anlage der BSL-3 Labor transportiert. Dort wurden die Tiere in einzelbelüfteten Käfigen (IVC, *individual ventilated cages*) gehalten.

3.1.1 *In vivo* Infektion der Mäuse mit *T. cruzi*

Um eine konstante und reproduzierbare Infektion zu gewährleisten, wurden frische Blut Trypomastigoten für alle Infektionsexperimente benutzt. Diese frischen Parasiten stammen aus einer Vorversuchsm Maus (RAG^{-/-}), welche 14 Tage vor Versuchsbeginn mit $1 \cdot 10^5$ Parasiten aus der Zellkultur i.p. infiziert wurde. Nach Infektion wurde die Parasitämie im Blut bestimmt. Dann wurde die Maus, durch langsames Einfließen von CO₂ in den Käfig, stark unter Narkose gelegt und mit einer finalen Blutabnahme direkt aus dem Herzen (Herzpunktion) erlöst. Die Spritze für die Herzpunktion enthielt Heparin. Das Vollblut wurde, je nach Parasitämie, mit DPBS verdünnt, um eine Infektionslösung für den Versuch anzusetzen. Bei allen Versuchen wurde eine Infektionsdosis von $2 \cdot 10^3$ Blut Trypomastigoten in ein Endvolumen von 200 µL DPBS i.p. verabreicht. Bei den naiven Kontrollen wurde nur 200 µL DPBS i.p. verabreicht. Alle Versuche wurden mit weiblichen Mäusen durchgeführt. Diese wurden im Alter von 7 Wochen infiziert.

3.1.2 Monitoring des Gesundheitszustands

Das wichtigste Kriterium für die Bewertung des Gesundheitszustands von Mäusen während der gesamten Zeit der Infektion war eine Änderung des Gewichts. Als moderat erkrankt galten Mäuse ab einem Gewichtsverlust von 10 % und bei einer Abnahme von mehr als 20 % wurden die Tiere als schwer erkrankt eingestuft und sofort erlöst. Dieser Zeitpunkt wurde als Todeszeitpunkt vermerkt. Auch bei einer Zunahme von mehr als 15 %, welches auf eine Aszites hindeutet, wurden die Tiere als moderat erkrankt eingestuft und intensiver beobachtet. Auch die natürliche Verhaltensweise, Körperhaltung und Bewegungsabläufe wurden beobachtet. Insbesondere wurde auf

das Auftreten von klinisch wichtigen Zeichen wie Tremor, Ataxien oder Paralysen geachtet. Schließlich wurde die Parasitämie im peripheren Blut kontrolliert (vgl 3.2.4). Bei einer nachweisbaren Parasitämie in der Zeit der akuten Phase (0-30 d.p.i) wurden die Tiere als moderat erkrankt und beim Eintreten von Gewichtsänderung und/oder mindestens einem klinischen Zeichen wurden die Tiere als schwer erkrankt eingestuft und das Experiment beendet.

3.1.3 Behandlung mit Antikörpern

Die Blockade von Tim-3 erfolgte durch die i.p. Injektion von anti-Tim-3. Hierfür wurden 200 µg der neutralisierenden Antikörper in 200 µL DPBS i.p. verabreicht. Die Kontrollen erhielten nur 200 µL DPBS oder 200 µg Rat IgG2a,k. Die neutralisierenden Antikörper wurden zu verschiedenen Zeitpunkten appliziert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung der HG39 Zelllinie

HG39 Zellen wurden eingesät und unter sterilen Bedingungen in T25 und T75 Zellkulturflaschen gehalten. HG39 Zellen haben eine Duplikationszeit von drei Tagen. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das RPMI Medium von dem Zellrasen abgenommen und anschließend mit DPBS gewaschen. Danach wurde mit 0,05 % Trypsin-EDTA für 5 Min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Durch mehrmaliges Pipettieren oder Klopfen der Zellkulturflaschen wurden die Zellen dissoziiert und durch Zugabe von RPMI die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden bei 314 g zentrifugiert für 5 Min und bei 4°C und in frisches RPMI Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde wie unter 3.2.2 beschrieben ermittelt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen einer entsprechenden Verdünnung mit Trypanblau-PBS (1:10) aufgenommen. Davon wurden 10 µL in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer (0,1 mm) pipettiert. Es wurden vier große Außenquadrate am Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl} = X/4_{\text{Großquadrate}} \times 10_{\text{Verdünnungsfaktor}} \times 10^4 \text{ Parasiten/ mL}$$

3.2.3 Kultivierung von *T. cruzi* Parasiten

Kryokonservierte Parasiten wurden aufgetaut, mit DPBS zweimal gewaschen und 15 min bei 2671 g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in komplett RPMI Medium resuspendiert und damit wurden > 50% konfluente HG39 Zellkulturflaschen infiziert. 24 h nach der Infektion wurde das Medium gewechselt und somit alle nicht viablen Parasiten mit dem Medium verworfen. Parasiten in der Zellkultur wurden in regelmäßigen Abständen passagiert (mind. einmal pro Woche). Nach drei Tagen wurden Amastigoten sichtbar und spätestens nach 7 Tagen waren Trypomastigoten freischwimmend im Medium.

3.2.4 Parasitämie Bestimmung

An unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion wurden 2 µL Blut aus der Schwanzspitze gewonnen und in 18 µL (1:10) mit Erythrozyten-Lyse-Puffer gemischt. Nach 5 min bei RT, wenn die Erythrozyten-Lyse beendet war, wurden die vitalen Parasiten mit einer Neubauer-Zählkammer (0,02mm) gezählt.

$$\text{Anzahl} = X/4 \text{ Großquadrate} \times 10 \text{ Verdünnungsfaktor} \times 5 \text{ Kammerfaktor} \times 10^4 \text{ Parasiten/ mL}$$

3.2.5 *T. cruzi* lösliches Antigen

Trypomastigoten aus der Zellkultur wurden geerntet und mit kalter PBS gewaschen und in einer Dichte von mind. 1×10^6 Parasiten/µl in steriler PBS resuspendiert. Die Parasiten lysiert durch bei fünf Zyklen von Einfrieren und Auftauen. Dafür wurden die Parasiten fünf Minuten bei -196 °C eingefroren und fünf Minuten bei 56°C aufgetaut. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, dass keine Trypomastigoten mehr vital waren. Der Überstand mit *T. cruzi* löslichem Antigen wurde nach Zentrifugation bei 2671 g für 15 min bei 4°C gesammelt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Proteinmessfunktion mit den Nanodrop gemessen.

3.2.6 Präparation von murinen Splenozyten

Die Milz wurde entnommen und in einem Röhrchen in 5 mL Medium (RPMI und 10 % FCS) aufgenommen. Unter der Sterilbank wurde die Milz mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels auf einer Petrischale zerrieben, um eine Einzelzellsuspension

herzustellen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt und 5 min bei 314 g und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet mit 5 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 mL Medium konnte die Erythrozytenlyse gestoppt werden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 314 g und 4 °C erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 10 mL Medium resuspendiert und dann durch einen sterilen 70 µm *Cell strainer* filtriert. Schließlich wurde ein 10 µL Aliquot für die Zellzahlbestimmung entnommen. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 2×10^7 /mL eingestellt [95].

3.2.7 Präparation von murinen Muskelzellen

Das Muskelgewebe aus dem Ober- und Unterschenkel wurden mit einem Skalpell entnommen und in 10 mL Röhrchen in PBS/2 % FCS gesammelt. Das Gewebe wurde in eine Petrischale gelegt, das überschüssige PBS wurde vorsichtig entfernt, und das Gewebe mit einer Schere zerkleinert. Die zerkleinerten Stücke wurden in 10 mL Verdaumedium in einem 50 mL Röhrchen aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Jede 10 Minuten wurden die Behälter geschüttelt. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe einer 10 mL Pipette hoch und runter pipettiert, bis das Homogenat sanft und frei durch die Pipette fließen konnte. Das Homogenat wurde erneut bei 37°C und 5% CO₂ für weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 ml FCS zugegeben, um die enzymatische Reaktion zu stoppen, und mit einer Pipette durchgemischt. Die 50 mL Röhrchen wurden mit PBS/2 % FCS aufgefüllt und 5 Minuten bei 314 g zentrifugiert. Der größte Teil des Überstandes (bis etwa 10 mL) wurde abgesaugt und zum zweiten Mal in einem Volumen von 50 mL resuspendiert. Das Homogenat wurde durch einen 70 µm *Cell strainer* filtriert, der mit 2 mL FCS vorgewaschen wurde und auf ein Volumen von 50 mL mit PBS/2 % FCS aufgefüllt. Das Filtrat wurde 5 Minuten bei 314 g zentrifugiert und das Pellet in 1 mL PBS/2 % FCS oder RPMI resuspendiert. Schließlich wurde ein 10 µL Aliquot für die Zellzahlbestimmung entnommen.

3.2.8 Stimulation der Zellen

Um zu testen, ob die aus dem Gewebe isolierten T-Zellen die Fähigkeit besitzen Zytokine zu produzieren, wurden in eine sterile 96-*well* Rundboden Mikrotiterplatte jeweils 2×10^6 Zellen pro *well* pipettiert. Die Platte wurde 5 min bei 314 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend die Zellen *in vitro* stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit:

- a. 50 ng /mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 500 ng /mL Ionomycin
- b. 1 µg Peptid-Mischung (vgl.2.3.4) in 190 µL RPMI
- c. Mit *T. cruzi* löslichen Antigen (vgl. 3.2.5)

Insgesamt wurden die Zellen für 5 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden nach 1 h mit einer Monensin (0,2 µL in 10 µL RPMI pro *well*) für weitere vier Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Schließlich wurde die Platte zweimal für 5 min bei 314 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 200 µL PBS gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis von Zytokinen mittels intrazellulärer FACS Färbung [95].

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, die die Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch die Messung von Fluoreszenzintensitäten und den Streulichteigenschaften einzelner Zellen ermöglicht. Die Zellen werden hierfür mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Intensitäten sind proportional zur stöchiometrisch gebundenen Farbstoffmenge. Diese Signale werden durch *Photomultiplier* verstärkt und in ein analoges, elektrisches Signal umgewandelt. Aus diesen Signalen werden digitale Daten erzeugt und mittels einer Software ausgewertet. Die Daten können in Form von *Dot Plots* oder Histogrammen dargestellt werden. Die nach vorne abgelenkten Strahlen oder auch "Vorwärtsstreulicht" (*engl. forward scatter, FSC*), erlauben eine Aussage über die Größe der Zelle, während das "Seitwärtsstreulicht" (*engl. side scatter, SSC*) als ein Maß für die Zellgranularität dient. Durch das Auftragen beider Größen in einem Diagramm (SSC über FSC) können einzelne Zellpopulationen unterschieden werden.

3.3.1 Extrazelluläre Färbung

Nach der Isolierung der Zellen erfolgt der Nachweis von Oberflächenantigenen mittels einer extrazellulären Färbung. In einer 96-*well* Rundboden Mikrotiterplatte wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 100 μL pro *well* pipettiert und anschließend bei 314 g für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes bleibt ein Restvolumen von ca. 15 μL im *well* erhalten. Die entsprechenden Antikörper wurden in F_c-Block so verdünnt, dass die gewünschte Endkonzentration (siehe Tabelle 7) im *well* erreicht wurde. Die Färbung wurde im Dunkeln und bei 4 °C für 30 min inkubiert. Schließlich wurden nicht-gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 150 μL PBS entfernt. Vor der durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in 200 μL PBS aufgenommen.

3.3.2 Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre Färbung wurde immer im Anschluss an eine Oberflächenfärbung durchgeführt, um Antigene, die intrazellulär exprimiert wurden, nachzuweisen. Zuerst wurden die Zellen mit Hilfe des Foxp3 Kits von eBioscience nach Angabe des Herstellers fixiert und anschließend wie in 3.3.1 beschrieben gefärbt. Schließlich wurden nicht-gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 150 μL Perm/Wasch Puffer entfernt. Vor der durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in 200 μL Perm/Wasch Puffer aufgenommen.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Isolierung von DNA aus Gewebeproben

An dem jeweiligen Tagen wurden 25 mg Herz, Leber, Skelettmuskel und Milz entnommen und mit PBS gespült, um eine mögliche Kontamination mit Blutparasiten zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur DNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Am Tag der Extraktion wurden die gefrorenen Gewebeproben aufgetaut und auf Raumtemperatur (15-25°C) äquilibriert und sofort mechanisch zerlegt und homogenisiert. Die Gewebesuspension wurde über Nacht bei 56 °C mit Lysepuffer und Proteinase K aus dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) inkubiert und die DNA-Isolierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Beurteilung der Reinheit und Menge der DNA wurde das NanoDrop® Spektrophotometer (Thermofischer) verwendet.

3.4.2 Generierung einer Standardkurve für qPCR

Die DNA-Standards wurden aus homogenisierten Gewebeproben von naiven Mäusen, die mit 10^5 *T. cruzi* Trypomastigoten aus der Zellkultur *gespiked* wurden. Anschließend wurde die DNA wie oben erwähnt isoliert und auf 50 ng eingestellt. Danach wurde diese DNA seriell mit 25 ng DNA verdünnt, die aus naivem Mausgewebe isoliert wurde. Die 10-fache Verdünnungsreihe enthielt DNA von 10^5 bis 10^{-2} Parasitenäquivalenten pro 50 ng gesamt DNA. Aus diesen Standards wurde in dreifachen Reaktionen eine Standardkurve generiert, um die parasitäre Belastung der Organe bei infizierten Mäusen zu bestimmen.

3.4.3 Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem QuantiTec SYBR Green PCR Kit (Qiagen) und mit einem RotorGene® 6000 Instrument durchgeführt. Jede Reaktion wurde in einem Endvolumen von 20 μ L mit 50 ng DNA und 0,5 μ M *T. cruzi* spezifischer Primern 121 und 122 durchgeführt. Die Primer zielen auf die variable Region des Minikreises aus Kinetoplasten DNA (kDNA) und amplifizieren ein 330 bp langes Fragment. Mausspezifische Primer für murines GAPDH wurden als endogene Kontrolle für DNA Gehalt verwendet. Thermisches Profil: Erste Wärmeaktivierung 95°C für 15 Min, 5 Zyklen von 94°C für 1 Min, 68 °C für 1 Min und 72°C für 1 Min. Dann 35 Zyklen von 94°C für 45 s, 64°C für 45 s, 72 °C für 45 s und schließlich 72°C für 10 Min. Es wurde ein Schmelzkurvenphasenprogramm mit kontinuierlicher Messung zwischen 62°C und 95°C durchgeführt. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch die Analyse der Schmelzkurve am Ende der Amplifikation kontrolliert. Jede PCR enthielt zwei negativ Template-Kontrollen (keine DNA, die der Reaktion hinzugefügt wurde), eine Standardprobe (10^5 *T. cruzi*), um die Variation zwischen den Versuchen anzupassen. Jede Probe wurde doppelt quantifiziert Doppelwerte wurden gemittelt (geometrischer Mittelwert). Die Anzahl an Parasitenäquivalenten wurde automatisch berechnet, indem der Ct-Wert gegen jeden Standard bekannter Konzentration und die Berechnung der linearen Regressionslinie dieser Kurve aufgetragen wurde.

3.4.4 Zytokin ELISA

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde verwendet, um die Konzentration von Zytokinen in dem Serum von infizierten Mäusen zu bestimmen und um den Einfluss der Peptide in der Stimulation zu validieren. Dafür wurden *High-Binding* ELISA Platten mit den *Capture* Antikörpern inkubiert, welche spezifisch für das gesuchte Zytokin waren. Dafür wurde der Antikörper in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Davon wurden 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ in eine ELISA-Platte pipettiert und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die freien Bindungsstellen mit Proteinen blockiert. Dafür wurden 200 μL 1% BSA in PBS pro *well* für 2 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde eine Verdünnungsreihe mittels des rekombinanten Zytokin Standards in 0,1% BSA in PBS angefertigt. Von der höchsten Konzentration wurde in sechs Schritten jeweils eine 1:2 Verdünnung gemacht und auf der Platte pipettiert. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde außerdem ein Ansatz mit PBS/0,1% BSA ohne Zytokin verwendet. Schließlich wurde das Serum 1:2 verdünnt mit Assay Puffer und 100 μL auf die Platten geben und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platten wurden viermal gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 50 μL der zytokinspezifischen und mit Biotin gekoppelten sekundären Antikörper auf die Platte hinzugegeben und für 2 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Die Platten wurden sechsmal gewaschen. Anschließend wurden 50 μL des an Streptavidin gekoppelten Enzyms *Horseradish Peroxidase* (HPR) 1:200 in 0,1% BSA in PBS hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Platten mit 100 μL Substratlösung versetzt. Das HPR Enzym reduziert das Substrat. Die Reaktion wurde mit H_2SO_4 gestoppt, wenn eine blaue Färbung zu sehen war. Spätestens nach 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm am *Elisa Reader* gemessen. Die Konzentration der Proben kann anhand der Absorption (OD-Werte) der Standardreihe berechnet werden.

3.4.5 Legendplex

Die Analyse der Konzentration von Zytokinen im Serum von infizierten Mäusen wurde mit dem Mouse Th Cytokine Panel 13-Plex Kit durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA-Tests. Das Kit enthält Beads in zwei verschiedenen

Größen, die mit spezifischen Antikörpern gegen die 13 verschiedenen Zytokine von Interesse gekoppelt sind. Nach der Inkubation werden die gebundenen Zytokine durch Zugabe eines zweiten biotinylierten Antikörpers in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen. Die Intensität der Fluoreszenz gibt Auskunft über die Menge des Analyten im Vergleich zum Standard. Der Test wurde in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zur Messung der Proben wurde das Accuri C6 Durchflusszytometer verwendet. Die Daten wurden mit der vom Hersteller gelieferten Software LEGENDplex™ ausgewertet.

3.5 Statistische Analysen

Mit Hilfe der Software „FlowJo“ wurden die gesamten durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die verschiedenen Zellpopulationen konnten differenziert und mit Hilfe sogenannter *gates* dargestellt werden. Hierfür waren ungefärbte Proben und Proben, in denen nur ein fluoreszierender Farbstoff fehlte (Fluorescence-minus-one, FMO) als Negativkontrollen notwendig. Nachdem die *gates* anhand der Negativkontrollen definiert waren, konnten bei den folgenden Messungen diese *gates* über die Proben gelegt werden. So kann die Expression eines bestimmten Oberflächenmoleküls, oder die zelleigene Fluoreszenz in einer definierten Zellpopulation gegen eine Negativkontrolle, bestimmt werden. Es wurden pro Probe jeweils 5×10^5 Zellen gemessen. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurde die statistische Analyse durchgeführt. Für Gruppen-Vergleiche wurde der *unpaired* Student's T-Test, Mann-Whitney U-Test oder Kruskal-Wallis Test benutzt. Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass zwischen zwei verglichenen Gruppen kein Unterschied besteht. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt definiert: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein chronisches murines Infektionsmodell mit dem Erreger *T. cruzi* zu etablieren, um anschließend zu untersuchen, ob die Expression koinhibitorischer Moleküle auf T-Zellen die Funktion dieser Zellen einschränkt. Zum einen, ob sie eine komplette Eliminierung des Parasiten in der akuten Phase verhindern, und zum anderen, ob diese Moleküle in der chronischen Phase der Infektion die Kontrolle über die Parasitämie verlieren und somit die Entstehung der Chagas Pathologie begünstigen. Dafür wurden weibliche C57BL/6 Mäuse im Alter von sieben Wochen mit 2000 Trypomastigoten in DPBS i.p. infiziert. Die akute Phase der Infektion streckte sich bis Tag 30 nach der Infektion und verlief mit milden klinischen Symptomen. Der Allgemeinzustand der Mäuse in der akuten Phase war gut, obwohl eine starke T-Zellaktivierung stattfand und eine hohe Parasitämie in unterschiedlichen Organen und Geweben gefunden wurde. Die akute Phase wurde am Tag 15 und Tag 30 p.i. immunologisch charakterisiert und die Expression von den wichtigsten koinhibitorischen Molekülen auf CD4⁺ und CD8⁺ T-zellen untersucht. Diese T-Zellen stammen aus der Milz und aus dem Muskel. Das Molekül Tim-3 war stark hochreguliert auf CD8⁺ T-Zellen in beiden Organen. Um ihre Funktion zu untersuchen wurden verschiedene Blockadeexperimente durchgeführt. Hierbei konnte nur eine Verbesserung in Bezug auf die Eliminierung der Parasiten im Muskelgewebe erzielt werden. Die chronische Phase streckte sich von Tag 30 bis zu 800 Tagen nach Infektion und zeichnete sich durch eine deutliche Reduktion der Parasiten in den Organen sowie eine Reduktion der Anzahl der aktivierten und sowie der spezifischen TSKB20⁺ T-Zellen aus. Eine konstante Inflammation wurde durch die Untersuchung von Zytokinen im Serum festgestellt. In der der frühen chronischen Phase der Infektion (Tag 250) konnte keine Expression von koinhibitorischen Molekülen auf T-Zellen mehr festgestellt werden. Erst mehr als zwei Jahre nach der Infektion, in der späten chronischen Phase (Tag 800), konnte das koinhibitorische Molekül PD-1 auf CD8⁺ T-Zellen gefunden werden. Darüber hinaus war dieses Molekül ko-exprimiert mit dem Transkriptionsfaktor TOX und die Funktionalität dieser CD8⁺ PD-1⁺ TOX⁺ T-Zellen war stark vermindert. Dies ist ein klarer Hinweis für einen T-Zell Erschöpfungszustand. Trotz der sehr langen chronischen Phase konnte keine Chagas typische Herzpathologie in

unserem Modell festgestellt werden. In folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse detaillierter aufgeführt.

4.1 Infektionsparameter und Gesundheitszustand nach der *T. cruzi* Infektion

Das Gewicht ist ein wichtiger Parameter bei der Beurteilung des klinischen Zustands im Verlauf von Infektionserkrankungen. Dementsprechend wurde das Gewicht bei der Infektion mit *T. cruzi* überwacht und mit dem Anfangsgewicht verglichen (siehe Abbildung 1). Die Ergebnisse zeigen, dass es während der akuten Phase der Infektion zu einer transienten Zunahme des Gewichts aufgrund von Aszites kam. Die Mäuse zeigten eine deutliche Ausdehnung des Bauchraums. Zu der Aszites (Flüssigkeit in der Bauchhöhle) bildeten sich deutliche Ödeme unter dem Fell, in der Subkutis (siehe Abbildung 2). Diese Flüssigkeitsansammlungen nahmen im Verlauf der Infektion ab. Zum Ende der akuten Phase und während der chronischen Phase stabilisierte sich das Gewicht. Es kann gesagt werden, dass die *T. cruzi* Infektion weder das Wachstum der jungen Mäuse noch das Gewicht langfristig beeinflusste. Die Mäuse zeigten in der akuten Phase der Infektion eine massive Splenomegalie als Begleitsymptom. Diese blieb auch am Tag 60 in der chronischen Phase und in einzelnen Fällen sogar bis zu zwei Jahren nach der Infektion bestehen. In Abbildung 2 ist ein repräsentatives Bild zu den Größenverhältnissen zwischen einer Milz aus einer naiven und einer infizierten Maus zu sehen.

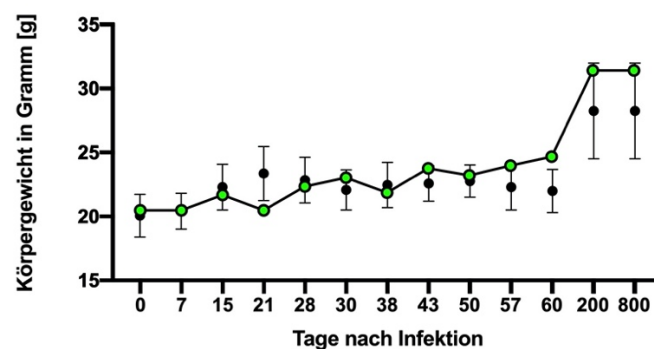


Abbildung 1: Verlauf des Gewichts während der Infektion mit *T. cruzi*.

Die *T. cruzi* Infektion hat einen geringeren Einfluss auf das Gewicht der Mäuse. Die stärkere Zunahme in der akuten Phase (zwischen Tag 7 p.i. und Tag 15 p.i.) normalisiert sich im weiteren Verlauf. Die quantitative Übersicht zeigt zusammengefasste Daten von 12 Zeitpunkten aus 4 unabhängigen Experimenten. Nicht infizierte Tiere sind mit grünen Kreisen und infizierte Tiere sind mit schwarzen Kreisen dargestellt. Jeder Kreis repräsentiert den Mittelwert \pm SEM. (siehe Anhang 1).

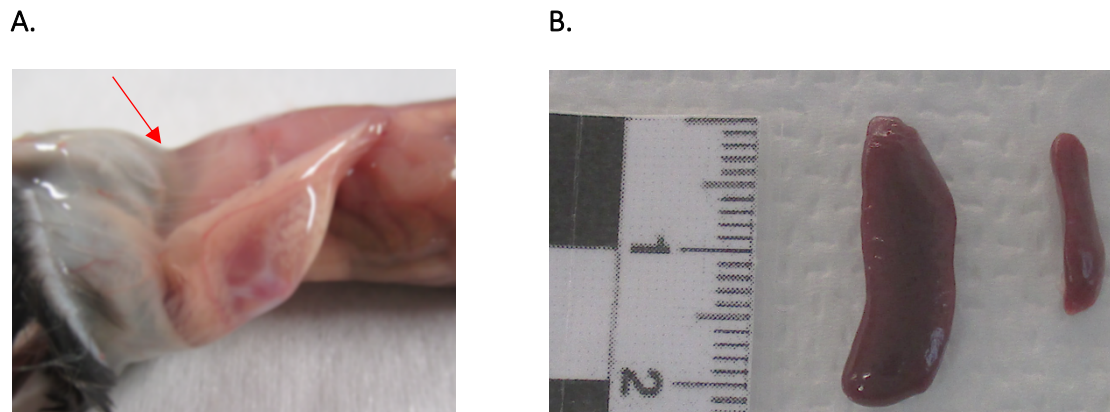


Abbildung 2: Charakteristische Gewebeeränderungen in der akuten Phase der Infektion mit *T. cruzi*.

Zu sehen sind repräsentative Bilder am Tag 15 p.i. A. Ödem (Flüssigkeitsansammlung) in der Subkutis der infizierten Mäuse. B. Massive Splenomegalie nach der Infektion (im Bild Links: infiziert; Rechts: nicht infiziert).

Um weitere Parameter für Muskel- oder Leberschäden in der akuten Phase zu untersuchen, wurden verschiedene Enzyme im Serum gemessen. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für die Aspartat-Aminotransferasen (AST) und die Kreatinin Kinase (CK) dargestellt. AST zeigte eine starke Erhöhung, welches auf eine Schädigung der Leber hindeutet. Die Kreatinin Kinase (CK), welche ein Maß für akute Schäden des Herz- oder Skelettmuskels ist, zeigte keinen signifikanten Anstieg bei den infizierten Mäusen im Vergleich mit den naiven Kontrollen.

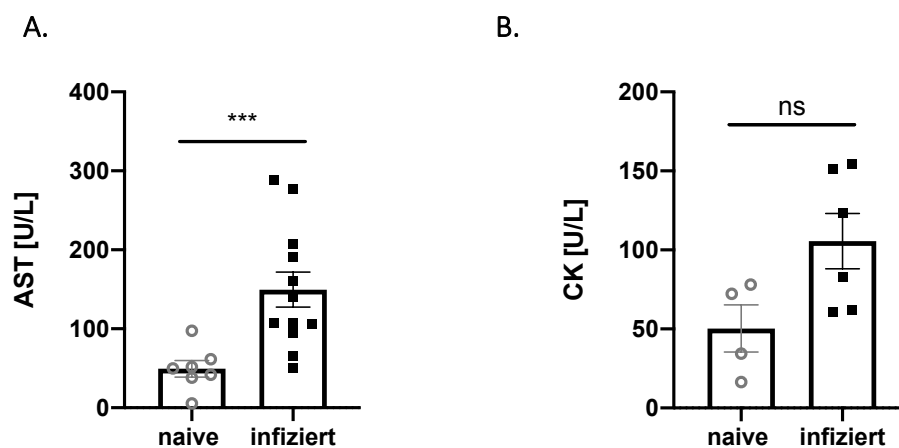
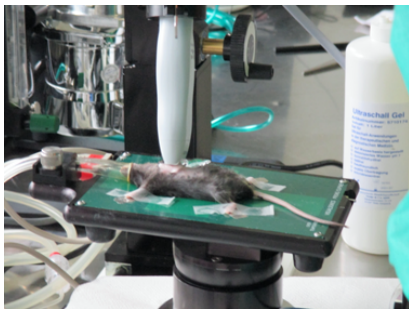


Abbildung 3: Untersuchung der Parameter für Muskel- und Leberschäden.

A. Die *T. cruzi* Infektion in der akuten Phase (Tag 15 p.i.) verursachte eine Erhöhung von leberrelevanten Enzymen (AST). Die Werte normalisierten sich im weiteren Verlauf (nicht gezeigt). B. Bei der Untersuchung von Muskelschaden Parametern (CK) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Daten aus zwei Experimenten wurden mit dem *Student's t-Test (unpaired)* analysiert und sind als Mittelwert \pm SEM für A. (naive n=7 und infizierte n=12) und B. (naive n=4 und infizierte n=6) dargestellt.

In der chronischen Phase wurde untersucht, ob die Infektion in unseren Tiermodell zu der Entwicklung einer Herzhypertrophie führt. Durch die Leihgabe des Geräts Vevo LAZR-X (FujiFilm Visualsonics) im BSL-3 Labor konnte die Analyse der Herzfunktion für eine kleine Gruppe an Versuchstieren *in vivo* gemessen werden. Die Ejektionsfraktion (EF) wurde mit der Software des Geräts ausgerechnet. Die EF ist ein in Prozent ausgedrücktes Maß dafür, wie viel Blut die linke Herzkammer bei jeder Kontraktion herauspumpt. Eine EF von X % bedeutet, dass bei jedem Herzschlag X % der gesamten Blutmenge in der linken Herzkammer herausgedrückt wird. Es wurde kein Unterschied zwischen den naiven Kontrollen und den zwei Gruppen von infizierten Mäusen gefunden. Weder in der frühen chronischen Phase (<200 p.i.) noch nach 800 Tagen waren funktionelle Unterschiede in den Herzleistungen der Mäuse festzustellen.

A.



B.



C.

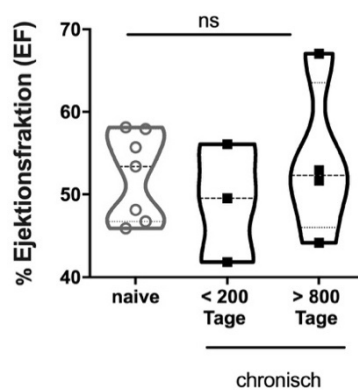


Abbildung 4: Untersuchung der Herzleistung *in vivo*.

Gemessen wurde die Ejektionsfraktion (EF) des Herzens mit dem Vevo LAZR-X Gerät (FujiFilm Visualsonics). Dafür wurde Isofluran als Inhalationsnarkose eingesetzt. Verglichen wurde die EF von 3 Gruppen: naive n=7; infizierte <200 Tage p.i. n=3; infizierte > 800 Tage p.i. n=4.

Ein zusätzliches Maß für sich entwickelnde Herzerkrankungen ist das Gewicht des Herzens. Dafür wurden die Herzen aus Experimenten in der chronischen Phase nach der finalen Blutentnahme gewogen. Das Normalisieren des Herzgewichtes zum Körpergewicht der Mäuse erwies sich als ein unzuverlässiger Parameter, denn das Körpergewicht kann aus unterschiedlichen Gründen schwanken. Als ein zuverlässiger Parameter für das Alter eines Organismus dient die Länge der Tibia. Das Verhältnis von Tibialänge zu Herzgewicht ist demnach konstant. Die Tibia-Länge wurde am rechten Hinterbein der Mäuse mit einem Messschieber bestimmt. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse aus den längsten chronischen Experimenten (zwei Jahre nach Infektion) zusammengetragen. Bei keiner der untersuchten Mäuse lag eine infektionsbedingte oder altersbedingte Herzhypertrophie vor. Die *T. cruzi* infizierten Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den gleichaltrigen naiven Kontrollen.

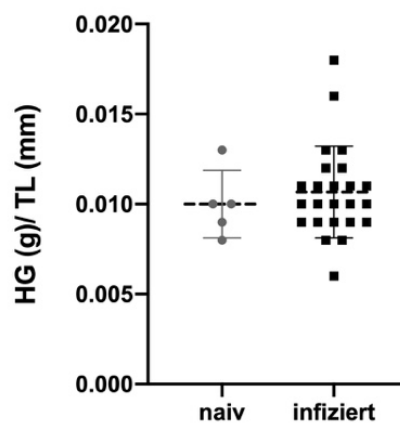


Abbildung 5: Verhältnis Herzgewichtes zu Tibialänge.

Zwei Jahre nach Infektion wurden die Herzen gewogen und durch die Länge der Tibia geteilt, um ein Verhältnis zu bilden, welches als Maß für die Vergrößerung des Organs dient. Die Daten aus zwei Experimenten wurden mit dem *Student's t-Test (unpaired)* analysiert und sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=5; Infizierte n=22) dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die niedrige Infektionsdosis eine asymptomatische akute Phase erreicht werden konnte. Die mit *T. cruzi* infizierten Mäuse zeigten kein verändertes Verhalten und keine äußerlichen Anzeichen für Schmerz oder Einschränkung des Bewegungsapparates. Das Gewicht sowie alle analysierten Parameter deuteten auf eine zunehmende Inflammation in der akuten Phase hin, welche aber ohne Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes einherging und sich im weiteren Verlauf der Infektion normalisierte. Darüber hinaus entwickelte sich durch die Infektion mit *T. cruzi* keine Chagas typische Herzerkrankung.

4.2 Infektionskinetik und Organtropismus von *T. cruzi* Brazil

Um das Ausmaß der Infektion in unterschiedlichen Geweben zu beurteilen sowie den Ort der Persistenz über den gesamten Verlauf der Infektion zu ermitteln, wurden Gewebeproben von Muskel, Herz, Leber und Milz gesammelt. Aus diesen Proben wurde die DNA isoliert und mittels einer qPCR die parasitäre Gewebslast bestimmt (vgl. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Kinetik zu sehen). Zunächst ist während der akuten Phase eine hohe Parasitenlast in allen Geweben (Tag 15 p.i. und Tag 30 p.i.) zu verzeichnen. Während im Herzen, Leber und Milz eine ähnliche Anzahl an Parasitenäquivalenten pro Nanogramm gefunden wurden, war der Muskel mit 10^5 Parasitenäquivalenten pro Nanogramm das Gewebe, welches am stärksten belastet war. Über die Zeit wurde eine starke Reduktion der Parasitenlast festgestellt. An den Tagen 60, 85, 100 p.i. war es bei der Mehrheit der Versuchstiere nicht mehr möglich Parasiten im Herzen, Leber und Milz nachzuweisen. Bei den Muskelproben war es hingegen zu jedem Zeitpunkt möglich, Trypanosomen DNA nachzuweisen. Das deutet stark darauf hin, dass, obwohl *T. cruzi* alle untersuchten Organe erfolgreich infizieren kann, der Skelettmuskel am stärksten betroffen ist und über einen längeren Zeitraum als Nische für die Persistenz der Parasiten dient.

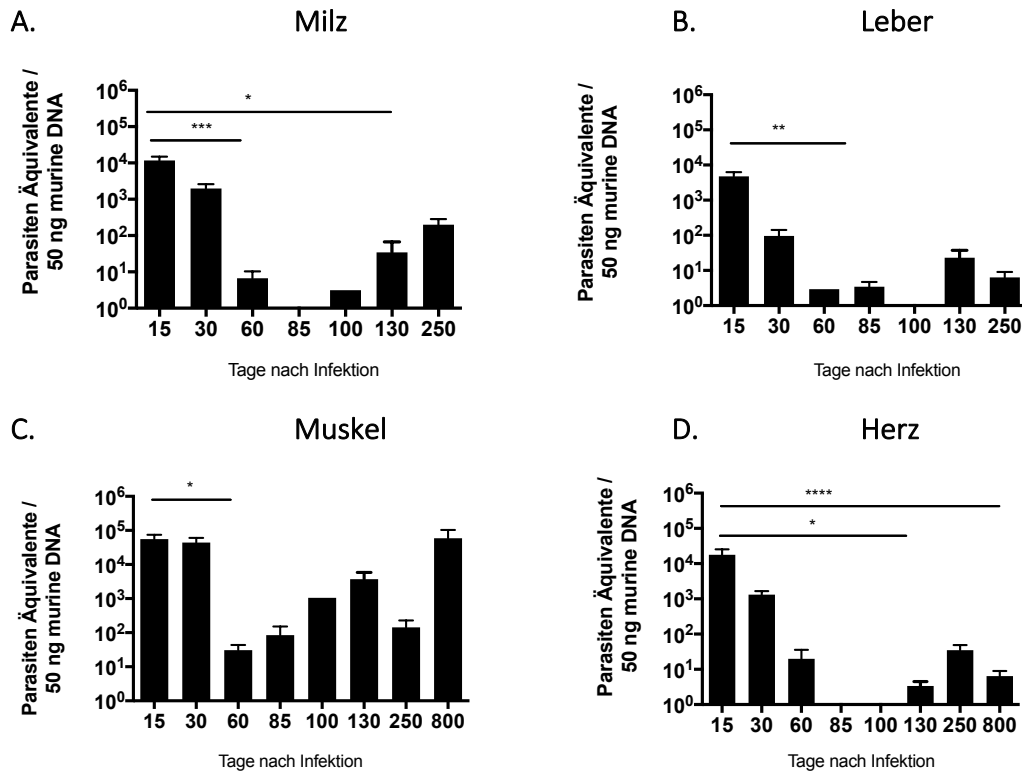


Abbildung 6: Kinetik der Parasitenlast in Organen und Gewebe während der *T. cruzi* Infektion.

Parasitenäquivalente pro 50 ng DNA wurden in jedem Gewebe zwischen Tag 15 p.i. (akute Phase) bis Tag 250 p.i. (frühe chronische Phase) der Infektion analysiert. Muskel- und Herzgewebe wurden am Tag 800 p.i. (spät chronisch) ebenfalls analysiert. $n \geq 4$ -23 Mäuse pro Gruppe. Keine Balken bedeutet, dass alle analysierten Proben unter der Nachweisgrenze lagen, wie unter Methoden beschrieben. Die Daten wurden mit ANOVA (*non parametric test*) ausgewertet und anschließend mit Kruskal-Wallis-Test sowie Dunn's *Multiple Comparison Test* verglichen. Alle Daten sind repräsentativ für 10 unabhängige Experimente. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.3 Immunologische Kontrolle der Parasitenreplikation im Gewebe

CD8⁺ T-Zellen sind unentbehrlich für die immunologische Kontrolle intrazellulärer Formen von *T. cruzi*. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der parasitenspezifischen Induktion von zytotoxischen CD8⁺ T Zellantworten und der Parasitenlast im Gewebe. Um zu beweisen, dass auch in unserem murinen Modell dies der Fall ist, wurden CD8⁺ T-Zellen am Tag 115 p.i. mittels eines monoklonalen Antikörpers depletiert. Drei Tage später wurde eine Kontrollfärbung aus einer kleinen Menge Vollblut aus den Schwanzspitzen der Mäuse gemacht. In Abbildung 7 ist eine repräsentative Abbildung zu sehen, die zeigt, dass CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden.

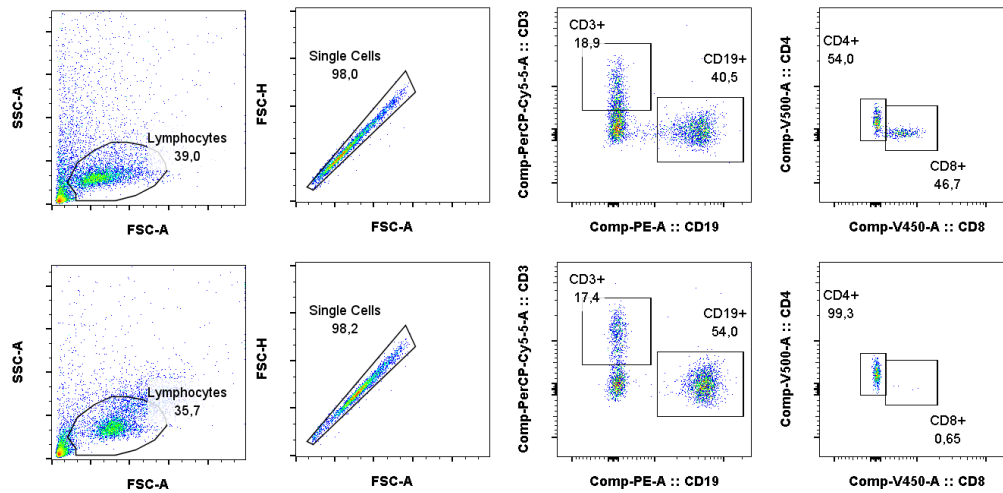


Abbildung 7: Kontrolle der Depletion von CD8⁺ T-Zellen.

Ein repräsentatives Bild der durchflusszytometrischen Überprüfung der Depletion von CD8⁺ T-Zellen. Von links nach rechts ist die *Gating* Strategie dargestellt. Lymphozyten > Einzelzellen (Single cells) > CD3⁺ T-Zellen > CD8⁺ T-Zellen. Oben ohne Depletion und Unten mit Depletion.

Anschließend wurde am Tag 130 p.i. (15 Tage nach Depletion) das Experiment beendet und die Organe entnommen, um die Parasitenlast zu bestimmen. Wie erwartet, stieg in jedem untersuchten Organ die Parasitämie. Signifikant war die Zunahme jedoch nur im Herzen. Im Muskelgewebe war auch ohne Depletion von CD8⁺ T-Zellen eine hohe Anzahl von Parasiten vorhanden.

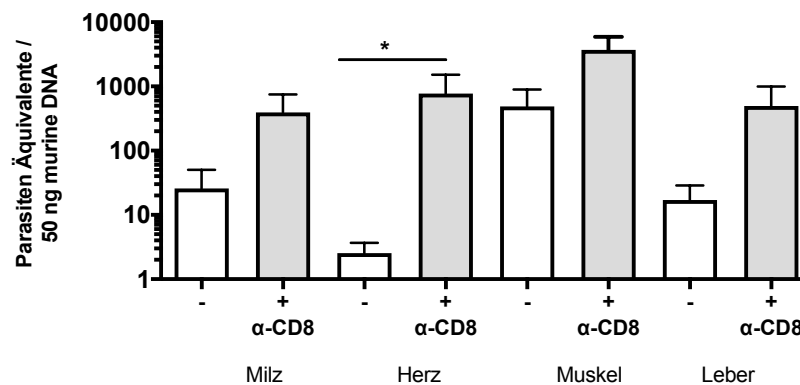


Abbildung 8: Wirkung auf die Gewebslast nach CD8⁺ T-Zell Depletion.

Am Tag 115 p.i. wurden die CD8⁺ T-Zellen mittels eines monoklonalen Antikörpers depletiert (anti-CD8). Am Tag 130 p.i. wurden die Organe entnommen und mittels qPCR die Parasitärelast bestimmt. Diese Werte wurden verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe, welche auch infiziert war, aber keinen Antikörper zur Depletion erhielt. Jede Gruppe bestand aus n=5 Mäusen. Die Daten sind aus einem Experiment. Die Gruppen wurden für jedes Organ untereinander mit den Student's t-Test (*unpaired*) analysiert und als Mittelwert ± SEM dargestellt.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus der Phänotypischen Charakterisierung der koinhibitorischen Moleküle zusammengefasst. Der Schwerpunkt lag auf den CD8⁺ T-Zellen sowie den verschiedenen Blockade-Experimenten, welche gegen das Molekül Tim-3 gerichtet waren.

4.4 Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD4⁺T-Zellen

Zunächst wurde die *ex-vivo* Expression von der Ectonucleosidase CD39 sowie den koinhibitorischen Molekülen PD-1, Lag-3 und Tim-3 auf CD3⁺CD4⁺CD44⁺ T-Zellen aus der Milz untersucht. Hervorzuheben ist, dass diese Moleküle nur in dem Kontext der akuten Infektion exprimiert wurden und sowohl am Tag 15 p.i. oder auch Tag 30 p.i. ihre höchste Expression erreichten. Zu den CD4⁺ T-Zellen in dieser Infektion ist zu sagen, dass sie zum T-Helferzellen Typ eins (T_H-1-Zellen) polarisiert sind und eine ihre Hauptfunktionen die Zytokin Ausschüttung ist, um dadurch andere Zelltypen des Immunsystems (Makrophagen und dendritische Zellen) zu aktivieren. Darüber hinaus sind die T_H-1-Zellen wichtig, um B-Zellen Hilfe zu leisten, so dass hochaffine Antikörper gegen *T. cruzi* zu produziert werden können. Die Infektion mit *T. cruzi* induziert die Expression von CD39 und PD-1 am stärksten. Während die Expression von CD39 zwischen Tag 15 p.i. und Tag 30 p.i. stabil hoch blieb, nahm die Expression von PD-1 ab. Daher ist anzunehmen, dass die PD-1 Induktion transient ist. Die Expression von Lag-3 nahm im Trend zu, aber verglichen mit den naiven Mäusen wurden die Unterschiede erst am Tag 30 p.i. signifikant. Tim-3 nahm nach der Infektion erst signifikant zu, aber im Trend nahm es gegen Ende der akuten Phase wieder ab und insgesamt waren weniger als 10 % der aktivierten CD4⁺ T-Zellen auch Tim-3⁺.

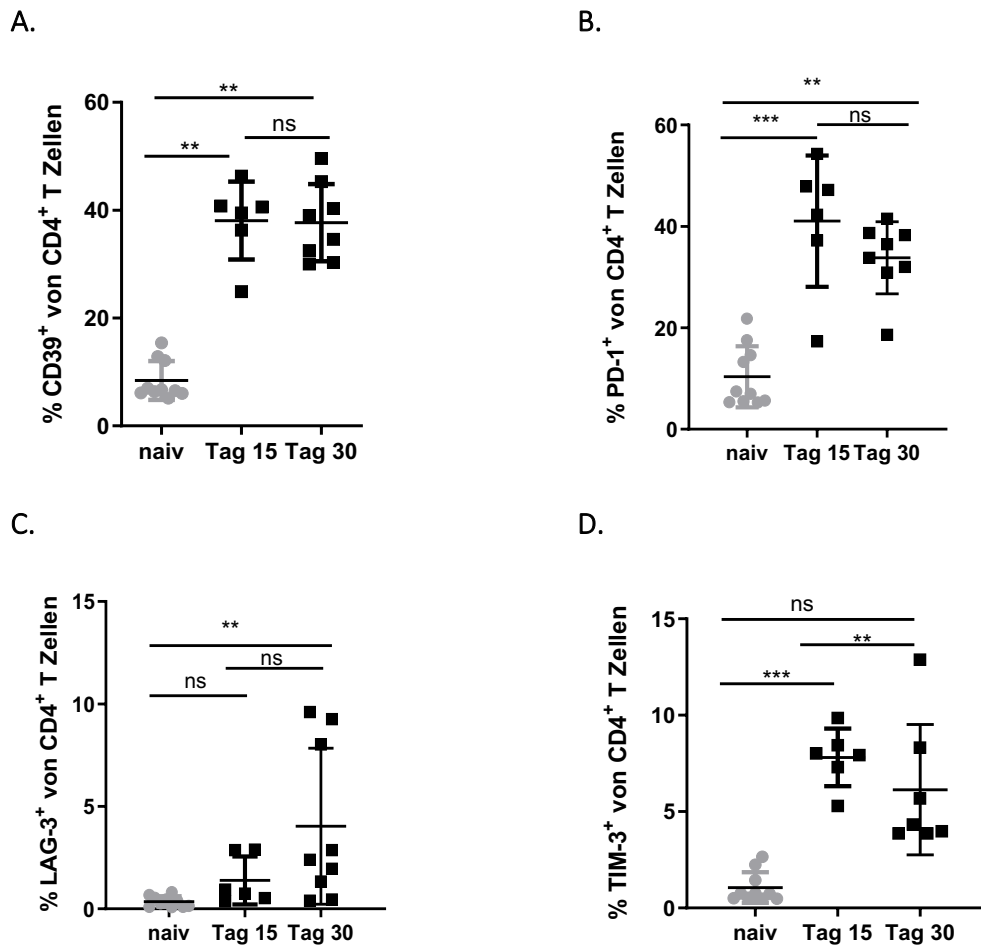


Abbildung 9: Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD4⁺ T-Zellen in der akuten Phase der *T. cruzi* Infektion.

Es wurden durchflusszytometrische Analysen von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz während der akuten Phase (Tag 15 p.i. und 30 p.i.) durchgeführt. Die Gruppe der infizierten Mäuse am Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich mit den naiven Kontrollen eine signifikante Induktion von CD39, PD-1 und Tim-3. Diese Zunahme ist nur für CD39 konstant, während es bei PD-1 als auch bei Tim-3 am Tag 30 zu einer leichten Abnahme kam. Lag-3 wurde erst am Tag 30 p.i. signifikant hochreguliert. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden anschließend mit Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=10; infiziert am Tag 15 n=6; am Tag 30 n=8) dargestellt.

4.4.1 Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen nach der Stimulation

Um die funktionellen Eigenschaften der CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der *T. cruzi* Infektion weiter zu charakterisieren, wurden die Splenozyten nach der Präparation mit PMA und Ionomycin für fünf Stunden stimuliert und zusätzlich mit Monensin behandelt, um den Transport von Zytokinen zu unterbinden. Anschließend wurde eine intrazelluläre Färbung für IFN- γ , TNF- α und Interleukin 10 (IL-10) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in eine Graphik für verschiedene Zeitpunkte zusammengefasst. Für die Auswertung wurden alle Gruppen untereinander verglichen und nur die signifikanten

Unterschiede vermerkt. In Abbildung 10 ist der Verlauf für IFN- γ zu erkennen. Die Ergebnisse zeigen, dass Mäuse am Tag 15 p.i. weniger IFN- γ produzieren als die Mäuse der naiven Kontrollen. Auch wenn dieser Unterschied statistisch keine Signifikanz erreicht, ist es ein deutlicher Hinweis auf eine gestörte Zytokinproduktion, welches mit der signifikanten Zunahme von koinhibitorischen Molekülen wie PD-1 in diesem Kompartiment korrelieren würde. Im Verlauf der Infektion, auch schon gegen das Ende der akuten Phase am Tag 30 p.i., nahm die Produktion von IFN- γ wieder zu und blieb während der chronischen Phase konstant hoch. Daher ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der IFN- γ Produktion der naiven Kontrollen und der Produktion der infizierten Gruppe am Tag 100 p.i. sowie der Produktion von IFN- γ von infizierten Mäusen am Tag 15 p.i. und am Tag 100 p.i.

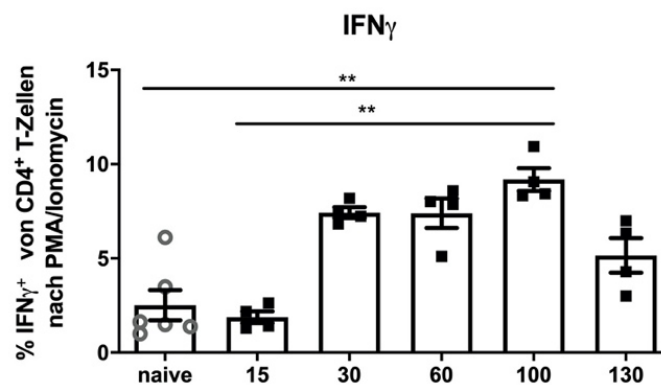


Abbildung 10: IFN- γ Produktion der CD4⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Die CD4⁺ T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit IFN- γ zu produzieren untersucht und dafür mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Gruppe der infizierten Mäuse am Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich mit den naiven Kontrollen eine leichte Abnahme der Zytokinproduktion. Im weiteren Verlauf der Infektion sind die CD4⁺ T-Zellen immer besser in der Lage, IFN- γ zu produzieren. Eine hoch signifikante Zunahme zeigte sich in der chronischen Phase an Tag 100 p.i. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis-Test mit anschließend *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=6; *T. cruzi* gesamt n= 20; pro Infektionstag n=4) dargestellt.

Es wurde untersucht, ob die CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der Infektion auch in der Lage sind, TNF- α zu produzieren. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass nach der Stimulation bereits die naiven Mäuse in der Lage waren, stark TNF- α zu produzieren, während es bei den infizierten Mäusen am Tag 15 p.i. nicht möglich war, TNF- α intrazellulär nachzuweisen. Die *T. cruzi* Infektion zeigt einen starken Einfluss auf die TNF- α Produktion. Dieser Verlust an Funktionalität verbessert sich gegen Ende der akuten

Phase (Tag 30) und der Anstieg von TNF- α ist in der chronischen Phase im Vergleich zu der Produktion am Tag 15 p.i. signifikant. IL-10 konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

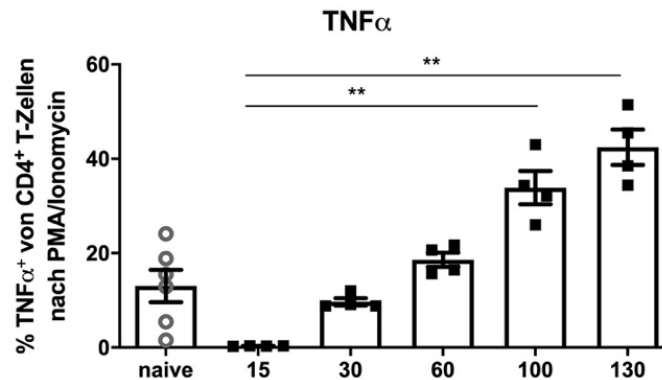


Abbildung 11: TNF- α Produktion der CD4⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Die CD4⁺ T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht TNF- α nach Stimulation mit PMA/Ionomycin zu produzieren. Die Gruppe der infizierten Mäuse zeigte am Tag 15 p.i., im Vergleich mit den naiven Kontrollen, keine TNF- α Produktion. In weiteren Verlauf der Infektion haben die CD4⁺ T-Zellen vermehrt TNF- α produziert. Eine signifikante Zunahme zeigte sich in der chronischen Phase ab Tag 100 p.i. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis-Test sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive Tiere n=6; *T. cruzi* gesamt n= 20; pro Infektionstag n=4) dargestellt.

4.5 Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺T-Zellen

Bei der Untersuchung von CD8⁺ T-Zellen, wie auch bei den CD4⁺ T-Zellen, zeigte sich eine sehr starke Zunahme von dem Molekül CD39. Obwohl es eine große Streuung innerhalb der untersuchten Proben am Tag 15 gab, waren etwa 50 % der aktivierten CD8⁺ T-Zellen CD39⁺. PD-1 war nur geringfügig bei den aktivierten CD8⁺ T-Zellen hochreguliert. Im Gegensatz dazu waren zu diesem Zeitpunkt 40 % der CD4⁺ T-Zellen PD-1⁺ (vgl. Abbildung 9). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erwartungen, denn PD-1 auf CD8⁺ T-Zellen wird als ein Marker für den Grad der T-Zellaktivierung, aber auch der T-Zell-Erschöpfung, gesehen und die Expression dieses Moleküls korreliert mit der vorhandenen Antigenmenge. Lag-3 zeigte eine gesteigerte Expression verglichen mit den naiven Kontrollen, welches signifikant am Tag 15 p.i. und auch am Tag 30 p.i. war. Die Frequenz der Expression von Lag-3 auf CD8⁺ T-Zellen war gleich hoch wie auf der CD4⁺ T-Zellen.

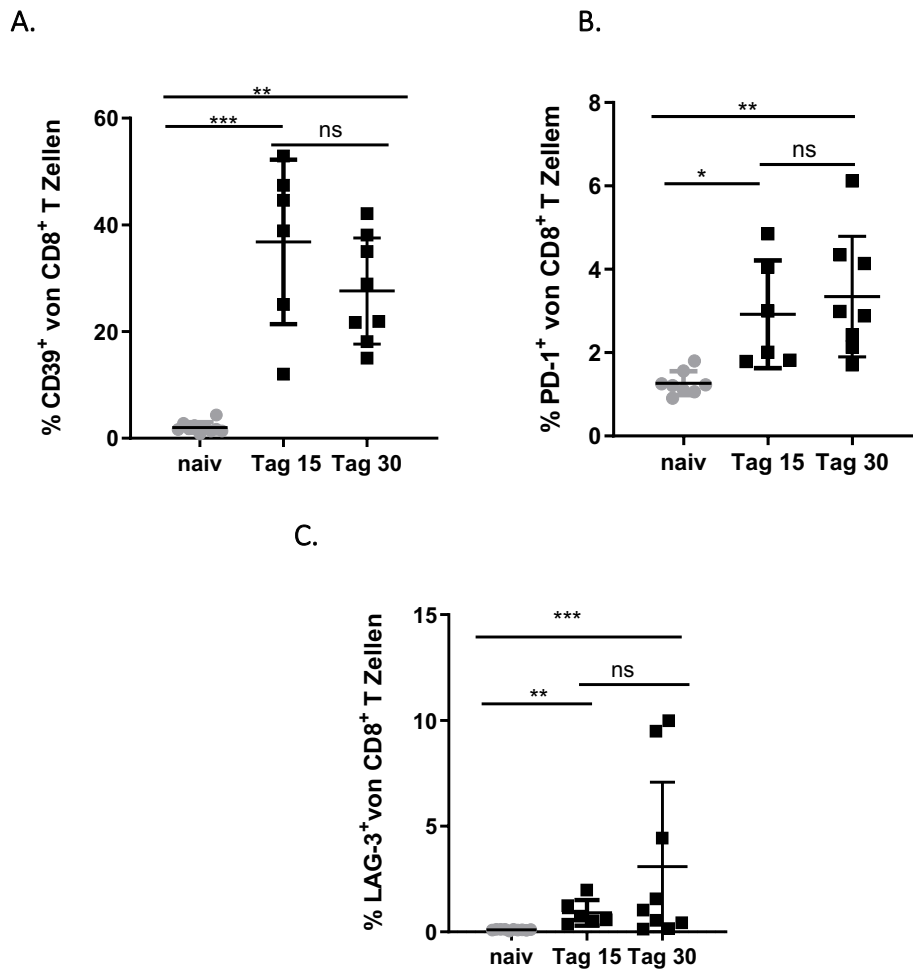


Abbildung 12: Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der *T. cruzi* Infektion.

Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz am Tag 15 und 30 p.i. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und wurden mit Kruskal-Wallis-Test analysiert und anschließend mit dem *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=8, infiziert Tag 15 n=6, infiziert Tag 30 n=8) dargestellt.

Unerwartet hingegen war die starke Induktion von Tim-3. Dieses Molekül ist ein wichtiger Regulator bei zellvermittelten Immunantworten und dessen Expression korreliert mit der Stärke der Aktivierung durch den T-Zellrezeptor. Die naiven Kontrollen zeigten eine sehr geringe Expression dieses Moleküls, im Mittel waren weniger als 5 % Tim-3⁺ CD8⁺ T-Zellen. Nach der Infektion am Tag 15 p.i. stieg diese Expression um das Fünffache und war hochsignifikant. Am Tag 30 p.i., also gegen Ende der akuten Phase, nahm die Expression von Tim-3 leicht ab und in der chronischen Phase war es nicht mehr nachzuweisen (siehe Abbildung 13). Auch die longitudinale Analyse der anderen koinhibitorischen Moleküle in der frühen chronischen Phase (bis

Tag 250 p.i.) zeichnete sich durch die Abwesenheit dieser Moleküle aus (siehe Abbildung 15).

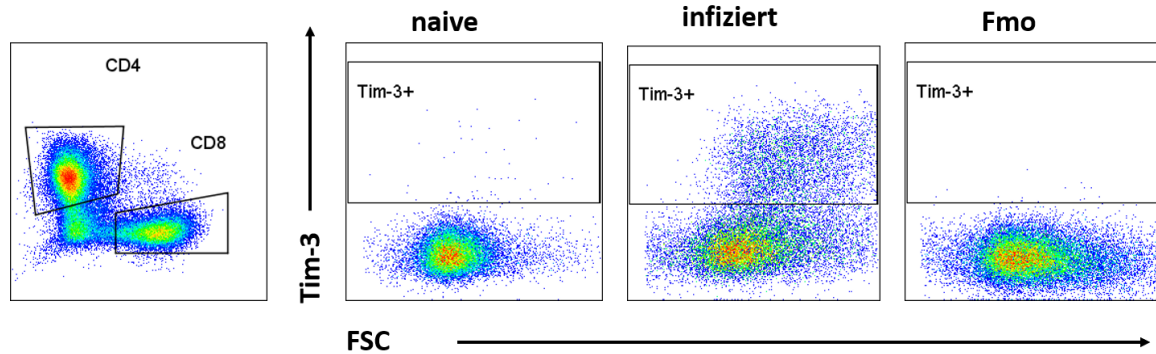


Abbildung 13: Darstellung der *gates* für die Tim-3 Analyse auf CD8⁺T-Zellen.

Während der *T. cruzi* Infektion wurde die Expression von Tim-3 auf CD8⁺ T-Zellen mittels einer Oberflächenfärbung bestimmt. Zu sehen ist das *gating* der T-Zellpopulationen aus dem Kompartiment Lymphozyten > lebende Zellen > CD3⁺ Zellen > CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und dann die Tim-3 Population im Vergleich naive vs. infiziert vs. FMO (*Fluorescence minus one*) Kontrolle.

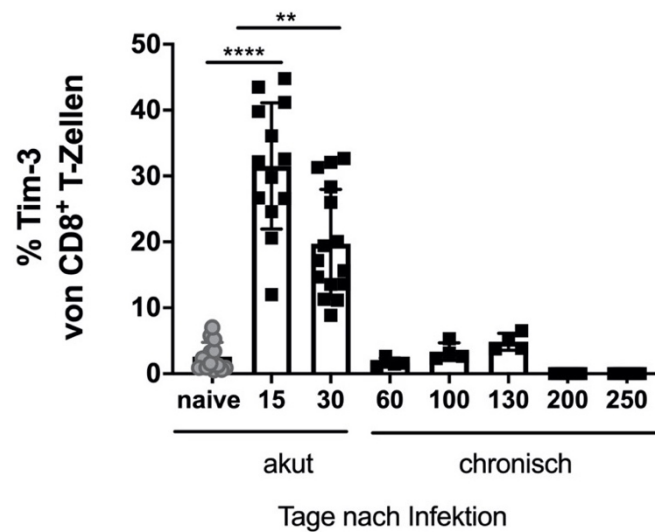


Abbildung 14: Kinetik der Tim-3 Expression.

Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz während der akuten Phase und der frühen chronischen Phase (Tag 60 p.i. bis 250 p.i.). Die Gruppe der infizierten Mäuse am Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich mit den naiven Kontrollen eine hoch signifikante Induktion von Tim-3. Am Tag 30 p.i. kam es zu einer leichten Abnahme. Zu Beginn der chronischen Phase, und in Korrelation mit der starken Abnahme der Parasitämie, konnte Tim-3 nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Am Tag 200 p.i. und 250 p.i. war Tim-3 nicht mehr vorhanden. Die Daten sind repräsentativ aus 5 unabhängigen Experimenten. Alle Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=13; infiziert gesamt n= 60; Tag 15 n=13; Tag 30 n=15; Tag 60 n=4; Tag 100 n=4; Tag 130 n=4; Tag 200 n=10; Tag 250 n=10) dargestellt.

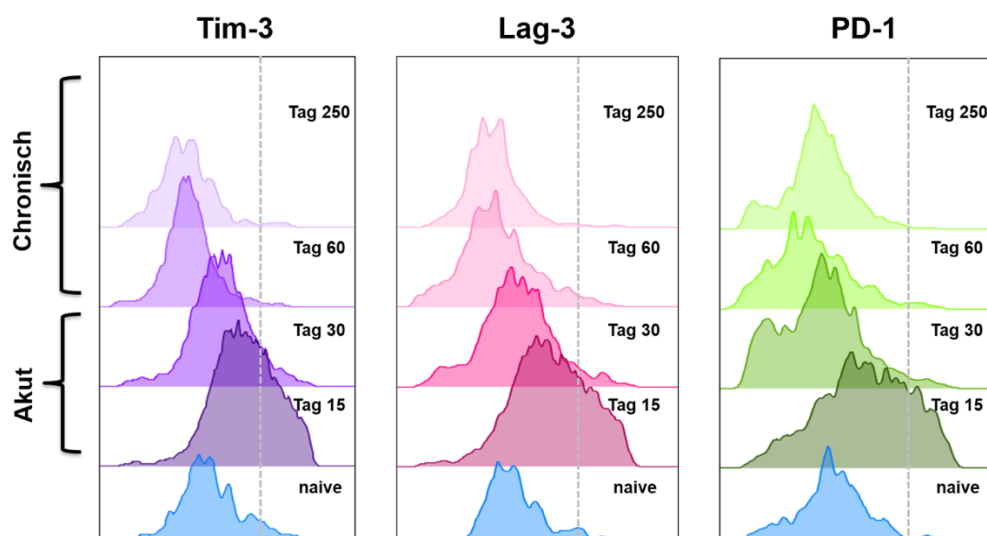


Abbildung 15: Longitudinale Analyse der Expression koinhibitorischer Moleküle.

Die Histogramme zeigen die Tim-3 (lila), Lag-3 (rosa) und PD-1 (grün) Expression in der Milz von aktivierten CD44⁺ CD8⁺ T-Zellen während des Infektionsverlaufs. Die naiven Kontrollen vorne (blau) und von Tag 15 p.i. bis zum Tag 250 p.i. von infizierten Mäusen.

Es stellte sich die Frage, ob es eine ko-Expression zwischen Tim-3, PD-1 und Lag-3 gibt. In Abbildung 16 ist zu sehen, dass sich der Anteil an PD-1⁺CD8⁺ T-Zellen innerhalb der Tim-3⁺ Zellen an Tag 15 p.i. nicht signifikant von dem Anteil der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen innerhalb der Tim-3⁻ unterscheidet. Erst an Tag 30 p.i. sind fast 20 % der PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen (vgl. Abbildung 16 B) auch Tim-3⁺. Für Lag-3 ist die Kinetik umgekehrt. Schon an Tag 15 p.i. sind fast 30 % der Lag-3⁺CD8⁺ T-Zellen (vgl. Abbildung 16 C) auch Tim-3⁺ und das ist signifikant unterschiedlich zu dem Anteil der Lag-3⁺ bei den Tim-3⁻ Zellen. Zum Ende der akuten Phase an Tag 30 ist der Anteil der Lag-3⁺ CD8⁺ T-Zellen immer noch signifikant größer als der Anteil der Tim-3⁻.

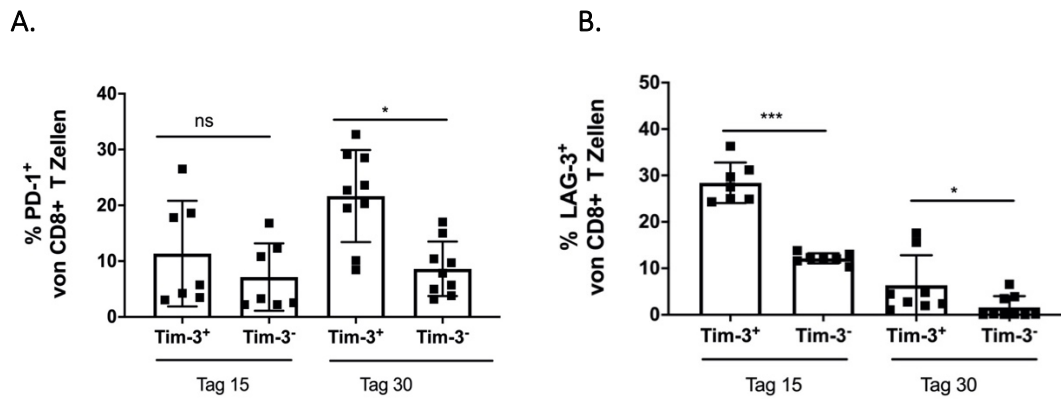


Abbildung 16: Ko-Expression von Tim-3 mit PD-1 und Lag-3 in dem CD8⁺ T-Zellkompartiment.

Analyse der Ko-Expression von PD-1 und Lag-3 innerhalb der Tim-3⁺ vs. Tim-3⁻ CD8⁺ T-Zellen, welche aus der Milz isoliert wurden. Am Tag 15 (n=7) und Tag 30 (n=9) p.i. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden mit Student's t-Test (*unpaired*) ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die koinhibitorischen Moleküle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, nur transient während der akuten Phase exprimiert waren. Nach der Etablierung der chronischen *T. cruzi* Infektion, wenn die Parasitämie weitestgehend kontrolliert war, konnten keine phänotypischen Marker für T-Zell-Erschöpfung (PD-1, Lag-3, Tim-3) nachgewiesen werden.

4.5.1 Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation

Um die funktionellen Eigenschaften der CD8⁺ T-Zellen während der Infektion mit *T. cruzi* zu charakterisieren, wurden Zellen aus der Milz isoliert und mit PMA/Ionomycin restimuliert. Für die Auswertung wurden die naiven Mäuse mit infizierten Mäusen verglichen. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Nach der *T. cruzi* Infektion an Tag 15 p.i. zeigte sich eine Suppression der IFN- γ Produktion. Dieser Zustand änderte sich bereits ab Tag 30 p.i. und am Tag 60 p.i. waren 50% der CD8⁺ T-Zellen in der Lage, auf den Stimulus mit einer pro-inflammatorischen IFN- γ Produktion zu reagieren. Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem die Parasitämie in den Organen sehr stark zurückgegangen ist und zum Teil *T. cruzi* mittels qPCR nicht mehr nachweisbar war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass die CD8⁺ T-Zellen an Tag 15 p.i. ihr gesamtes IFN- γ sehr schnell aufgrund ihres hochaktivierten Zustands sezerniert haben.

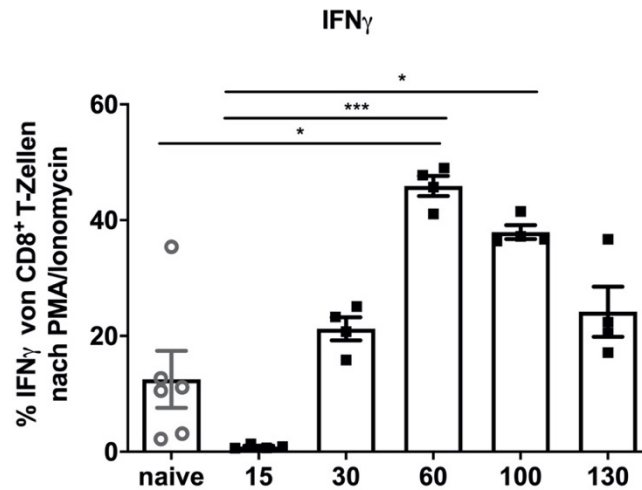


Abbildung 17: IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Die CD8⁺ T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht IFN- γ zu produzieren und dazu mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Gruppe der infizierten Mäuse an Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich mit den naiven Kontrollen eine starke Abnahme der Produktion. Im weiteren Verlauf der Infektion sind die CD8⁺ T-Zellen immer besser in der Lage, IFN- γ zu produzieren. Eine hoch signifikante Zunahme zeigte sich in der chronischen Phase an Tag 60 p.i. Die Daten wurden anschließend mit Kruskal-Wallis-Test sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=6, *T. cruzi* gesamt n= 20; pro Infektionstag n=4) dargestellt.

Auch die TNF- α Produktion wurde analysiert. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Im Gegensatz zu den Erwartungen reagierten die naiven Mäuse sehr stark auf den Stimulus mit PMA/Ionomycin und waren in der Lage, hohe Mengen an TNF- α zu sezernieren. An Tag 15 p.i. nach der Infektion mit *T. cruzi* war es nicht möglich TNF- α in den CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen. Auch hier erhöhte sich die Produktion des Zytokins im Verlauf der Erkrankung und erreichte am Tag 130 p.i. ihren Höchstwert.

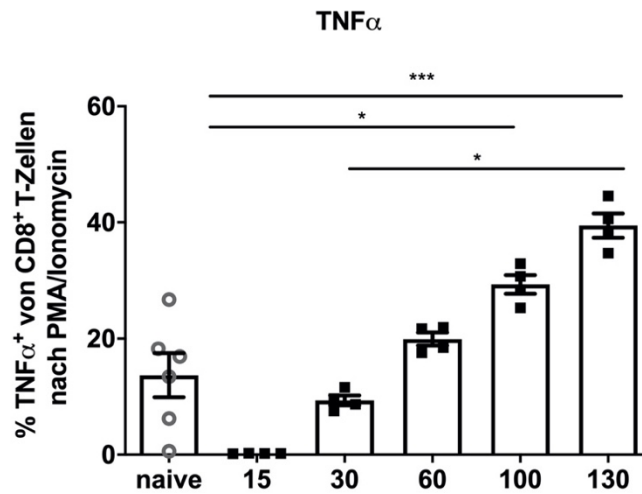


Abbildung 18: TNF- α Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Die CD8⁺ T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit TNF- α zu produzieren untersucht und wurden dazu mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Gruppe der infizierten Mäuse zeigte an Tag 15 p.i., im Vergleich mit den naiven Kontrollen, keine TNF- α Produktion. Im weiteren Verlauf der Infektion steigt die von CD8⁺ T-Zellen gebildete Menge an TNF- α . Eine signifikante Zunahme zeigte sich in der chronischen Phase. Die Daten wurden mit Kruskal-Wallis-Test sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=6, T. cruzi gesamt n= 20; pro Infektionstag n=4) dargestellt.

4.6 Phänotypische Charakterisierung von koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺T-Zellen im Muskel während der akuten Phase

Um den Einfluss der Infektion auf den Phänotyp von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in dem Muskel zu untersuchen, wurde an Tag 15 p.i. Muskelgewebe isoliert und schonend enzymatisch verdaut. Die Muskelzell-Suspension wurde gefärbt und mittels Durchflusszytometrie wurde das Immuninfiltrat charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zu sehen. Der infizierte Muskel zeigte eine starke Infiltration von CD3⁺CD45⁺CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu dem Muskel von naiven Mäusen. Die wenigen CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel von naiven Mäusen exprimierten am stärksten PD-1 aber keine anderen inhibitorischen Moleküle (Abb. 19 C). Alle infiltrierende CD8⁺ T-Zellen bei den infizierten Mäusen waren stark aktiviert, also CD44⁺ und CD62L⁻ (Ergebnisse nicht aufgeführt) und exprimierten, so wie auch die T-Zellen aus der Milz, das koinhibitorische Molekül Tim-3 am stärksten (Abb. 19 B). Nur ein sehr geringer prozentueller Anteil der CD8⁺ T-Zellen war PD-1⁺ und noch weniger Zellen waren Lag-3⁺[96]. Die Ko-Expression von Tim-3 und PD-1 lag unter 10% der CD8⁺ T-Zellen

(Abbildung 19 C). Am höchsten exprimiert war KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*). KLRG1 wird verwendet als Marker für zelluläre Differenzierung, welches Antigen-erfahrene und hoch differenzierte CD8⁺ T-Zellen identifiziert [97]. Daher wurde dieser Marker in die Untersuchung aufgenommen. KLRG1 wird vor allem auch auf NK Zellen exprimiert aber auch noch auf anderen Zellen gefunden. Trotzdem ist die Funktion von KLRG1 auf CD8⁺ T-Zellen nicht vollständig geklärt. Es wurde bereits gezeigt, dass KLRG1 eine hemmende Rolle bei TZR-vermittelten Signalen spielt und somit auch als inhibitorisches Molekül und Marker für erschöpfte CD8⁺ T-Zellen gelten kann [98]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Entwicklungsplastizität dieser KLRG1⁺CD8⁺ T-Effektorzellen wichtig für die Entstehung funktionell vielseitiger Gedächtniszellen und einer langfristigen schützenden Immunität ist.

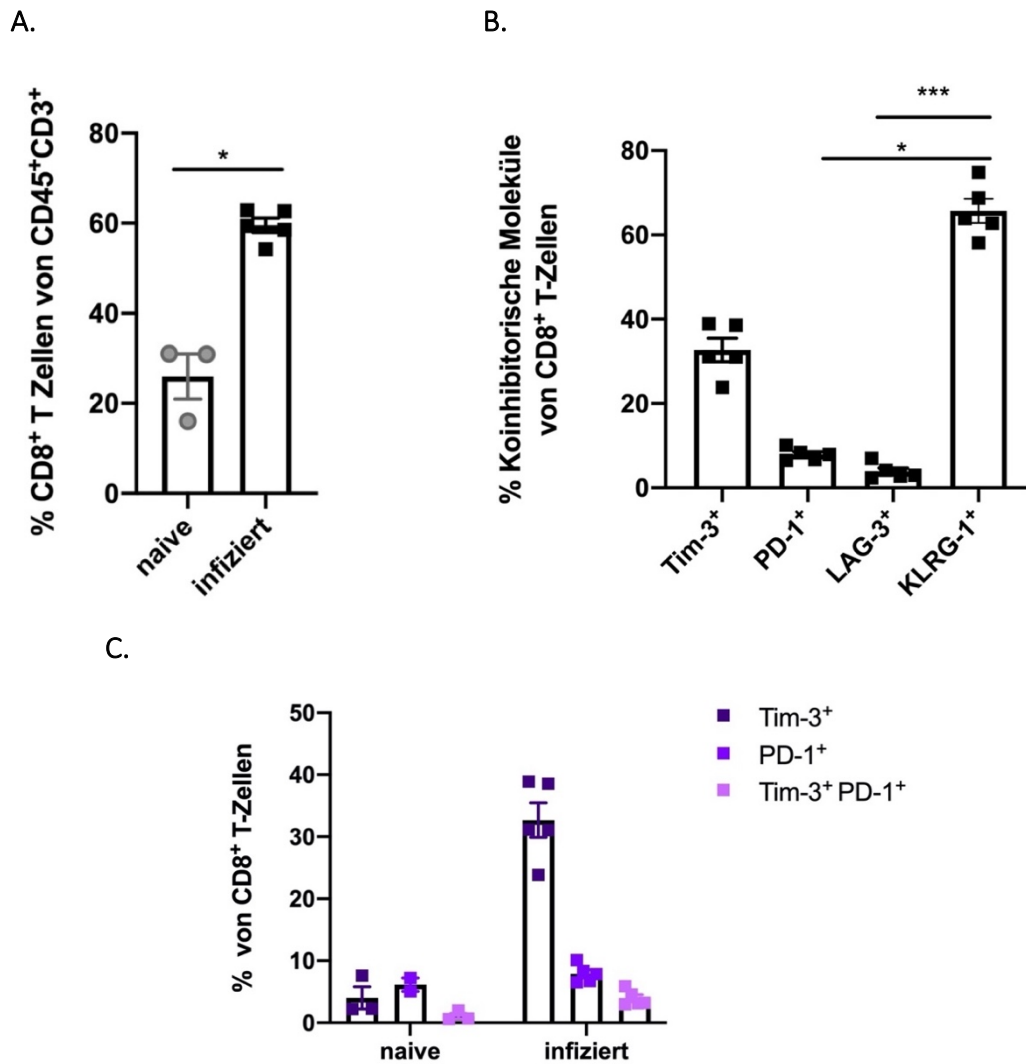


Abbildung 19: Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel *T. cruzi* infizierter Mäuse.

Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel an Tag 15 p.i. Die Gruppe der infizierten Mäuse an Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich mit den naiven Kontrollen eine signifikante Infiltration von CD8⁺ T-Zellen (A) und eine starke Induktion von koinhibitorischen Molekülen (C). Die infiltrierenden CD8⁺T-Zellen bei den infizierten Mäusen exprimierten am stärksten das koinhibitorische Molekül Tim-3 (B). PD-1 wurde nur geringfügig induziert und die Lag-3 Expression lag unter 5 %. Die Daten aus einem Experiment wurden mit *Student's t-Test (unpaired)* für (A) ausgewertet und für (B) mit *Kruskal-Wallis-Test* mit anschließendem *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=3; infiziert am Tag 15 n=5) dargestellt.

Anschließend wurde analysiert, ob *T. cruzi* spezifische CD8⁺ T-Zellen koinhibitorische Moleküle exprimierten. *Martin et al.* haben bereits 2006 immundominante *T. cruzi* Epitope beschrieben, die von CD8⁺ T-Zellen in *T. cruzi* infizierten Mäusen erkannt werden. In dieser Untersuchung waren während der akuten Phase 30 % der CD8⁺ T-Zellen gegen diese Epitope gerichtet, die aus den Mitgliedern der großen trans-Sialidase-Genfamilie generiert werden [90]. Seitdem wird das Peptid TSKB20

benutzt, um *T. cruzi* spezifische CD8⁺ T-Zellantworten zu untersuchen. Dieses Peptid wurde in ein MHC-Multimer beladen. Das Dextramer bestand aus einem Dextran-Rückgrat, welches eine hohe Anzahl an TSKB20 beladenen MHC-2b Molekülen und PE Fluorochrome trug. In Abbildung 20 (B) ist zu sehen, dass 10% der CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel der infizierten Mäuse an Tag 15 p.i. spezifisch für TSKB20 und somit für *T. cruzi* sind. (C) Die koinhibitorischen Moleküle auf diesen TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen unterscheiden sich nicht von denen der kompletten CD8⁺ T-Zellen. Auch hier ist statistisch eine signifikante Induktion von Tim-3 und KLRG1 deutlich zu sehen.

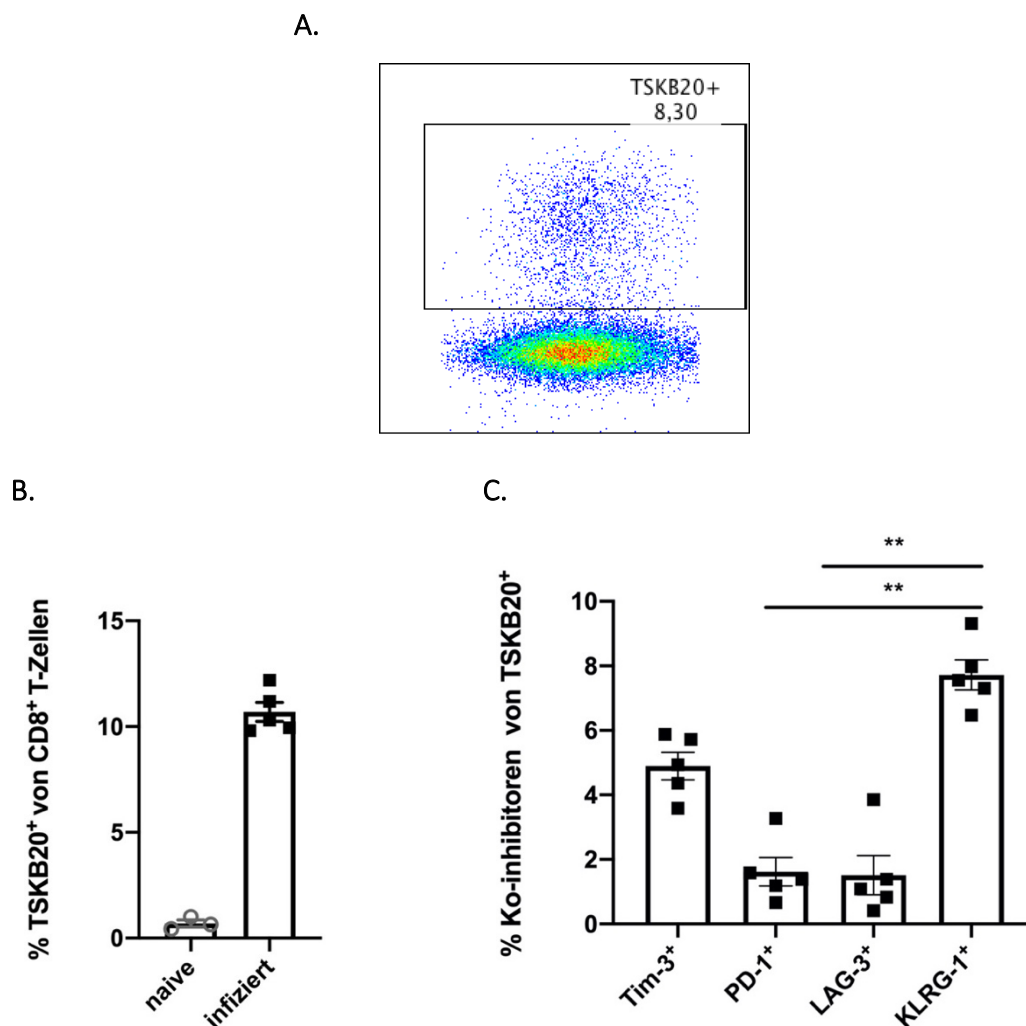


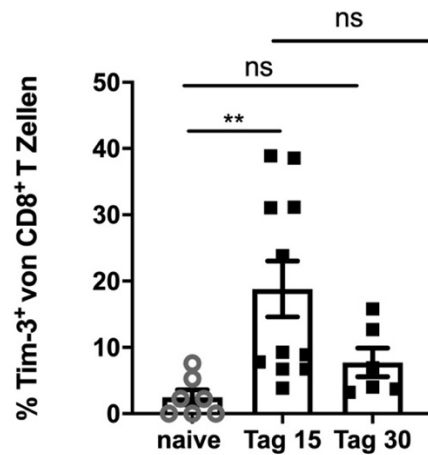
Abbildung 20: Charakterisierung von *T. cruzi* spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel.

Durchflusszytometrische Analyse von TSKB20⁺CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel am Tag 15 p.i. Die Gruppe der infizierten Mäuse am Tag 15 p.i. zeigte im Vergleich zu den naiven Kontrollen eine signifikante Induktion von *T. cruzi* spezifischen TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen. (A) Ein repräsentatives Bild der Färbung. (B) TSKB20⁺CD8⁺ T-Zellen zeigten eine starke Induktion von koinhibitorischen Molekülen. Am stärksten ist das koinhibitorische Molekül Tim-3 exprimiert. Die Daten aus einem Experiment wurden für (A) mit *Student's t-Test (unpaired)* ausgewertet und für (B) mit *Kruskal-Wallis-Test* mit anschließend *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=3; infiziert am Tag 15 n=5) dargestellt.

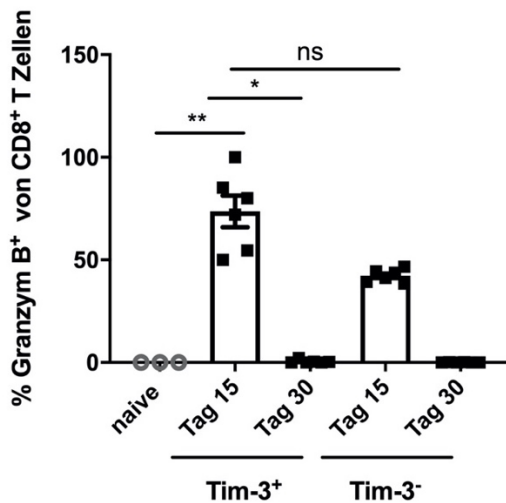
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zu einem starken Anstieg der CD8⁺ T-Zellen im Muskel durch die Infektion kam und dass 10 % der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für der TSKB20⁺ Epitop von *T. cruzi* waren. Die Untersuchung der koinhibitorischen Moleküle zeigte, dass die CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die CD8⁺ T-Zellen aus der Milz aufwiesen. Nach einer Infektion mit *T. cruzi* wurde das koinhibitorische Molekül Tim-3 am stärksten induziert. Nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigte sich, dass in der akuten Phase die CD8⁺ T-Zellen aus der Milz die Fähigkeit mit einer Produktion von pro-inflammatorischem IFN- γ oder TNF- α zu reagieren verloren hatten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Tim-3⁺CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel während der akuten *T. cruzi* Infektion einen Verlust an zytotoxischen Funktionen aufweisen könnten. Da es experimentell nicht einfach war, eine reine Muskelzell-Suspension zu stimulieren, wurde zur Analyse des zytotoxischen Potenzials der CD8⁺ T-Effektorzellen aus dem Muskel intrazellulär die Produktion des Moleküls Granzym B analysiert. Granzym B ist einem Effektormolekül, das von CD8⁺ T-Zellen sezerniert wird. Zeitgleich wurde die Menge von CD107a auf der Oberfläche bestimmt. CD107a (LAMP-1), welches als Folge der Degranulation von CD8⁺ T-Zellen auf der Zelloberfläche exponiert wird, dient somit als ein Marker für die Zytotoxizität. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse dargestellt. Zunächst wurde die Expressionskinetik von Tim-3 an Tag 15 p.i. und an Tag 30 p.i. bestimmt. Zu sehen ist nach der starken Induktion an Tag 15 p.i. eine starke Abnahme bis zu Tag 30 p.i., die aber nicht statistisch signifikant war. Um den Unterschied in der Zytotoxizität festzustellen, wurden die Tim-3⁺ und Tim-3⁻ CD8⁺ T-Zellen gegenübergestellt. Während die CD8⁺T-Zellen der naiven Mäuse weder Granzym B noch CD170a positiv waren, wiesen die Tim-3⁺ CD8⁺ T-Zellen an Tag 15 p.i. mehr Granzym B als die Tim-3⁻ auf, obwohl dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war. Hervorzuheben ist, dass es an Tag 30 p.i. weder bei der Tim-3⁺ noch bei der Tim-3⁻ T-Zellen möglich war, Granzym B nachzuweisen. Dieser Verlust der Granzym B Produktion an Tag 30 p.i. wurde ebenfalls vor kurzem von *Mateus et al.* in Milzzellen von infizierten Mäusen beschrieben [43]. Die Analyse von CD107a zeigte dagegen eine konstant hohe Expression. In Vergleich zu den naiven Mäusen war sie zu jedem Zeitpunkt und unabhängig von den Tim-3 Expression statistisch signifikant erhöht in Vergleich zu den naiven Kontrollen. Die stärkste Expression war bei der Tim-3⁺ T-Zellen

am Tag 15 p.i. zu verzeichnen. Diese Expression war höher als die von Tim-3⁻ am selben Tag jedoch nicht signifikant. An Tag 30 p.i. waren prozentual mehr Tim-3⁺ T-Zellen CD107a⁺ als Tim-3⁻ T-Zellen. Auch wenn kein Granzym B nachzuweisen war, deutet die CD107a Expression auf eine erfolgte Degranulation hin.

A.



B.



C.

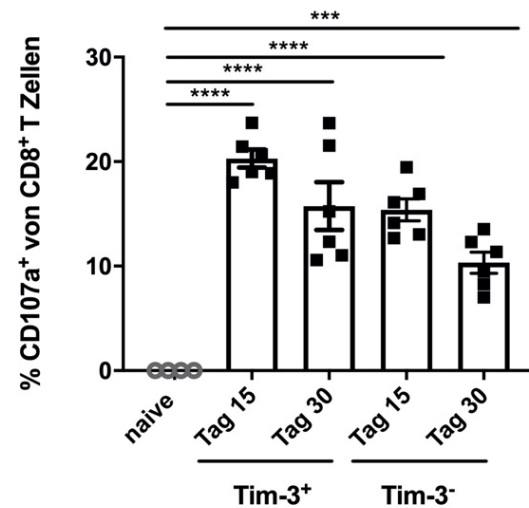


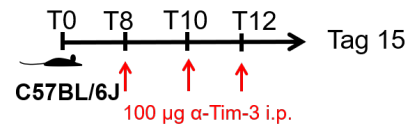
Abbildung 21: Granzym B und CD107a Produktion bei Tim-3⁺ CD8⁺ und Tim-3⁻ CD8⁺ T-Zellen während der akuten Phase der Infektion mit *T. cruzi*.

(A) Analyse der Tim-3 Expression an Tag 15 p.i. und an Tag 30 p.i. (B) Granzym B innerhalb der Tim-3⁺ vs. Tim-3⁻ CD8⁺ T-Zellen, welche aus der Milz isoliert wurden. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten wurden mit *Student's t-Test (unpaired)* ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM (naive n=4, Tag 15 (n=5) und Tag 30 (n=5) dargestellt.

4.7 Blockade von Tim-3 während der akuten und chronischen Phase der Infektion

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente ergab sich als möglicher therapeutischer Ansatz, Tim-3 in der akuten Phase zu blockieren, um die Immunantwort zu steigern. Das Ziel diese Versuche war die Untersuchung des Effekts einer therapeutischen Blockade von Tim-3 mittels α -Tim-3 während der Infektion mit *T. cruzi*. Die Erwartung war, wie bei anderen Tumor- und Infektionsmodellen gezeigt [36], damit die Immunantwort so zu modulieren, dass es zu einer verbesserten Eliminierung des Parasiten kommt. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Reduktion der Parasitenlast im Gewebe untersucht. Die Blockade erfolgte dabei einmal während der akuten Phase und im Vergleich dazu während der chronischen Phase der Infektion. Während der akuten Phase wurden die blockierenden Antikörper im Verlauf der T-Zellaktivierung dreimal i.p. verabreicht. Die Kontrollmäuse erhielten einen Isotyp Kontrollantikörper nach dem gleichen Schema. Am Tag 15 p.i. wurde das Experiment beendet und Gewebeproben aus Milz, Muskel, Herz, Leber wurden aufgereinigt, um die Parasitenlast zu bestimmen. In Abbildung 22(A) ist das Schema der Blockade dargestellt. In (B) sind die Ergebnisse der qPCR für die Milz und den Muskel dargestellt. Es zeigte sich, dass die Tim-3 Blockade im Trend zu einer Reduktion der Parasitämie im Muskelgewebe führte, dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant im Vergleich mit der mit Kontroll Isotyp-Antikörper behandelten Gruppe. Somit ist ein signifikanter Einfluss auf die Verbesserung der Eliminierung des Parasiten im Muskelreservoir nicht nachzuweisen. Darüber hinaus stieg die parasitäre Last in der Milz hochsignifikant an. Hinsichtlich der anderen Organe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

A.



B.

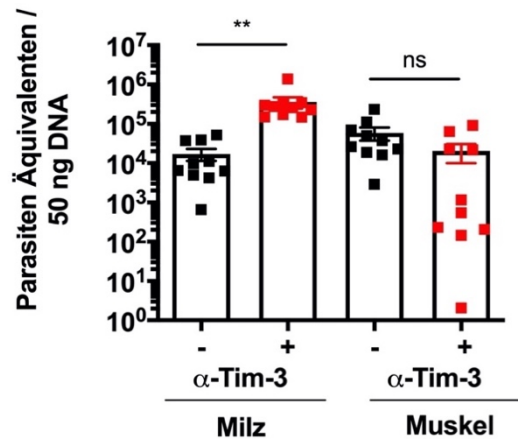


Abbildung 22: Blockade von Tim-3 während der akuten Phase und ihr Einfluss auf die Parasitäreichheit.

Es wurde eine Blockade mittels α -Tim-3 durchgeführt. Das Applikationsschema ist in (A) zu sehen. Die Kontrollgruppe erhielt in demselben Schema einen Isotyp Antikörper. (B) Der Effekt der Tim-3 Blockade wurde mittels einer Bestimmung der Parasitäreichheit im Gewebe via qPCR analysiert. Während es im Muskelgewebe zu einer nicht signifikanten Abnahme der Parasitäreichheit kam, stieg die Anzahl an Parasiten in der Milz signifikant an. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten und wurden mit Student's t-Test (*unpaired*) ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Infizierte Mäuse mit α -Tim-3 n=10, infizierte Mäuse mit Isotyp Antikörper n=10) dargestellt.

Es wurde des Weiteren untersucht, ob die Blockade von Tim-3 einen Effekt auf die Anzahl der *T. cruzi* spezifischen TSKB20⁺CD8⁺ T-Zellen hat und ob es einen Einfluss auf die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen bewirkt. Die Rationale dafür war, dass Avery *et al.* bestreiten, dass die Expression von Tim-3 ausschließlich mit einem Erschöpfungszustand der T-Zellen assoziiert ist. Sie konnten zeigen, dass, während einer akuten Infektion mit LCMV, Tim-3 transient exprimiert wird und dass die Hauptfunktion von Tim-3 darin besteht, die T-Zellaktivierung zu verstärken. Eine Überexpression von Tim-3 förderte die Entwicklung von kurzlebigen T-Effektorzellen und reduzierte erheblich den Anteil von T-Gedächtniszellen [71]. Wenn Tim-3 eher kostimulatorisch wirkt und essentiell für die T-Zellaktivierung ist, sollten weniger TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen nach der Blockade nachweisbar sein, sowie eine verminderte Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen feststellbar sein sollte. Die Ergebnisse in Abbildung 23 deuten darauf hin, dass Tim-3 in diesem Model weder eine inhibitorische

Funktion hat, noch kostimulatorisch wirkt, denn es sind keine Veränderungen zwischen den mit Tim-3 behandelten und den nicht behandelten Gruppen festzustellen. Es gibt weder einen Unterschied in der Frequenz der TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen noch in der Fähigkeit der CD8⁺ T-Zellen pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren oder zytolytische Granula zu sezernieren.

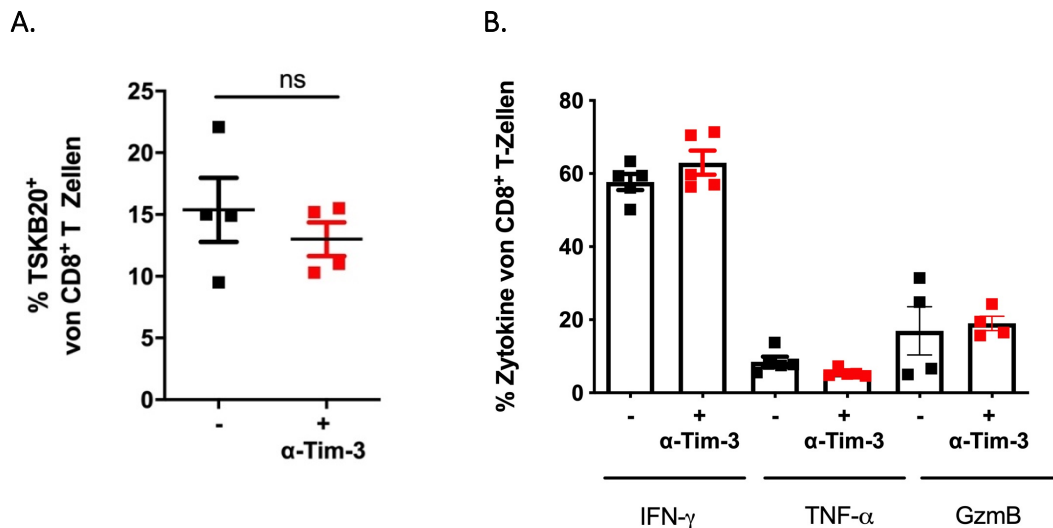


Abbildung 23: Analyse der TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen und der Zytokinproduktion nach der Blockade mit α -Tim-3.

(A) Untersucht wurde die Frequenz von *T. cruzi* spezifischen TSKB20⁺ CD8⁺ T-Zellen nach der Behandlung mit α -Tim-3 Antikörpern. Es wurde kein Unterschied gefunden zwischen den behandelten und den unbehandelten Gruppen. (B) Untersucht wurde die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen nach der Blockade mit α -Tim-3 und einer anschließenden spezifischen Stimulation mit TSKB20 Peptid *ex vivo*. Nach der Stimulation wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet. Die Daten wurden mit *Student's t-Test (unpaired)* ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (α -Tim-3 behandelt n=4, Isotyp behandelt n=4) dargestellt.

Schließlich wurde im Serum untersucht, ob es durch die Tim-3 Blockade systemisch zu einer stärkeren Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen kam. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Produktion von IFN- γ ist sehr hoch bei den infizierten Mäusen im Vergleich zu den naiven Kontrollen, aber zwischen der Tim-3 behandelten und der nicht behandelten Gruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden. Bei den naiven Mäusen konnte kein TNF- α gemessen werden, während es nach der Infektion zu einer sehr starken Induktion kam. Bei der Tim-3 behandelten Gruppe wurde eine Abnahme von TNF- α festgestellt, dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant aufgrund der Streuung der Proben in der Gruppe der Infizierten und nicht mit Tim-3 behandelten Mäuse.

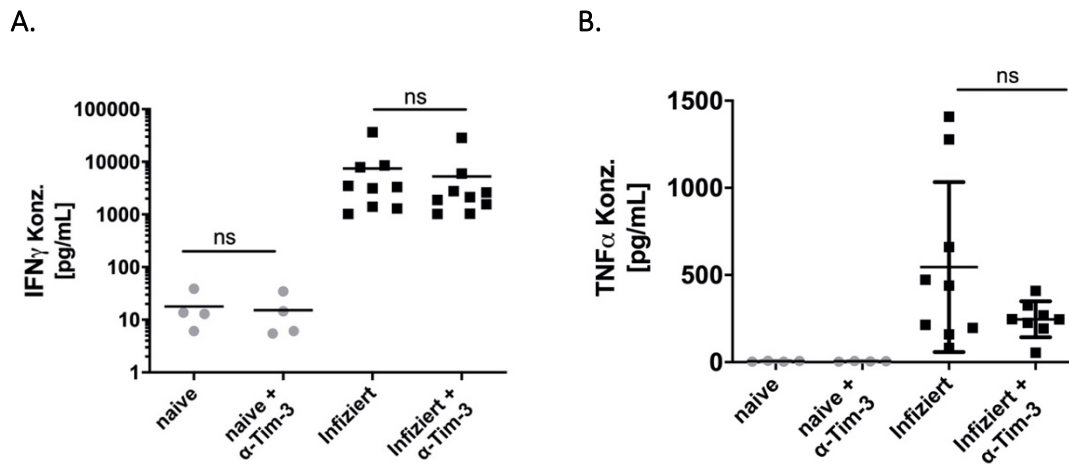


Abbildung 24: Untersuchung von pro-inflammatorischen Zytokinen im Serum nach Tim-3 Blockade.

Nach der Infektion und Blockade mit α -Tim-3 oder mit Isotyp Antikörper (Kontrolle) wurde am Tag 15 p.i. Serum gewonnen und mittels *Legendplex™* das Vorhandensein von IFN- γ und TNF- α gemessen. Die Blockade von Tim-3 zeigte keinen Einfluss auf die IFN- γ Produktion, während bei TNF- α im Trend eine Abnahme beobachtet wurde, was aber nicht signifikant war. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengetragen und wurden mit Student's t-Test (*unpaired*) ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive Isotyp behandelt n=4; Naive α -Tim-3 behandelt n=4; Infiziert α -Tim-3 behandelt n=9; Infiziert Isotyp behandelt n=9) dargestellt.

Die Blockade Experimente wurden auf zwei verschiedene Arten fortgesetzt. Es sollte untersucht werden, ob der Effekt der Tim-3-Blockade zu einer geringeren Parasitämie in der chronischen Phase führt. Da aus früheren Experimenten bekannt war, dass die Parasitämie im Gewebe während der chronischen Phase unter der Nachweisgrenze des qPCR liegen könnten, basierte die Strategie auf die Depletierung des kompletten CD8⁺ T-Zellkompartiments 15 Tage vor der Analyse. Wie bereits in 4.3 gezeigt, wird die Kontrolle durch CD8⁺ T-Zellen ausgeübt, und durch ihre Depletion wurde ein Wiederauftreten der Parasiten erwartet. Dies sollte deutlich unterschiedlich ausfallen, wenn die Blockade in der frühen Phase zu einer stärkeren Eliminierung der Parasitenreservoirs geführt hätte. Tiere der beiden Gruppen, die mit Tim-3 oder mit Isotypen-Kontrollantikörpern behandelt wurden, erhielten zwei Dosen der depletierenden anti-CD8 Antikörper. Das Behandlungsschema ist in Abbildung 25 zu sehen. Zunächst wurde die Tim-3-Blockade während der akuten Phase erneut durchgeführt (siehe Abbildung 25 A), und die Wirkung auf die Parasitämie wurde an Tag 63 p.i. untersucht. In einem darauffolgenden Experiment wurde die Tim-3 Blockade während des Übergangs zwischen der akuten und chronischen Phase durchgeführt und die Untersuchung der Parasitämie erfolgte an Tag 85. Für beiden Experimenten wurden

Gewebeproben von Herz, Muskel, Milz, Leber und Darm untersucht. In beiden Experimenten zeigte sich, dass nach der Depletion von CD8⁺ T-Zellen, die Parasitämie im Muskel am höchsten ansteigt. Darüber hinaus gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit anti-Tim-3 behandelten Gruppen zu den mit Isotyp Antikörper behandelten Gruppen. Interessant ist jedoch die Beobachtung, dass in beiden Experimenten, in dem Darm die Parasitämie nach der Tim-3 Blockade im Trend zunimmt (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 25: Schematische Darstellung der Blockadestrategien von Tim-3.

(A) Die Blockade wurde in der akuten Phase durchgeführt und die Depletion von CD8⁺ T-Zellen fand in dem Übergang zu der chronischen Phase statt. Die Analyse der Parasitämie wurde an Tag 63 durchgeführt. (B) Die Blockade wurde in dem Übergang zu der chronischen Phase verabreicht und die Analyse der Parasitämie wurde an Tag 85 durchgeführt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zu einer Induktion von Tim-3 in CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion mit *T. cruzi* kommt. Dieses Molekül wurde als ko-inhibitorisches Molekül im Zusammenhang mit multiplen menschlichen Pathologien, wie z.B. Krebs, beschrieben und ist somit ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Immuntherapien. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine therapeutische Tim-3-Blockade die T-Zellantwort gegen *T. cruzi* verstärken und eine Eliminierung der Parasiten verbessern kann. Die Durchführung der Tim-3 Blockade in der akuten Phase und die Analyse der Parasitämie an Tag 15 p.i. zeigten einen moderaten, aber nicht statistisch signifikanten Effekt einer verstärkten Eliminierung der Parasiten im Muskelgewebe. Allerdings ging dieser Effekt mit einer Zunahme der Parasiten in der Milz einher. Darüber hinaus zeigten alle anderen Blockierungsexperimente keine signifikanten Unterschiede in der Parasitenlast.

Schließlich wurde gezeigt, dass die Blockade von Tim-3 für die Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen in diesem Modell nicht entscheidend ist. Darüber hinaus bleibt zu untersuchen, ob die Anwendung von blockierenden Antikörpern i.p. auch andere

Tim-3⁺ Immunzellen erreichte und Effekte vermittelt, die im Rahmen dieser Arbeit nicht ausreichend untersucht wurden.

4.8 Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen im Muskel während der chronischen Phase

Die Induktion von koinhibitorischen Molekülen sowie die Aktivierungsmarker auf T-Zellen nahmen in der frühen chronischen Phase (bereits an Tag 60 p.i.) ab, und dieser Zustand änderte sich nicht bis zum Tag 250 p.i. Da ein wichtiger Teil des Forschungsprojektes darin bestand, die Frage zu beantworten, ob die CD8⁺ T-Zellen im chronischen Verlauf der Infektion erschöpfen und ob dies mit der Entwicklung der Pathologie und der Chagas-Krankheit zusammenhängt, mussten längere Infektionsverläufe verfolgt werden. Ein gutes Modell sollte die Merkmale der Chagas-Krankheit beim Menschen so genau wie möglich reproduzieren. Da es Jahrzehnte dauert, bis sich die Chagas-Krankheit beim Menschen entwickelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es mindestens ein halbes Mausleben (3-4 Jahre für Laborstämme) dauert, um die Reaktion von T-Zellen auf die chronische Antigenstimulation zu reproduzieren. Die zuvor vorgestellten Ergebnisse beweisen, dass CD8⁺ T-Zellen entscheidende Effektorfunktionen für die langfristige Kontrolle von Parasiten ausüben. Da der Muskel das Organ der Persistenz ist, ist es anzunehmen, dass CD8⁺ T-Zellen im Muskelgewebe kontinuierlich Antigen- und Gewebeentzündungsprozessen ausgesetzt sind und erst nach sehr langer Infektion, einen erschöpften Zustand erreichen. Das Experiment wurde auf Grundlage dieser Überlegungen auf zwei Jahre angelegt. Anschließend wurde der Phänotyp und der funktionelle Status von CD8⁺ T-Zellen in infiziertem Muskelgewebe von zwei Infektionsgruppen à zehn Mäuse und fünf naiven Kontrollen untersucht.

4.8.1 Aufteilung nach der Parasitenlast im Muskelgewebe

Zunächst wurden Muskel- und Herzproben isoliert und mittels qPCR die parasitäre Gewebslast bestimmt. Der Nachweis der Parasiten im Herzgewebe war schwierig, denn bei vielen Proben lag die Parasitämie unter der Nachweisgrenze der qPCR und die ermittelte Parasitämie war insgesamt sehr gering (max. 30 Parasiten/ 50 ng Herzgewebe). In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für Herz- und Muskelgewebe im

Vergleich für jede Maus dargestellt. Zu sehen ist, dass die Parasitämie im Muskelgewebe deutlich höher ist und dass keine Korrelation zwischen der Parasitenanzahl im Muskel und der Parasitenanzahl im Herzen derselben Mäuse zu finden war. Darüber hinaus ist eine große Streuung der Werte zu sehen. Sie reichte von 1 bis zu 1×10^6 Parasiten/ 50 ng DNA im Muskelgewebe. Diese Anzahl an Parasitenäquivalenten pro Nanogramm entsprach der beobachteten Parasitämie in der akuten Phase (vgl. Abbildung 6). Das deutet stark darauf hin, dass, obwohl alle Mäuse sich in einem guten gesundheitlichen Zustand befanden, einige Mäuse der Infektionsgruppe die Parasitämie über einen längeren Zeitraum in dem Skelettmuskel schlechter kontrollieren konnten. Im Folgenden wurde die Parasitenlast und die vorhandene Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Zellen in dem Muskel korreliert. Der R-Wert betrug 0,467 und weist auf eine moderate positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Parasiten und aktivierten CD8⁺ T-Zellen im Muskel hin. Der p-Wert für diese Korrelation betrug $p=0,044$ und somit war diese Korrelation (auf einem Signifikanz Niveau von 0,05) signifikant. Die infizierten Tiere wurden in drei Gruppen je nach Parasitenlast im Muskel aufgeteilt. In Abbildung 27 ist die Korrelation zwischen den aktivierten CD8⁺ T-Zellen und der Parasitenlast zu sehen. In Abbildung 28 ist die Aufteilung der Versuchstiere zu sehen. Tiere mit einer Gewebslast unter zehn Parasiten wurden der Gruppe „Niedrig“, mit weniger als 10^4 Parasiten der Gruppe „Mittel“ und Tiere mit weniger als 10^6 Parasiten der Gruppe „Hoch“ zugeordnet.

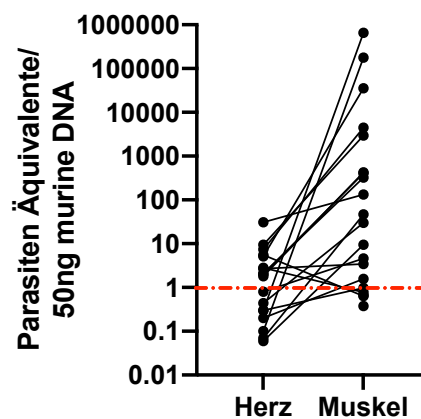


Abbildung 26: Vergleich der Parasitenlast zwischen Herz- und Muskelgewebe.

Parasitenäquivalente pro 50 ng DNA wurden aus Herz und Muskelgewebe an Tag 800 p.i. (späte chronische Phase) der Infektion mittels qPCR analysiert. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengetragen (*T. cruzi* gesamt $n=20$).

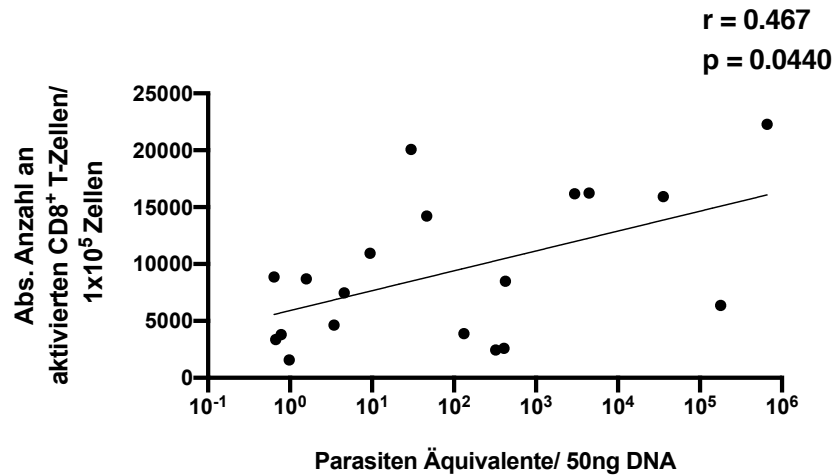


Abbildung 27: Korrelation der Gewebslast in dem Muskel und der Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

Es wurde die Gewebslast in den Muskeln von 20 infizierten Mäuse analysiert und zur Ermittlung einer potentiellen Korrelation zwischen der absoluten Anzahl der aktivierten CD8⁺ T-Zellen und der Parasitenlast wurden die jeweils ermittelten Werte gegeneinander aufgetragen und mittels Pearson Korrelation untersucht.

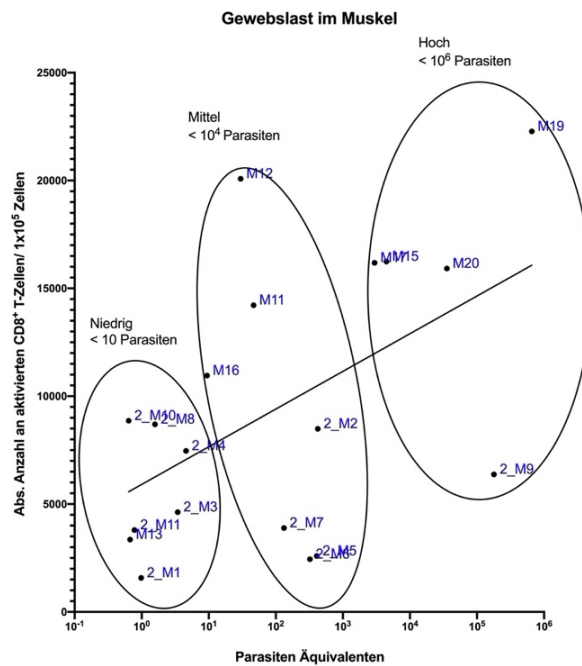


Abbildung 28: Aufteilung der Tiere in Gruppen nach der Parasitenlast in dem Muskel.

Die Proben aus den späten chronischen Experimenten wurden mittels qPCR untersucht und in Gruppen aufgeteilt. Die weiteren drei Gruppen zeigten zunehmende Gewebslast im Muskel. Die Gruppe mit < 10 Parasiten Äquivalenten/ 50ng DNA (niedrig), die zweite mit < 10⁴ Parasiten Äquivalenten/ 50 ng DNA (mittel) und die dritte Gruppe mit < 10⁶ Parasiten Äquivalenten / 50ng/ DNA (hoch).

4.8.2 Phänotypisierung der CD8⁺ T-Zellen

Als nächstes wurden die T-Zellen aus dem Muskel untersucht. In Abbildung 29 ist eine repräsentative Färbung und die *gating* Strategie zu sehen. Die Darstellung der Ergebnisse wurde in absoluten Zahlen gemacht. Grund dafür ist, dass bei den naiven Kontrollen sehr wenige T-Zellen im Gewebe vorhanden waren, aber diese einen vollständig aktivierten Phänotyp hatten und dazu exprimierten sie die wichtigen koinhibitorischen Moleküle auf der Oberfläche. Eine Darstellung der Aktivierungsmarker und koinhibitorischen Moleküle in % als Frequenzen hätte zu einer falschen Interpretation der Daten führen können. Denn nach der Infektion mit *T. cruzi* ist die Anzahl der infiltrierenden T-Zellen sehr hoch. Bei den infizierten Mäusen ließ sich beobachten, dass es zu einer signifikant höheren Infiltration von CD3⁺ (B) und CD4⁺ T-Zellen (C) zwischen der Gruppen mit mittleren und höheren Parasitenlast im Vergleich zu den naiven Kontrollen kam. Allerdings waren schon in den naiven Kontrolltieren viele CD8⁺ T-Zellen im Muskel vorhanden und es gab keinen Unterschied zu der Gruppe der infizierten Mäuse mit einer niedrigen Parasitämie (D). Im Trend war eine Zunahme der Infiltration der T-Zellen mit der Zunahme der Parasitenlast in dem Muskel zu beobachten, diese war jedoch nicht signifikant.

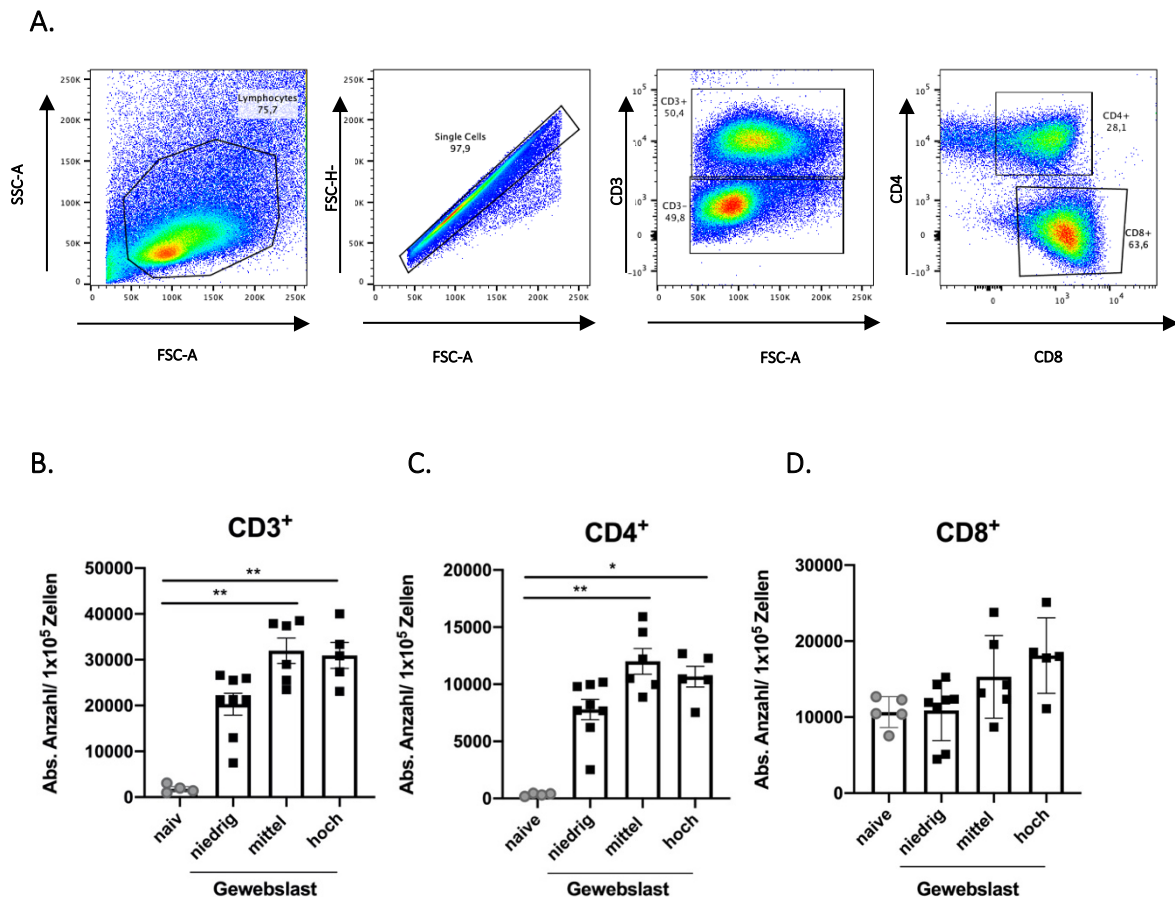


Abbildung 29: Anzahl der T-Zellen abhängig von der Parasitämie

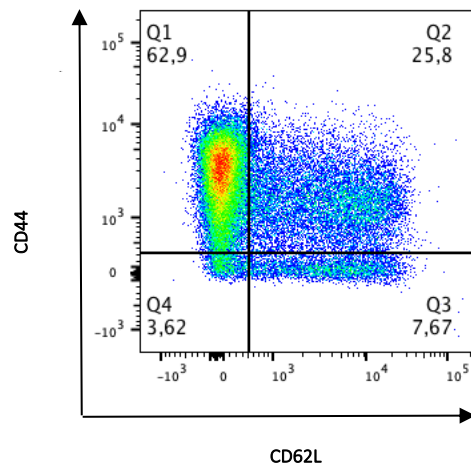
Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel am Tag 800 p.i. (A) Ein repräsentatives Bild der Färbung und der *gating* Strategie. Die Gruppe der infizierten Mäuse zeigte im Vergleich zu den naiven Kontrollen eine signifikante Infiltration von (B) CD3⁺ und (C) CD4⁺ T-Zellen. (D) CD8⁺ T-Zellen sind stark angereichert im Muskel bei den naiven Kontrollen und nehmen nach der Infektion und in Abhängigkeit mit der Parasitämie nur im Trend zu ohne statistisch signifikant zu sein. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten wurden mit Kruskal-Wallis-Test und anschließend mit *Dunn's Multiple Comparison Test* analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Naiv n=5; Infiziert n=20; niedrig=9; mittel=6; hoch=5) dargestellt.

Die CD8⁺ T-Zellen wurden anhand der Marker CD44 und CD62L weiter charakterisiert [99]. Die Zelloberflächenmoleküle CD44 und CD62L wurden verwendet, da sie zuverlässige Marker für Antigen aktivierte Effektorpopulationen (T_{eff}) und T-Effektor/ Gedächtniszellen ($T_{eff/mem}$) sind. CD44 spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung und verstärkt die Signale nach Antigenbindung und fördert auch das Überleben der T-Zellen, indem es die Kontraktionsphase reguliert. Nur ein Teil der T_{eff} (CD44⁺) überlebt die Kontraktionsphase und bildet das Kompartiment der Effektor/ Gedächtnis-T-Zellen, die dann am Ende einer akuten Immunantwort CD44⁺ CD62L⁺ sind. CD62L ist ein Adhäsionsmolekül der T-Zelle und ermöglicht das

*Homing*¹³ der T-Zellen zu den sekundären Lymphorganen, wodurch die Migration zwischen Endothelzellen, dem Blut, in das lymphatische Gewebe ermöglicht wird. Nur CD62L⁺ T-Zellen gehören zu der naiven noch nicht aktivierten Gruppe der T-Zellen. In Abbildung 30 A ist eine repräsentative Färbung der CD8⁺ T-Zellen zu sehen. In Abbildung 30 B sind die T-Zellpopulationen durch diese Marker definiert und in Abhängigkeit von der Parasitämie dargestellt. Im Muskelgewebe der infizierten Mäuse waren insgesamt sehr wenige T-Zellen (< 1%) mit einem naiven Phänotyp (nur CD62L⁺) zu verzeichnen. Im Vergleich zu den naiven Kontrollen ist deutlich zu erkennen, dass die CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T_{Eff} am stärksten vertreten waren und mit zunehmender Parasitenlast mehr Effektor T-Zellen vorhanden sind. Der Anteil an T_{eff/mem} Zellen ist im Vergleich zu den naiven Kontrollen bei einer niedrigen Parasitenlast nicht besonders erhöht und mit zunehmender Anzahl an Parasiten erhöhte sich auch der Anteil an T_{eff/mem} Zellen.

¹³ Prozess der differentiellen Zielorganfindung durch die verschiedenen Untergruppen der Lymphzyten.

A.



B.

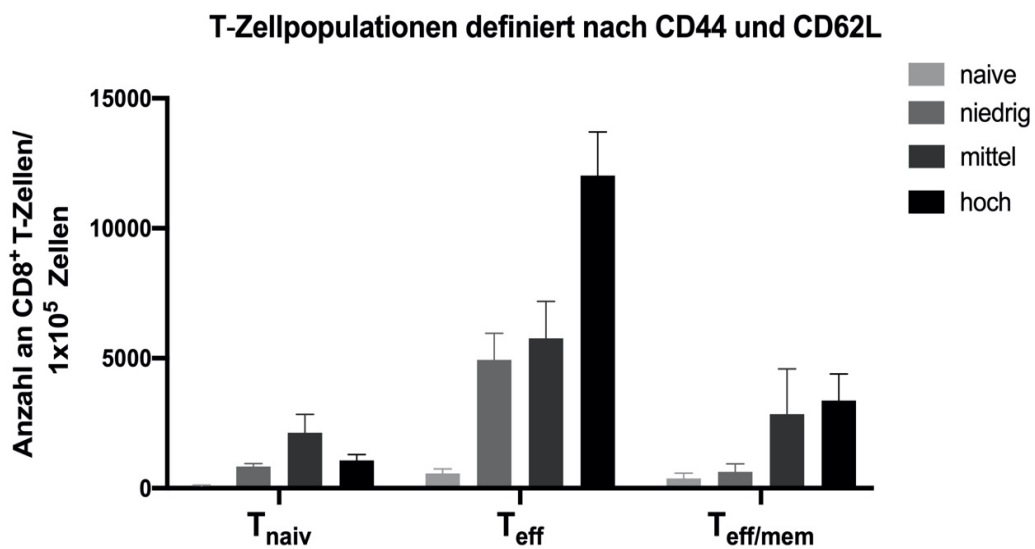


Abbildung 30: Vergleich der T-Zelleffektor- und Memory Populationen.

CD8⁺ T-Zellen aus dem Muskel an Tag 800 p.i. wurden auf CD44 und CD62L Expression analysiert und entsprechend ihrer Funktion in Gruppen aufgeteilt. (A) Ein repräsentatives Bild der Färbung und der *gating* Strategie. Q1. Nur CD44⁺ T_{eff}; Q2. CD44⁺ CD62L⁺ T_{eff/mem}; Q3. Nur CD62L⁺ T_{naiv}. (B) Die Gruppe der infizierten zeigte im Vergleich zu den naiven Kontrollen eine signifikante Induktion von T_{eff} Zellen und diese nahmen mit steigender Parasitämie zu. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM (naiv n=5; infiziert n=20; niedrig= 9; mittel=6; hoch=5) dargestellt.

Bei der Analyse der $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^-T_{eff}$ Zellen in Abhängigkeit von der Parasitenlast war der Unterschied zu den naiven Kontrollen nur bei der Gruppe der Mäuse mit einer hohen Parasitenlast hoch signifikant (siehe Abbildung 31).

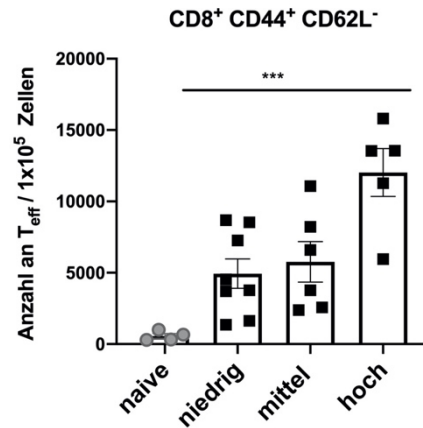


Abbildung 31: Anzahl der $CD8^+$ T-Effektorzellen in Abhängigkeit von der Parasitenlast.

$CD8^+ T_{eff}$ Zellen aus dem Muskel an Tag 800 p.i. wurden in Abhängigkeit von der Parasitenlast analysiert. Die Gruppen mit niedriger und mittlerer Parasitämie haben im Trend mehr T_{eff} Zellen im Vergleich zu den naiven Kontrollen, aber nicht signifikant. Erst bei einer hohen Parasitämie in dem Muskel zeigte sich eine signifikante Induktion von T_{eff} Zellen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließend mit *Dunn's Multiple Comparison Test* analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Naiv n=5; Infiziert n=20; niedrig= 9; mittel=6; hoch=5) dargestellt.

Anschließend wurden die T_{eff} Zellen auf die Expression von CD27 und CD69 untersucht. Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD27 in aktivierten $CD8^+$ T-Effektorzellen wird als Marker für T-Zellen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit die Kontraktionsphase überleben werden, benutzt. CD69 ist ein membrangebundener Typ-II-C-Lectin-Rezeptor. Er ist ein klassischer Marker für die frühe Aktivierung von T-Zellen, wird aber auch von mehreren gewebeständigen T-Zellen exprimiert. Zurzeit wird geforscht, ob gewebespezifische Faktoren die CD69 Expression steuern können, um die Retention und/oder das Überleben von T-Zellen zu fördern [100]. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Wie erwartet wurde CD27 nicht in der Gruppe der T_{eff} Zellen exprimiert, während das Molekül CD69 in den T-Zellen, welche aus dem Muskel isoliert wurden, sehr stark exprimiert war. Anders war das Expressionsprofil von CD69 bei den T-Zellen aus der Milz: Bei diesen T-Zellen wurde CD69 nur zu einem geringeren Maß exprimiert (A). Bei der Analyse der CD69 Expression

in Abhängigkeit von der Parasitämie kam es nur bei der Gruppe mit einer hohen Parasitämie zu einem signifikanten Unterschied (C).

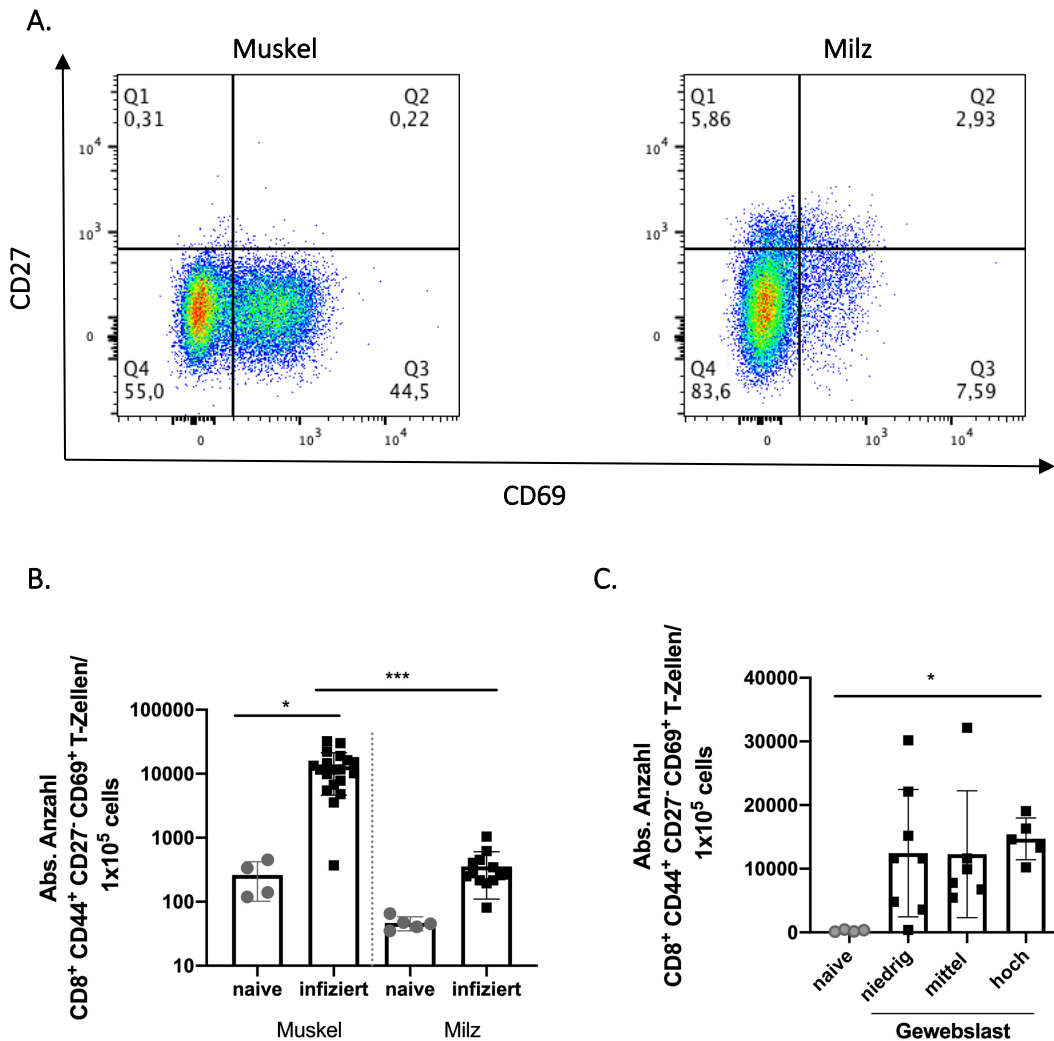


Abbildung 32: Analyse von CD27 und Induktion von CD69 in CD8⁺ T-Effektorzellen aus dem Muskel.

Durchflusszytometrische Analyse von T_{eff} Zellen aus dem Muskel am Tag 800 p.i. (A) Ein repräsentatives Bild der Färbung und der *gating* Strategie für CD27 und CD69. Zu sehen sind Muskel- und Milzproben im Vergleich. (B) Die Gruppe der infizierten Mäuse zeigte im Muskel im Vergleich zu den naiven Kontrollen eine signifikante Induktion von CD69, während die Induktion dieses Moleküls in der Milz nicht signifikant ist. Der Vergleich von CD69 zwischen dem infizierten Muskel und der infizierten Milz ist hochsignifikant. (C) Die Induktion von CD69 in dem Muskel in Abhängigkeit von der Parasitämie nahm im Trend zu und ist nur bei einer hohen Parasitämie signifikant. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und wurden mit dem *Kruskal-Wallis-Test* und anschließend mit *Dunn's Multiple Comparison* Test analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM (Naiv n=5; Infiziert n=20; niedrig=9; mittel=6; hoch=5) dargestellt.

Anschließend wurde die Expression der koinhibitorischen Moleküle in dem gesamten Kompartiment der aktivierten CD8⁺ T Zellen sowie bei den *T. cruzi* spezifischen TSKB20⁺ T-Zellen untersucht. Auch zu diesem sehr späten Zeitpunkt, wie auch in der frühen

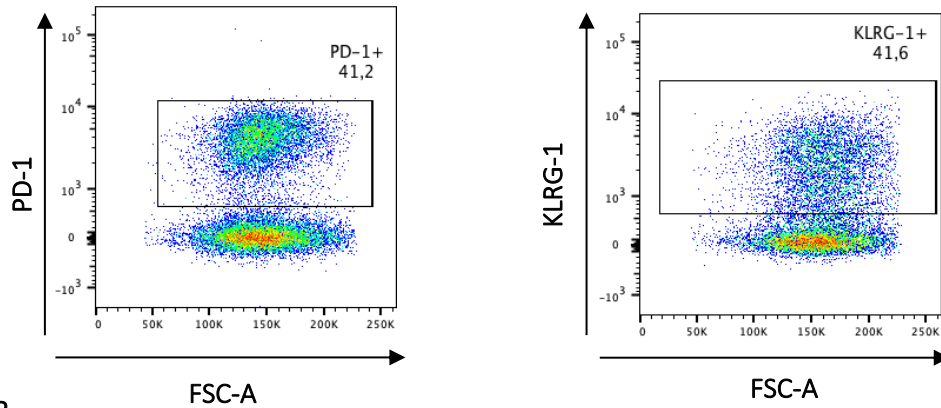
chronischen Phase, wurden weder Tim-3 noch Lag-3 von den T-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse für die aktivierten CD8⁺ T-Zellen ist in Abbildung 33 zu sehen. Die Expression von PD-1 war jedoch stark erhöht, was auf einen erschöpften T-Zellphänotyp hindeutet. Auch das Molekül KLRG1 wurde sehr stark exprimiert und bestätigte, dass diese T-Zellen Antigen-erfahren waren. Bei der Aufteilung nach der Parasitämie ist zu sagen, dass sowohl PD-1 als auch KLRG1 im Trend mit der Parasitämie korrelierten, und dass nur bei einer hohen Parasitämie ein signifikanter Unterschied zu den naiven Kontrollen zu finden war. Das Vorhandensein des Effektormoleküls Granzym B wurde analysiert und zeigte, dass Granzym B im Vergleich mit den naiven Kontrollen nur bei den infizierten Mäusen intrazellulär in den CD8⁺ T-Zellen angereichert war. Die Gruppe mit einer niedrigen Parasitenlast zeigte im Trend etwas mehr Granzym B als die Gruppe mit einer mittleren Parasitenlast, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Die Gruppe mit der höchsten Parasitämie zeigte eindeutig mehr Granzym B und dieser Unterschied war zu den naiven Kontrollen hoch signifikant (siehe Abbildung 33 C).

Die TSKB20⁺ *T. cruzi* spezifischen T-Zellen wurden gesondert untersucht. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die TSKB20⁺ T-Zellen sind angereichert in der Gruppe der aktivierten CD8⁺ CD44⁺ CD62L⁻ T_{eff} Zellen und es besteht eine sehr schwache Korrelation mit der Parasitämie, denn zwischen den drei Gruppen nach der Parasitämie (niedrig, mittel und hoch) eingeteilt gab keinen signifikanten Unterschied. Nur bei der Gruppe der Tiere mit einer hohen Parasitämie war der Unterschied zu den naiven Kontrollen signifikant. Sehr Interessant war die Beobachtung, dass eine sehr kleine Anzahl dieser spezifischen T-Zellen das Molekül PD-1 ko-exprimierten. Eine repräsentative Färbung zeigt, dass dies ein sehr kleiner Prozentsatz der TSKB20⁺ T-Zellen PD-1 ist. Die Expression sowohl von PD-1 als auch von KLRG1 nahm mit zunehmender Parasitämie zu, dieser Unterschied war aber nicht signifikant zwischen den Gruppen. Nur im Vergleich zu den naiven Kontrollen ist die Zunahme der Expression dieser Moleküle signifikant.

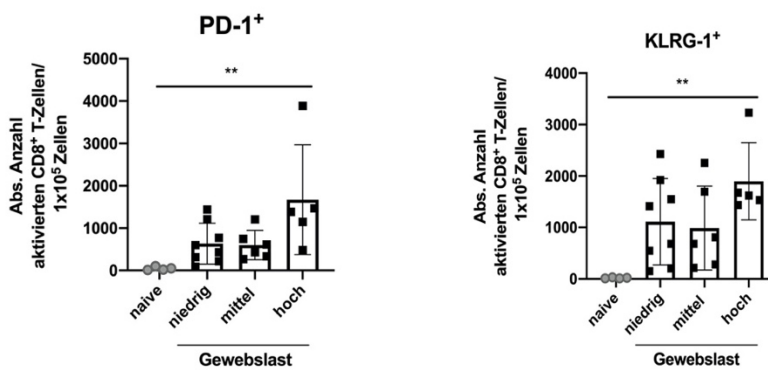
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur eine sehr lange Infektionszeit von zwei Jahren dazu führte, dass innerhalb der aktivierten CD8⁺ T_{eff} Zellen eine Subpopulation das koinhibitorische Molekül PD-1⁺ hochregulierten. Die TSKB20⁺ T-Zellen ko-exprimierten PD-1⁺ nicht.

Um die Funktionalität der PD-1⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurde einerseits der Transkriptionsfaktor TOX gefärbt und eine Stimulation mit spezifischen Peptiden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 auf Seite 81 zu sehen.

A.



B.



C.

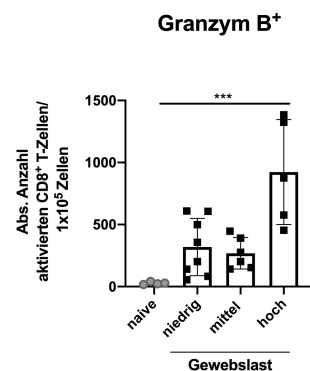
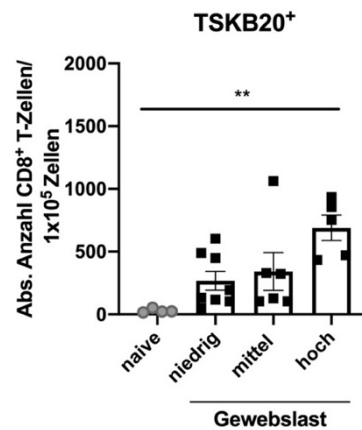


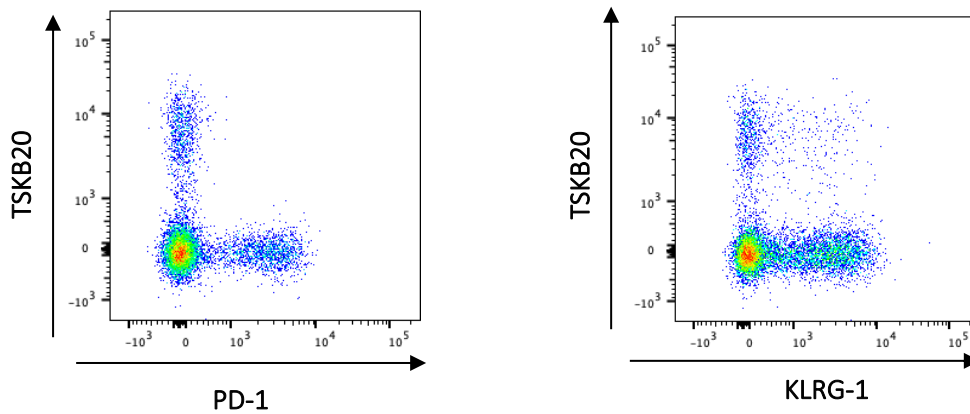
Abbildung 33: Expression von PD-1, KLRG-1 und Granzyme B in aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

(A) Anzahl CD8⁺ T_{eff} Zellen in Abhängigkeit von der Parasitämie. (B) Eine repräsentative Färbung für die Expression von PD-1 und KLRG1. (C) Expression von PD-1, KLRG-1 und Granzyme B in Abhängigkeit von der Parasitämie. Bei allen drei Markern zeigte sich erst ein signifikanter Unterschied zu den naiven Kontrollen bei der Gruppe mit einer hohen Parasitämie. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengetragen und wurden mit *Kruskal-Wallis-Test* sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM (naive n=4, T. cruzi gesamt n= 20) dargestellt.

A.



B.



C.

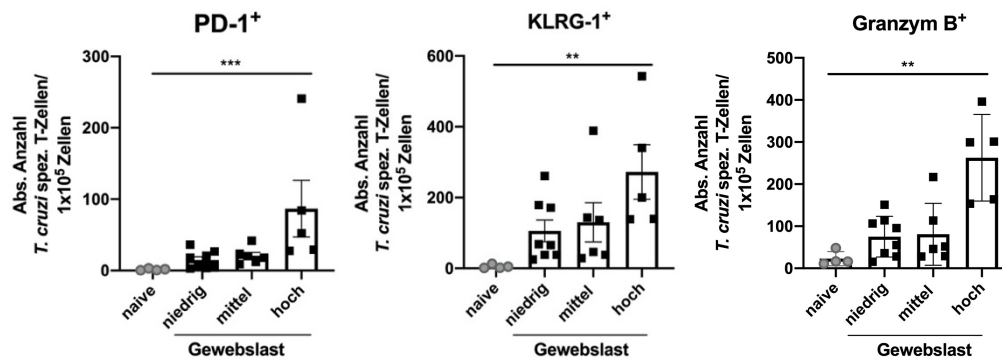


Abbildung 34: Analyse der TSKB20⁺ T-Zellen aus dem Muskel in der späten chronischen Phase der Infektion mit *T. cruzi*.

(A) Anzahl *T. cruzi* spezifischer T-Zellen in Abhängigkeit von der Parasitämie. (B) Eine repräsentative Färbung für die Ko-Expression von PD-1 und KLRG1. (C) Expression von PD-1, KLRG1 und Granzym B in Abhängigkeit von der Parasitämie. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengetragen und wurden mit dem *Kruskal-Wallis-Test* sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (naive n=4, *T. cruzi* gesamt n= 20) dargestellt.

Für diese Stimulation der T-Zellen aus dem Muskel von infizierten Mäusen wurden zuerst die Milzzellen aus einer naiven Thy1.1-kongen C57BL/6 Maus isoliert und mit *T. cruzi* Lysat *in vitro* inkubiert. Die Zellen aus der Milz enthielten einen geeigneten Anteil an APZ, um somit die T-Zellen aus dem Muskel besser zu stimulieren. In diesem Versuchsaufbau wird ausgenutzt, dass die Zellen einer Thy1.1 kongen C57BL/6 CD45.1 exprimieren, wohingegen Zellen einer Wildtyp C57BL/6 Maus CD45.2 exprimieren. Somit können hier die naiven CD45.1 Milzzellen von den CD45.2 CD8⁺ T-zellen aus infizierten Mäusen mittels Antikörper diskriminiert werden. Die CD8⁺ T-Zellen waren zu 28 % PD-1⁺ und zu 21% TOX⁺ (Abbildung 35 A). Wie in der repräsentativen Färbung zu sehen ist, ist die Ko-Expression von PD-1 und TOX auf CD8⁺ T_{eff} Zellen deutlich (Abbildung 35 B). Bei der Untersuchung von IFN- γ , TNF- α und Granzym B zeigte sich, dass alle TOX⁺ T-Zellen in ihrer Fähigkeit, pro-inflammatorischer Zytokine und zytotoxische Granula nach der Stimulation zu produzieren, eingeschränkt waren (Abbildung 35 C).

Zusammenfassend zeigten die Experimente in der späten chronischen Phase, dass eine sehr lange Infektion durchaus zu dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen führen kann, die durch die hohe Expression des koinhibitorischen Moleküls PD-1 gekennzeichnet waren und den Transkriptionsfaktor TOX ko-exprimierten. Dieser scheint daher auch in diesem Model eine entscheidende Rolle bei der Generierung und Aufrechterhaltung des erschöpften Phänotyps von CD8⁺ T-Zellen zu spielen. Die CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD27⁻PD-1⁺TOX⁺ muskelfiltrierenden T-Zellen üben dennoch eine Kontrolle über die Parasitämie aus. Doch ob es sich um ein optimiertes Gleichgewicht handelt, welches sich im Verlauf der chronischen Infektion einstellt oder eher der Beginn eines Verlustes der Pathogenkontrolle darstellt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

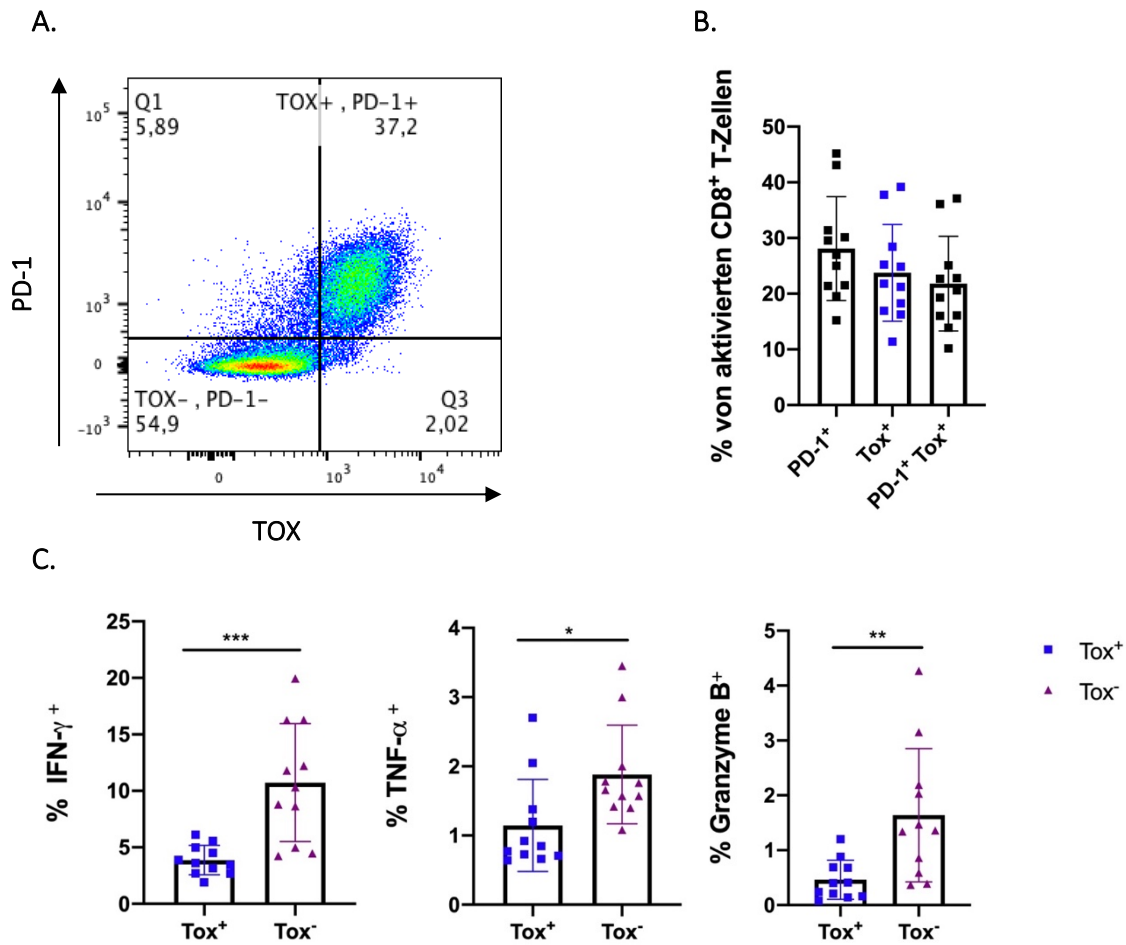


Abbildung 35: Funktionelle Analyse von PD-1⁺ Tox⁺ T_{eff} aus der Muskel.

(A) Eine repräsentative Färbung für die Ko-Expression von PD-1 und des Transkriptionsfaktors TOX auf CD8⁺ T_{eff} Zellen (B) Die Ko-Expression von PD-1 und TOX wurde quantifiziert und als Frequenz von CD8⁺ T_{eff} Zellen angegeben. (C) Die CD8⁺ T_{eff} Zellen wurden mit *T. cruzi* Lysat stimuliert, um die Funktionalität zu untersuchen. IFN- γ , TNF- α und Granzym B wurden intrazellulär gefärbt. Zu sehen ist, dass die TOX⁺ CD8⁺ T_{eff} Zellen hoch signifikant weniger IFN- γ produzieren und auch signifikant weniger TNF- α und Granzym B. Die Daten stammen aus einem Experiment und wurden mit dem *Kruskal-Wallis-Test* sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (*T. cruzi* infiziert gesamt n= 11) dargestellt.

4.9 Analyse des Zytokinprofils

Zytokine sind wichtige Signalstoffe in der interzellulären Kommunikation und sie sind die wichtigsten Signalmoleküle des Immunsystems. Neue Methoden erlauben die Messung von "Zytokinprofilen". Die Infektion mit *T. cruzi* ist hinsichtlich der Immunaktivierung durch zwei völlig unterschiedliche Phasen gekennzeichnet, die akute und die chronische Phase, so dass es möglich ist, eine Untersuchung über die Änderung des systemischen Zytokinprofils durchzuführen. Um das in dieser Arbeit neu etablierte Mausmodell weiter zu charakterisieren und die dynamische Natur der Zytokinexpression während des Verlaufs der Infektion mit *T. cruzi* genauer zu beschreiben, wurden 15 Zytokine aus den Mäuseseren untersucht (vgl.3.4.5.). Dies erfolgte parallel zu der Untersuchung des T-Zellphänotyps und der Parasitenlast in den Organen an sechs verschiedenen Zeitpunkten. Als Kontrollen wurden gleichaltrige naive Mäuse in der "naiven" Gruppe zusammengefasst und analysiert. Es ist wichtig hervorzuheben, dass es zu keiner alterungsbedingten erhöhten Zytokinexpression kam, da die Gruppe der naiven Mäuse eine geringe Streuung der Messwerte bei den untersuchten Zytokinen aufwies. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-6 werden in Entzündungsprozessen als diagnostische Marker gemessen, denn sie gelten als pro-inflammatorische Schlüsselzytokine und werden sehr früh nach der Aktivierung des Immunsystems sezerniert.

Während der *T. cruzi* Infektion ist IFN- γ über den gesamten Infektionsverlauf stark erhöht. Es steigt hoch signifikant um zwei Log-Stufen in der akuten Phase am Tag 15 p.i. im Vergleich zu den naiven Kontrollen von im Mittel 10 pg/mL bei den infizierten Mäusen auf über 1000 pg/mL und bleibt konstant hoch auf diesem Niveau. Nur am Tag 250 p.i. ist eine kleine Abnahme zu verzeichnen. An Tag 800 p.i. werden die höchsten Werte für IFN- γ gemessen. Die Analyse von TNF- α zeigt ein sehr ähnliches Bild. Es steigt hoch signifikant in der akuten Phase der Infektion an Tag 15 p.i. und Tag 30 p.i. und bleibt erhöht, allerdings anders als IFN- γ mit einem Trend zur Abnahme an Tag 60, 100 und 250 p.i. Auch wie bei IFN- γ werden an Tag 800 p.i. die höchsten Konzentrationen an TNF- α gemessen und der Unterschied zu den naiven Kontrollen ist zu diesem Zeitpunkt auch hochsignifikant. TNF- α ist ein klassischer Marker chronischer

Entzündungsprozesse und wird mit der Entwicklung einer Herzerkrankung bei Chagas Patienten assoziiert [101]. Interleukin-6 (IL-6) ist ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin. Es wird nach Aktivierung von Makrophagen freigesetzt, aber auch von neutrophilen Granulozyten [102]. IL-6 wird kann auch von Endothelzellen und somatischen Zellen wie Fibroblasten nach einer Schädigung (wie Gewebeerstörung) ausgeschüttet. Während der Infektion ist es deutlich erhöht. In der akuten Phase an Tag 15 ist es signifikant erhöht, aber es wird nicht konstant auf diesem hohen Niveau sekretiert, denn die Konzentration schwankt zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten. Am Tag 60 zeigt sich eine Streuung: einige Tiere weisen sehr hohen Werte auf, aber andere zeigen kein IL-6. Somit ist der Unterschied zu den naiven nicht signifikant. An Tag 100 p.i. und Tag 800 p.i. ist der Unterschied zu den naiven Kontrollen signifikant. Schließlich wurde IL-2 untersucht und zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet, denn es ist ein lebenswichtiger Faktor für T-Zellen. Es fördert die T-Zellproliferation und die Differenzierung zu T_{eff} , sichert das Überleben und die optimale Funktion von Gedächtniszellen T_{mem} und regulatorischen T-Zellen. An Tag 15 p.i. ist IL-2 erhöht, aber nicht signifikant zu den naiven Kontrollen. Erst an Tag 30, am Ende der akuten Phase, ist es signifikant erhöht und im weiteren Verlauf bleibt es erhöht, jedoch mit starken Schwankungen. Die Zytokine Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin-4 (IL-4) spielen eine noch bisher umstrittene Rolle während der *T. cruzi* Infektion. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, dennoch wird eine erhöhte IL-10 Konzentration im Serum mit fibrotischen Veränderungen und einer kardiovaskulären Erkrankung assoziiert [103]. Bei der Analyse von IL-10 zeigt sich eine starke Erhöhung a Tag 15 p.i. und diese war im Vergleich zu den naiven Kontrollen signifikant war. Im Verlauf der Infektion blieb der IL-10 Spiegel erhöht bis zu Tag 30 p.i. Ab Beginn der chronischen Phase, an Tag 60 p.i., war eine Abnahme von IL-10 zu verzeichnen. Auch im weiteren Verlauf der chronischen Phase an Tag 100 und 250 p.i. nahm die Konzentration von IL-10 weiter ab. Am Tag 800 p.i. jedoch wurde ein starker Anstieg gemessen und dieser war verglichen zu Tag 250 signifikant.

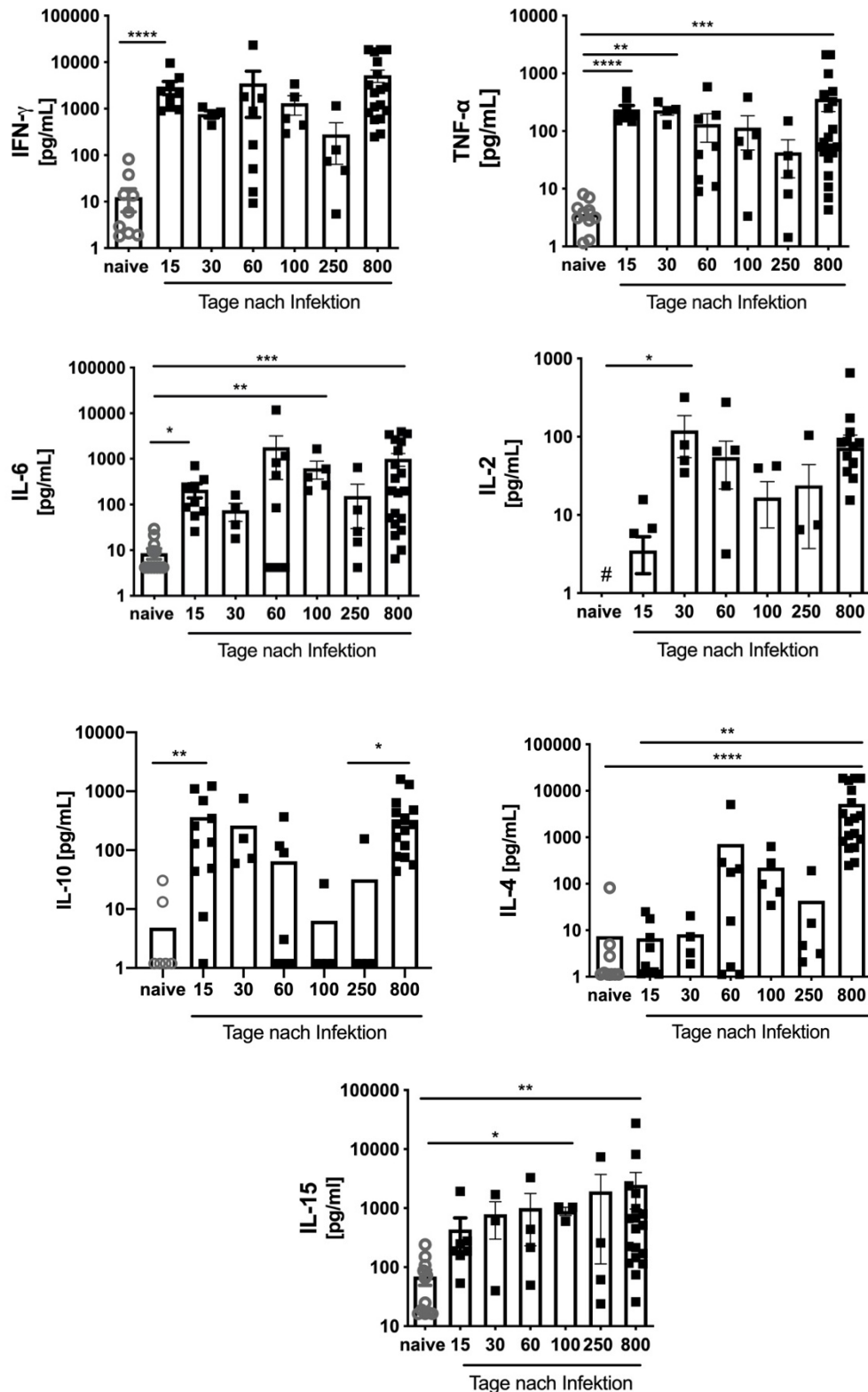


Abbildung 36: Analyse von Zytokinen im Serum im Verlauf der Infektion mit *T. cruzi*.

Analyse von systemischen Zytokinen im Serum über den Verlauf der Infektion mit *T. cruzi*. Die Daten von acht unabhängigen Experimenten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test sowie *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Insgesamt wurden $n = 63$ Mäuse eingesetzt; Naive Kontrollen = 13; Akute Phase Tag 15 $n = 9$ (aus zwei unabhängigen Experimenten) und Tag 30 $n = 4$; chronisch Tag 60 $n = 8$ (aus zwei unabhängigen Experimenten); Tag 100 $n = 4$, Tag 250 = 5 und spät chronisch Tag 800 $n = 20$. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

IL-4 wurde auch in Patienten mit kardialer Fibrose und Herzinsuffizienz gefunden und dieser Zustand wurde mit einer veränderten Polarisierung der Makrophagen im Herzen hin zum M2-Typ assoziiert [104]. Daher war es wichtig die Konzentration von IL-4 besonders in der späten chronischen Phase zu ermitteln. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Induktion von IL-4 zu den späteren Zeitpunkten in der Infektion mit *T. cruzi*. Während der akuten Phase unterscheidet sich die IL-4 Konzentration im Serum nicht von den naiven Mäusen. Wohingegen an Tag 60 p.i. (frühe chronische Phase) vermehrt IL-4 gemessen wurde und obwohl während des Weiteren Verlaufs, an Tag 100 und Tag 250 p.i., die IL-4 Konzentration schwankt, bleibt es leicht erhöht. Schließlich wurde an Tag 800 eine hoch signifikante Erhöhung der IL-4 Konzentration im Serum messbar.

Interleukin-15 (IL-15) ist ein pleiotropes Zytokin mit einem breiten Spektrum biologischer Funktionen, welches je nach Kontext als entzündlich oder auch anti-inflammatorisch wirken kann [105, 106]. IL-15 wird von einer Vielzahl somatischer Zellen unter homöostatischen, als auch unter pathologischen Umständen sekretiert [107, 108] und über die Rolle in der *T. cruzi* Infektion ist wenig bekannt. Es spielt eine übergeordnete Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen und NK-Zellen und somit moduliert es Immunzellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Die Untersuchung von IL-15 im Serum zeigte eine leichte Erhöhung nach der Infektion an Tag 15 im Vergleich zu den naiven Kontrollen und im weiteren Verlauf der chronischen Infektion nahm es im Trend stetig zu. An Tag 100 p.i. war die Konzentration von IL-15 signifikant höher als bei den naiven Kontrollen und auch in der späten chronischen Phase war IL-15 signifikant erhöht.

5 Diskussion

Die Infektion mit dem intrazellulären Protozoen-Parasiten *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) ist komplex, da *T. cruzi* ein vielschichtiger Erreger ist, der im Wirtsorganismus lebenslang persistieren kann. Die *T. cruzi*-Wirts-Interaktion ist immunologisch hoch interessant, da die Kontrolle der Infektion hauptsächlich durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen gewährleistet wird. CD8⁺ T-Zellen sind potentiell in der Lage, alle infizierten Zellen zu erkennen und anschließend erfolgreich zu eliminieren. Obwohl die Antwort der CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase stark genug ist, um eine ungehinderte Ausbreitung und Proliferation des Parasiten entgegenzuwirken, ist sie unzureichend, um eine vollständige Eliminierung von allen *T. cruzi* infizierten Zellen zu gewährleisten [20]. Dadurch überleben *T. cruzi* Parasiten im Gewebe und verursachen eine chronische Infektion. Diese Chronizität beeinträchtigt in 30 % der Fälle die Gesundheit der Infizierten stark und führt zur Entstehung der Chagas-Krankheit, welche unter anderem durch die Entwicklung einer Herzerkrankung ausgezeichnet ist [109]. Um eine dauerhafte Schädigung des Wirts durch die Immunreaktion zu vermeiden, müssen CD8⁺ T-Zellen in ihrer Funktion negativ reguliert werden [110]. Da die Expression von koinhibitorischen Molekülen auf T-Zellen einer der Mechanismen ist, der T-Zellen in ihre Funktion hemmt und somit die Immunhomöostase sicherstellt, war das Ziel dieser Arbeit eine detaillierte Charakterisierung des koinhibitorischen Molekülprofils auf CD8⁺ T-Zellen während der Infektion mit *T. cruzi*. Einerseits sorgt die negative Regulation der CD8⁺ T-Zellen für ein Gleichgewicht zwischen dem Schutz des Wirts ohne dabei eine Immunpathologie auszulösen, andererseits könnte sie die Fähigkeit der CD8⁺ T-Zellen so stark einschränken, dass eine vollständige Eliminierung der Parasiten verhindert wird. Darüber hinaus könnte eine negative Regulation von CD8⁺ T-Zellen durch koinhibitorischen Moleküle während der chronischen Phase der *T. cruzi* Infektion wesentlich zum Krankheitsverlauf beitragen, wenn dies zum Verlust der effizienten Kontrolle der Parasitämie führt. Es ist auch noch zu klären, ob die CD8⁺ T-Zellen an der Entwicklung und dem Fortschreiten der Chagas-Krankheit beteiligt sind.

Zu diesem Zweck musste zuerst ein Mausmodell etabliert werden, welches die Untersuchung der akuten und chronischen Phase der *T. cruzi* Infektion ermöglichte.

5.1 Das Mausmodell

Für die Untersuchung der Infektion mit *T. cruzi* gibt es keine standardisierten Modelle. Das bedeutet, dass viele unterschiedliche Tierspezies aber auch unterschiedliche Stämme von *T. cruzi* Parasiten für die Infektion genutzt werden. Darüber hinaus gibt es auch keinen Konsens über standardisierte Infektionsrouten (intra-peritoneal, intra-venös, subkutan, oral, kongenital), noch über die Bewertungsparameter, um die Infektion und ihre pathologischen Folgen zu charakterisieren [111, 112]. Für diese Arbeit wurde ein Modell etabliert, das auf der intra-peritonealen Infektion von weiblichen C57BL/6 Mäusen mit *T. cruzi* Trypomastigoten des Stammes *Brazil* in Vollblut basiert (DTU I) [8, 113].

Die Infektion der Maus hat eine hohe biologische Relevanz, da *Mus Musculus* neben 150 anderen Säugetierarten einen natürlichen Wirt für *T. cruzi* darstellt [15].

Bei der natürlichen Infektion, wird die metazyklische Form des Parasiten durch Triatomine Wanzen übertragen, wodurch die Induktion einer Immunreaktion in der Haut erfolgt. Allerdings bevorzugt die Mehrheit der Forschungsgruppen eine intra-peritoneale Infektion, da diese unter Verwendung von weniger virulenter Parasitenstämmen und niedriger Inokula des Parasiten, auch eine geringere Letalität verursacht [111].

Deswegen wurde in dieser Arbeit die intra-peritoneale Infektionsmethode mit einer geringen Infektionsdosis von 2×10^3 Trypomastigoten durchgeführt. Ab eine Dosis von 1×10^4 Parasiten war die Infektion mit *T. cruzi Brazil* letal und die Tiere mussten zwischen Tag 24 und Tag 30 erlöst werden. Die Verwendung des Stammes *T. cruzi Tulahuen* (DTU IIe) [114] wurde ebenfalls getestet, führte aber in den meisten Fällen zu letalen Verläufen in der akuten Phase. Die akute Infektion mit *T. cruzi Brazil* war charakterisiert durch hohe Parasitenlast im Gewebe und verlief, wie auch beim Menschen, asymptomatisch. Das bedeutet, dass es zu keiner starken Gewichtsveränderung kam und eine akute Erkrankung weitestgehend vermieden wurde. Die Parasitämie wurde innerhalb von 30 Tagen erfolgreich kontrolliert. Diese Ergebnisse reproduzieren die Infektionsverläufe von anderen Forschungsgruppen [42, 115]. Die frühe chronische Infektion (bis Tag 250) zeichnete sich durch eine zuverlässige Kontrolle der Parasitenlast im Gewebe aus, welche aber in einigen Mäuse bis Tag 800 verloren ging.

Im Verlauf der gesamten Infektion fand eine starke systemische Inflammation statt, welches durch die Untersuchung der Zytokine im Serum deutlich wurde. Das hier beschriebene murine Modell wurde bis 800 Tage nach der Infektion charakterisiert und zeigte weder einen Verlust der Herzleistung, noch eine pathologische Herzvergrößerung oder Herzschäden anderer Art. Das hier etablierte Mausmodell zeigt einen asymptomatischen Verlauf der chronischen Infektion. Die Modellierung der Chagas-Krankheit mit Hilfe von Mäusen bleibt eine Herausforderung, aber es ist für die Untersuchung der Faktoren, die zu einer Herzerkrankung führen trotzdem von größter Bedeutung, um zu verstehen welche Faktoren eine Pathologie auslösen. In Mausmodellen bleibt insgesamt unklar, ob die sehr langen chronischen Infektionsverläufe die bei Menschen zu beobachten sind und zu einer Verschlechterung der Immunantwort gegen *T. cruzi* führen, in der kürzeren Lebensspanne der Mäuse reproduzierbar sind [42, 116]. Darüber hinaus ist bisher unzureichend untersucht, ob das Geschlecht die Entstehung der Herzerkrankungen beeinflusst. Obwohl es weder experimentell noch in humanen Studien klare Beweise für geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, konnte gezeigt werden, dass es bei männlichen Mäusen zu erhöhten pathologischen Veränderungen bis hin zu Myokard-Schäden kommt [117]. Eine sehr interessante experimentelle Studie ging der Frage nach, warum weibliche Mäuse resistenter gegen eine *T. cruzi* Infektion sind als männliche Mäuse [118]. Dieser Unterschied basiert, so die Ergebnisse ihrer Studie, auf hormonellen Unterschieden. Die Autoren verzichteten allerdings auf eine *in vivo* Infektion. Stattdessen verabreichten sie rekombinant hergestellte *T. cruzi* trans-Sialidasen und untersuchten den Thymus der Mäuse. Sie konnten zeigen, dass allein das Verabreichen von trans-Sialidasen ausreichend ist, um die Entwicklung des T-Zellkompartiments im Thymus zu stören und dass es zu überlebenswichtigen Glykosylierungsunterschieden in den T-Zellen kommt. Diese Glykosylierungsunterschiede stehen in Abhängigkeit mit Androgen-Rezeptoren im Thymus. Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass diese Veränderung in der Glykosylierung für den Tod der Thymozyten verantwortlich ist. Es ist vorstellbar, dass es in einer chronischen Infektion von männlichen Mäusen zu einem stärkeren Verlust von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten gegen *T. cruzi* kommen könnte. Die Konsequenz

wäre der Verlust der Parasitenkontrolle, einer stärkeren Inflammation und anschließender Herzerkrankung.

Zusätzlich zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden zeigte sich bei Studien, eine hohe Prävalenz von Komorbiditäten bei Chagas-Patienten, welche vermutlich auf das fortgeschrittenen Alter zurückzuführen sind [119, 120]. Um das Mausmodell zu verbessern, sollten daher zusätzliche Punkte in der Untersuchung aufgenommen werden. Dies würde die Situation im Menschen besser modellieren können. Insbesondere sollten lange chronische Infektionen angestrebt werden. Dazu sollten heterogene Bedingungen, welche additiv oder synergistisch wirken können, wie die o.g. Geschlechter-Unterschiede, ko-Infektionen und auch das Mikrobiom im Betracht gezogen werden. Denn das Wechselspiel zwischen der kommensalen Mikrobiota und der Entwicklung, des Immunsystems sind eng mit einander verbunden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms vielfältige Auswirkungen auf die Homöostase und die Entwicklung von Krankheiten haben können und auch einen starken Einfluss auf Immun-Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren ausübt [50, 121, 122]. Darüber hinaus sollte bei der weiteren Charakterisierung des Modells eine Erfassung molekularer Veränderungen auf transkriptioneller und ggf. der Proteinebene mittels Sequenzierungstechniken angestrebt werden. Es gibt Studien, die die Grenzen von Mausmodellen aufzeigen und für eine umfassende molekulare Charakterisierung zur Validierung von Mausmodellen plädieren. So zeigten *Seok et al.*, dass akute inflammatorische Prozesse unterschiedlicher Ätiologien zu sehr unterschiedlichen Antworten zwischen der humanen Erkrankung und den entsprechenden Mausmodellen führen können [123]. In Mausmodellen gewonnene Erkenntnisse können zwar zu der Identifizierung von Schlüssel-Signalwegen beitragen, die an der Entwicklung der Chagas-Krankheit beteiligt sind, aber nur der direkte Vergleich mit klinisch gut charakterisierten Patienten-Kohorten kann aufzeigen, ob das Mausmodell der Situation im Menschen entspricht.

5.2 Die Persistenz

Die Parasitenlast im Gewebe wurde mittels qPCR nachgewiesen. *T. cruzi* ist in der akuten Phase der Infektion ubiquitär zu finden und während der chronischen Phase stark eingeschränkt im Gewebe-Reservoir verteilt. Lange Zeit wurden die Gewebe-

Präferenzen, die zu einer heterogenen Belastung in unterschiedlichen Gewebetypen führen, als ein Merkmal der vielen *T. cruzi* Stämme beschrieben. So wurden z.B. einige Stämme als myotrop und andere als reticulotrop bezeichnet [124]. Durch die Entwicklung von hochempfindlichen Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren durch *Lewis et al.* konnte 2014 gezeigt werden, dass unabhängig von der DTU Zugehörigkeit des *T. cruzi* Stammes, der Skelettmuskel das Gewebe der Persistenz ist [91]. Das Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren basiert auf genetisch veränderte *T. cruzi* Parasiten, die bei metabolischer Aktivität eine Luciferase exprimieren, die das Gewebe durchdringt. Diese Technik erlaubt eine Verfolgung der Infektion über sehr lange Zeiträume ohne die Tiere opfern zu müssen. Die Fortschritte in der Empfindlichkeit und Genauigkeit dieser Bildgebungstechnik haben in jüngster Zeit das Verständnis der quantitativen, räumlichen und zeitlichen Variation von *T. cruzi* Infektionen in der Maus erheblich erweitert [125]. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell zeigte eine breite Verteilung der Parasiten in allen untersuchten Geweben am Tag 15, die den Höhepunkt der Parasitämie markierte. Eine drastische Reduktion der Parasiten fand zwischen Tag 30 und Tag 60 statt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Muskel während der chronischen Infektion als Hauptparasitenreservoir dient und dass eine Depletion von CD8⁺ T-Zellen zu einer raschen Zunahme der Parasitämie in allen Geweben führt. Dies wurde ebenfalls kürzlich in einer Studie von *Pack et al.* mit dem hier verwendeten *Brazil* Stamm gezeigt [42].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das für diese Arbeit etablierte Mausmodell sehr gut die Infektionsdynamik reproduziert, die mit anderen Techniken beschrieben wurde und dass es geeignet ist, die zurzeit wichtigste Frage in der *T. cruzi* Forschung zu untersuchen: Warum überlebt *T. cruzi* bei murinen Infektionsmodellen bevorzugt in Muskelzellen? Denn nur diese bleiben langfristig infiziert (Quelle). Ob *T. cruzi* in der Lage ist, die Muskelzelle zu modulieren, um adaptiven Immunantworten auszuweichen oder ob der Muskel *per se* tolerogen ist und eine schützende immunologische Mikroumgebung darstellt wird später diskutiert. Das Überleben von *T. cruzi* im Muskelreservoir ist von entscheidender Bedeutung, da die kumulative parasitäre Belastung über die lange Zeit, die Intensität der lokalen Entzündungsreaktion bestimmt. Letztendlich ist noch nicht ausreichend geklärt, ob die Entzündungsreaktion mit der Schädigung der Gewebe und der Entwicklung der Pathologie zusammenhängt.

Es gibt derzeit keine ausreichenden Daten, um das Langzeitreservoir beim Menschen zu definieren. Die qPCR aus dem Blut von Patienten in der chronischen Phase wird als diagnostischen Test und als Gold Standard bei den klinischen Studien zum Monitoring des Therapie-Erfolgs eingesetzt. Die Limitationen der qPCR für diese Anwendungen sind groß. Auch wenn die qPCR immer noch der sensitivste Test ist, um *T. cruzi* in einer biologischen Probe nachzuweisen, muss in Betracht gezogen werden, dass der Nachweis von Parasiten DNA durch die sehr spärliche Verteilung im Gewebe in der chronischen Phase erschwert wird. *T. cruzi* Parasiten sind obligat intrazelluläre Erreger und die Wahrscheinlichkeit freie Parasiten in der Zirkulation von Patienten zu finden ist sehr gering. Wenn die Ergebnisse von unserem Mausmodell und der Biolumineszenz-Bildgebung berücksichtigt werden, sind Amastigoten-Nester nicht nur sehr selten zu finden, sondern auch zum Teil höchst unterschiedlich. Manche Amastigoten-Nester innerhalb einer Muskelzelle können hunderte Amastigoten beinhalten, andere nur sehr wenige. Dies kann zu der zufälligen Testung von nicht repräsentativem Gewebe führen. Somit bleibt die qPCR eine wertvolle Technik, um die Parasitenlast vor allem bei experimentellen Forschungsarbeiten zu verfolgen, aber sie ist immer einer hohen Variabilität ausgesetzt. Dies könnte durch die Proben-Entnahme aus verschiedenen anatomischen Lokalisationen verbessert werden.

Es ist außerdem zu erwähnen, dass es zu keiner Persistenz von *T. cruzi* im Herzen der Mäuse kam. Auch 800 Tage nach Infektion konnten dort keine Parasiten nachgewiesen werden. Es gibt viele Studien über tödliche Verläufe durch Herzinsuffizienz, in denen auch keine Amastigoten-Nester oder nur sehr wenige Parasiten in den Herz-Läsionen bei der chronischen Myokarditis gefunden wurden [17]. Die Hypothese von wiederholten wellenförmigen Reinvationen in das Herz, würde die Entstehung einer Herzpathologie beim Menschen besser erklären. Die Biolumineszenz-Bildgebung schlägt ein Modell eben dieser wellenförmigen Verteilung von Parasiten in der Maus vor [16]. Die Parasiten werden in dem Muskel freigesetzt, verteilen sich durch alle Organe, hauptsächlich Herz und Darm, und werden innerhalb von wenige Tage dort erfolgreich eliminiert. Auch in dem hier etablierten Modell wurde eine Schwankung der Parasitämie über die Zeit festgestellt und könnte durch diese Dynamik erklärt werden. Wie die Parasiten im Reservoir die Pathogenese an entfernten Stellen wie dem Herzen beeinflussen bleibt aber eine wichtige Frage.

5.3 Die Untersuchung der T-Zellantwort und der Expression von koinhibitorischen Molekülen

Die persistente Infektion mit *T. cruzi* ist eine Herausforderung für das Immunsystem. Die Ursache für die Persistenz der Parasiten ist noch geklärt worden. Bei Modellen von chronischen Virusinfektionen wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen phänotypische Veränderungen durchlaufen, die mit einer progressiven Zunahme und ko-Expression von koinhibitorischen Molekülen gekennzeichnet ist und das dies zu Erschöpfung oder Dysfunktionalität führt. Dies bedeutet, dass wichtige T-Zellfunktionen wie Zytotoxizität (Ausschüttung von Granula und Granzyme B), Proliferation, sowie die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und IL-2 verloren gehen kann [26, 126]. Daher war das Ziel dieser Arbeit, ein murines Model zu etablieren, um die Regulation der Immunantwort bei der chronischen Infektion mit *T. cruzi* zu untersuchen. Dabei lag der Schwerpunkt auf den immunmodulatorischen Eigenschaften von ko-inhibitorischen Molekülen auf T-Zellen und der Frage wie diese den funktionellen Status von CD8⁺ T-Zellen während der *T. cruzi* Infektion bestimmen. Obwohl es keine endgültige Definition und Marker-Kombination gibt, um erschöpfte T-Zellen zu beschreiben, ist eine ko-Expression von PD-1, LAG3 und Tim-3 umfassend beschrieben worden [61, 127]. Die Hypothese, dass die ko-Expression von mehreren koinhibitorischen Molekülen auf CD8⁺ T-Zellen, ein natürlicher Mechanismus ist, um eine Immunpathologie zu vermeiden, konnte nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde deutlich gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und dem Muskel, in der akuten Phase der Infektion hochwirksam sind und durch die Expression mehrerer koinhibitorischer Moleküle nicht gekennzeichnet sind. Zunächst zeigten die Ergebnisse, dass die Entwicklung von der T-Zellantwort in den infizierten Mäusen langsam verläuft und das sich die Antwort der CD8⁺ T-Zellen auf ein immundominantes Epitop der trans-Sialidase, TSKB20 konzentriert [90]. Zudem wurde die Induktion von einzelnen koinhibitorischen Molekülen wie PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen oder Tim-3 auf CD8⁺ T-Zellen gefunden. Die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen könnte auch als ein Aktivierungsmarker interpretiert werden [49]. Lag-3 wurde nicht besonders stark induziert und konnte nicht in Kombination mit anderen Markern gefunden werden, die wichtige regulatorische T-Zellpopulationen charakterisieren. Die von *Galiani et al.* beschriebene

Tr1 T-Zellen [59] konnten in der *T. cruzi* Infektion zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Tim-3 blieb somit als koinhibitorisches Molekül mit der stärksten Expression übrig. Tim-3 wurde zuerst beschrieben als ein koinhibitorisches Molekül, das spezifisch auf differenzierten IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird und durch die Bindung an Liganden wie Galectin-9, T-Zellen in die Apoptose führt [65, 128]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Tim-3 die am stärksten erschöpften oder dysfunktionalen T-Zellen markiert, die bei chronischen Virusinfektionen wie HIV oder bei Krebs auftreten [26, 129]. Die Expression Tim-3, in akutem Zustand, kann aber auch das Ergebnis einer starken Aktivierung sein [69, 130, 131]. Avery *et al.* haben gezeigt, dass Tim-3 teilweise eine kostimulatorische Funktion ausübt, indem es die Signale in der immunologischen Synapse verstärkt. Es wird vermutet, dass zu starke Aktivierung durch den TCR und eine übermäßige CD8⁺ T-Effektorantwort, die Bildung des T-Zellgedächtnisses stört und Tim-3 auf diese Weise zur T-Zell-Erschöpfung beiträgt [71]. Obwohl die Blockade von Tim-3 sich in anderen Modellen als vielversprechend erwies, um die T-Zellantwort zu verstärken und deren Funktionalität wiederherzustellen [36, 72, 132], führte die Blockade dieses Moleküls in der akuten Phase der Infektion mit *T. cruzi* nur zu einer moderaten und nicht signifikanten Veränderung der Parasitenlast im Muskel. Die Tatsache, dass die Tim-3 Blockade zu einer Zunahme der Gewebslast in der Milz führte, könnte an Effekten liegen, die eine Tim-3 Blockade auf Zellen des angeborenen Immunsystems ausübt. Tim-3 ist auf sehr vielen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems exprimiert. Insbesondere auf Makrophagen, wo gezeigt wurde, dass eine Tim-3 Blockade zu einer Erhöhung ihrer Anzahl und Aktivierung führt [133]. Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass eine Tim-3 Blockade, stark aktivierte Makrophagen, die bereits viele Parasiten eliminiert haben in der Milz akkumulieren lässt. Somit könnte ein Nachweis der Gewebslast mittels qPCR nach der Blockade eine höhere Last anzeigen, obwohl diese Parasiten nicht mehr vital sind. Um dies zu verifizieren sind weitere Experimente notwendig.

Die Abnahme von PD-1 und Tim-3 am Ende der akuten Phase (ab Tag 30 p.i.) kann als ein Zeichen für eine abklingende T-Zellantwort gegen *T. cruzi* gedeutet werden. In dem Übergang von der akuten zu der chronischen Phase, nimmt die Antigenmenge stark ab, da die chronische Infektion mit einer sehr niedrigen Parasitämie verbunden ist. Die

Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen also der Hypothese, dass eine vollständige Eliminierung von *T. cruzi* durch eine zu stark regulierte T-Zellantwort verhindert wird. Auch wenn bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion eine stark verminderte Sekretion von IFN- γ und TNF- α beobachtet wurde, kann nicht gefolgert werden, dass diese T-Zellen in ihrer Effektorfunktion komplett gehemmt waren, da die Parasitenproliferation erfolgreich kontrolliert wurde. Die Persistenz von *T. cruzi* in den infizierten Mäusen ist somit nicht das Resultat einer zu starken negativen Regulation oder von dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen. Die hier gezeigten Daten liefern keinen Hinweis für Einschränkung der Funktion von CD8⁺ T-Zellen aufgrund von koinhibitorischen Molekülen in der akuten Phase der *T. cruzi* Infektion.

Die Untersuchung der frühen chronischen Phase zeigte, dass CD8⁺ T-Zellen entscheidend für die langfristige Kontrolle der *T. cruzi* Infektion sind. CD8⁺ T-Zellen zeigten in chronisch infizierten Mäusen bis Tag 250 keine Expression von koinhibitorischen Molekülen. Auch bei langfristigen Infektionsverläufen kontrollierte eine Population von aktivierten CD8⁺CD44⁺ KLRG-1⁺CD69⁺ T-Zellen in dem Gewebe der Persistenz, also dem Muskel, die Ausbreitung der Parasiten. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Depletion von CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase, zu einer stark zunehmenden Parasitenlast führte. Das bedeutet das CD8⁺ T-Zellen während der gesamten Infektion im Muskel hoch funktionell bleiben. Die CD8⁺ T-Zellen im Muskel zu untersuchen ist höchst relevant, da es der Ort ist wo über sehr lange Zeiträume die Antigen-Exposition am höchste ist, was maßgeblich zu der Erschöpfung der T-Zellen beitragen könnte. 800 Tage nach Infektion wurde in diese Arbeit erstmalig gezeigt, dass ein Teil der aktivierten CD8⁺ T-Zellen in dem Muskel PD-1 und den Transkriptionsfaktor TOX exprimierten. TOX ist ein vor kurzem beschriebener Transkriptionsfaktor, der die T-Zell-Erschöpfung epigenetisch festlegt [30, 31, 134]. Nach der spezifischen Restimulation diese T-Zellen mit *T. cruzi* Lysat konnte gezeigt werden, dass PD-1⁺TOX⁺CD8⁺ T-Zellen erschöpft sind und einen weisen Verlust an Effektorfunktionen aufweisen. So produzierten TOX⁺ T-Zellen weit weniger Granzym B, IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu den TOX⁻ T-Zellen. Die Entstehung dieser T-Zellen mit einem erschöpften Phänotyp ist also eher das Ergebnis der Parasitenpersistenz und nicht deren Ursache. Diese Hypothese wird stark unterstützt von neueste Studien die zeigen konnten, dass eine Erhöhung MHC-I Expression in den Muskeln von Mäusen zu einer verstärkten CD8⁺

T-Zell vermittelten Reduktion der Gewebslast führt. Die längere Überexpression von MHC I führte jedoch zu einem Verlust der Parasitenkontrolle und zu einem massiven Auftreten von erschöpften PD-1⁺ T-Zellen [135].

Die hier gezeigten Daten beweisen, dass eine sehr lange chronische Infektion mit *T. cruzi* auch im Mausmodell, zu einem Verlust der Funktion von CD8⁺ T-Zellen führen kann. Darüber hinaus exprimieren diese T-Zellen zwar nur eines der koinhibitorischen Moleküle, nämlich PD-1, aber sind durch die ko-Expression von TOX als erschöpfte Zellen determiniert oder aber sie an die Situation der chronischen Infektion angepasst und weisen nur noch die nötige Funktionalität auf, um den Erreger zu kontrollieren ohne den Wirt zu schaden [110]. Ob diese T-Zellen den Transkriptionsfaktor TCF-1 aufweisen und damit Stammzeleigenschaften hätten bleibt noch zu untersuchen [32, 33].

5.4 Analyse des Zytokinprofils

Durch die *T. cruzi* Infektion wurde eine starke systemische Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen ausgelöst. Über den gesamten Verlauf der Infektion blieb IFN- γ erhöht. IFN- γ spielt eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von *T. cruzi*. In IFN- γ defizienten Mäusen verläuft die *T. cruzi* Infektion, auch mit einem wenig virulenter Stamm, letal [136]. Ein erhöhter IFN- γ polarisiert die Immunantwort in Richtung einer Differenzierung zu T_H1-T-Zellen. Sie spielt eine Hauptrolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene durch Aktivierung von Makrophagen und Differenzierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, die essenziell für die Eliminierung von *T. cruzi* sind. Makrophagen erhöhen die Antigenpräsentation, produzieren Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffradikale, sowie stickstoffabhängige mikrobizide Abwehrsysteme. Schließlich produzieren durch IFN- γ aktivierte Makrophagen mehr TNF- α . Eine robuste Immunantwort von IFN- γ produzierenden CD4⁺ T Zellen ist nötig, um eine Replikation des Parasiten zu kontrollieren und der Verlust dieses Zytokin führt auch zu einem Verlust dieser protektiven Mechanismen. Dieses zeigen Studien an Chagas-Patienten, die eine HIV Ko-Infektion haben oder einer Immunsuppression ausgesetzt waren [137-139]. Ob die NK-Zellen, welche eine wichtige Quelle von IFN- γ bei der *T. cruzi* Infektion sind [140], über so lange Zeit IFN- γ produzieren muss noch untersucht werden. Auch die pathologischen Effekte von chronisch erhöhten IFN- γ Spiegeln, wie sie in infizierten

Muskelgeweben vorkommen, sind noch ungeklärt. Das IFN- γ eine Zytokin-vermittelte Entzündung herbeiführt ist von Chagas-Patienten bekannt und eine Assoziation mit der Herzpathologie wurde bereits beschrieben [139, 141].

Patienten mit einen geringen IL-10 und einen erhöhten ein IFN- γ Spiegel im Serum entwickelten schwerere chronische Verläufe. IL-10 in Kombination mit IL-4 wird scheint ein protektiver Faktor gegen die Chagas-Kardiomyopathie zu sein, während in Patienten mit viel IFN- γ und TNF- α das Risiko einer Progression der Erkrankung besteht [85, 142].

TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen sezerniert und in geringen Mengen auch von T_H1-Helferzellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Es führt zu einer starken Endothelaktivierung durch Induktion von Adhäsionsmolekülen und Intensivierung der lokalen Entzündung. Bei vielen chronischen Entzündungszuständen induziert TNF- α Kachexie, also den Verlust von Muskelmasse durch katabole Vorgänge.

IL-2 wird auch stark durch die *T. cruzi* Infektion induziert und bleibt über den gesamten Verlauf der Infektion erhöht. In einer Entzündungsreaktion hat IL-2 wichtige Funktionen. Es ist ein potenter Induktor der T-Zellproliferation und T-Zelldifferenzierung und ist unentbehrlich für das Überleben und der optimalen Funktion von Gedächtniszellen [99]. IL-2 spielt aber auch eine wichtige regulatorische Rolle, da es die Entwicklung, das Überleben und die Funktion von regulatorischen T-Zellen steuert [143]. Somit trägt IL-2 in seiner doppelten und gegensätzlichen Funktion sowohl zur Induktion als auch zur Beendigung von Immunantworten bei. Da es aber über den gesamten Verlauf der Infektion zu einer permanente T-Zellaktivierung kommt, war eine erhöhte IL-2 Menge nicht unerwartet.

Das interessanteste Zytokin in dem Kontext der Infektion mit *T. cruzi* ist IL-15. Es wird ebenfalls durch die Infektion stark induziert und bleibt auf einem sehr hohen Niveau während des gesamten Verlaufs der Infektion. IL-15 erfüllt mehrere Funktionen, wie das Überleben von T-Zellen und die Aktivierung von NK-Zellen, die beide essenzielle Zelltypen sind für eine robuste Immunantwort gegen *T. cruzi* [106, 144]. Ungeklärt bleibt die Frage, wer die großen Mengen an IL-15 produziert. Eine neue Studie von *Wu et al.* hat gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen bei chronischen viralen Infektionen funktionell beeinträchtigt sind oder sich erschöpfen und dass dieses Phänomen von einem

unerwünschten Muskelmassenverlust begleitet wird. Das Muskelgewebe IL-15 produziert ist bereits bekannt [107]. Allerdings zeigen die Autoren, dass die Produktion des muskulären IL-15 die Erschöpfung der T-Zellen regulieren kann. Muskeln produzierten IL-15, um eine Population von CD8⁺ T-Zellen in dem Muskel zu unterstützen und das der Muskel eine von Entzündung geschützte Mikroumgebung darstellt. *Wu et al* haben gezeigt, dass die CD8⁺ T-Zellen im Muskel (MILs) TCF-1 exprimierten und ein höheres proliferatives Potenzial als T-Zellen in anderen sekundären Lymphatischen Organen, wie zum Beispiel der Milz hatten. Bei Bedarf treten MILs wieder in das lymphatische Gewebe ein und differenzieren sich zu funktionellen T-Effektorzellen. Die Autoren postulieren, dass die muskelspezifische IL-15 Produktion der Erschöpfung von T-Zellen entgegenwirkt, indem es das proliferative Potenzial der T-Zellen vor Entzündungen schützt und das T-Zellkompartiment in lymphatischen Organen wieder auffüllt [108]. In dem Kontext der *T. cruzi* Infektion tritt die T-Zell-Erschöpfung sehr spät ein. Die CD8⁺ T-Zellen sind trotz persistenter chronischer Infektion voll funktionell und in der Lage die Parasitenreplikation zu kontrollieren. Die Parasiten haben ihre Nische in dem Muskel und dort findet ständig eine Präsentation von Antigen statt. Ob der Muskel in der chronischen Infektion IL-15 vermehrt produziert, um einem Abbau durch TNF- α entgegen zu wirken und welche Auswirkungen IL-15 auf die T-Zellantwort in der *T. cruzi* Infektion hat sollte aufbauend auf die Ergebnisse diese Arbeit weiter untersucht werden.

Insgesamt ist das in dieser Arbeit etablierte Modell hervorragend dazu geeignet, um die Persistenzmechanismen im Muskel zu untersuchen, während die pathologischen Vorgänge im Herzen bisher nicht denen im Menschen entsprechen. Die Persistenz scheint nicht Folge einer Dysfunktionalität der CD8⁺ T-Zellen zu sein. Diese sind vielmehr in der Lage die Parasitämie sehr effizient zu kontrollieren. Allerdings entziehen sich einige wenige Parasiten im Muskel aus bisher ungeklärten Ursachen dieser Kontrolle. Die Entschlüsselung dieser Mechanismen birgt das Potential für neue Immuntherapien, um die Menge der persistierenden Parasiten im Muskel weiter zu verringern oder sie gar vollständig zu eliminieren.

6 Anhang

Tabelle 12: Verlauf des Gewichts während der Infektion mit *T. cruzi*.

Die quantitative Übersicht zeigt in Abbildung 1 zusammengefasste Daten von 12 Zeitpunkten aus 4 unabhängigen Experimenten. Dabei wurden nicht infizierte Tiere mit grünen Kreisen und infizierte Tiere mit schwarzen Kreisen dargestellt. Jeder Kreis repräsentiert der Mittelwert \pm SEM aus der Anzahl an Mäuse, welche in der Tabelle aufgeführt sind.

Tag	<i>T. cruzi</i> infizierte Tiere	naive Kontrollen
0	24	6
7	24	6
15	24	6
21	20	5
28	20	5
30	16	4
38	16	4
43	16	4
50	16	4
57	12	3
60	12	3
200	24	5
800	24	5

7 Literaturverzeichnis

1. Stevens, J.R., Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*, 2008. **15**(3): p. 226-232.
2. Lucius, R., B. Loos-Frank, and R.P. Lane, *Biologie von Parasiten*. Vol. 3. 2018: Springer Spektrum. XVII, 546.
3. 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**: p. 1051-1054.
4. Zingales, B., *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 2018. **184**: p. 38-52.
5. Falla, A., et al., Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica*, 2009. **110**(1): p. 15-21.
6. Westenberger, S.J., et al., Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 2005. **171**(2): p. 527-543.
7. Hurles, M., Gene Duplication: The Genomic Trade in Spare Parts. *PLOS Biology*, 2004. **2**(7): p. e206.
8. Minning, T.A., et al., Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization. *BMC Genomics*, 2011. **12**: p. 139-139.
9. Llewellyn, M.S., et al., *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2009. **3**(9): p. e510.
10. Coura, J.R. and J. Borges-Pereira, Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*, 2010. **115**(1-2): p. 5-13.
11. Hotez, P.J., et al., The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS neglected tropical diseases*, 2008. **2**(9): p. e300-e300.

12. Requena-Mendez, A., et al., Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014. **8**(10): p. e3245.
13. Basile, L., et al., Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill*, 2011. **16**(37).
14. Strasen, J., Williams, T., Ertl, G. et al., Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol* 2014. **103**(1): p. 1-10.
15. Bern, C., Chagas' Disease. *New Engl J Med*, 2015. **373**(5): p. 456-466.
16. Lewis, M.D. and J.M. Kelly, Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. *Trends Parasitol*, 2016. **32**(11): p. 899-911.
17. Nunes, M.C.P., et al., Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013. **62**(9): p. 767-776.
18. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, Chagas disease. *The Lancet*, 2010. **375**(9723): p. 1388-1402.
19. Medei, E.H., et al., Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2008. **91**(4): p. 257-286.
20. Tarleton, R., CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin. Immunopathol.*, 2015. **37**(3): p. 233-238.
21. Cardillo, F., et al., Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*, 2015. **73**(9): p. ftv082.
22. L. Rink, A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2012: Spektrum Akademischer Verlag. 318.
23. Taniuchi, I., CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018. **36**(1): p. 579-601.
24. Rubinstein, M.P., et al., IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3704-3712.
25. K.Murphy, *Janeway's Immunobiology* 8th ed. 2011.
26. Kuchroo, V.K., A.C. Anderson, and C. Petrovas, Coinhibitory receptors and CD8 T cell exhaustion in chronic infections. *Curr Opin HIV AIDS*, 2014. **9**(5): p. 439-45.
27. Wherry, E.J., T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 492-499.
28. Pauken, K.E. and E.J. Wherry, Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.*, 2015. **36**(4): p. 265-276.

29. Speiser, D.E., et al., T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat. Rev. Immunol.*, 2014. **14**: p. 768+.
30. Alfei, F., et al., TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*, 2019. **571**(7764): p. 265-269.
31. Chihara, N., et al., Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature*, 2018. **558**(7710): p. 454-459.
32. Wang, Y., et al., The Transcription Factor TCF1 Preserves the Effector Function of Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection. *Front Immunol.*, 2019. **10**: p. 169-169.
33. Delpoux, A., et al., FOXO1 opposition of CD8⁺ T cell effector programming confers early memory properties and phenotypic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017: p. 201618916.
34. Utzschneider, D.T., et al., T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat. Immunol.*, 2013. **14**(6): p. 603-610.
35. Gigley, J.P., et al., T Cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol.*, 2012. **28**(9): p. 377-384.
36. Kurtulus, S., et al., Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1⁺CD8⁺ Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity*, 2019. **50**(1): p. 181-194 e6.
37. Sakuishi, K., et al., Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*, 2010. **207**(10): p. 2187-94.
38. Lasso, P., et al., Inhibitory Receptor Expression on CD8⁺ T Cells Is Linked to Functional Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol.*, 2015. **195**(8): p. 3748-3758.
39. Laucella, S.A., et al., Frequency of Interferon- γ -Producing T Cells Specific for *Trypanosoma cruzi* Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease. *J. Infect. Dis.*, 2004. **189**(5): p. 909-918.
40. Albareda, M.C., et al., *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*, 2006. **18**(3): p. 465-71.

41. Albareda, M.C., et al., Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. **7**(12): p. e2575.
42. Pack, A.D., et al., Highly competent, non-exhausted CD8⁺ T cells continue to tightly control pathogen load throughout chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathog*, 2018. **14**(11): p. e1007410.
43. Mateus, J., et al., An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Front. Immunol.*, 2019. **10**: p. 918-918.
44. Deaglio, S., et al., Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
45. Burnstock, G. and J.-M. Boeynaems, Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signalling*, 2014. **10**(4): p. 529-564.
46. Gupta, P.K., et al., CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8⁺ T Cells. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(10): p. e1005177.
47. Takenaka, M.C., S. Robson, and F.J. Quintana, Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends in Immunology*, 2016. **37**(7): p. 427-439.
48. Sharpe, A.H. and K.E. Pauken, The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(3): p. 153-167.
49. Brown, K.E., et al., Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr. Opin. Immunol*, 2010. **22**(3): p. 397-401.
50. Young, A., Z. Quandt, and J.A. Bluestone, The Balancing Act between Cancer Immunity and Autoimmunity in Response to Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.*, 2018. **6**(12): p. 1445-1452.
51. Koyama, S., et al., Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun*, 2016. **7**.
52. Kakavand, H., et al., PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes define different subsets of MAPK inhibitor treated melanoma patients. *Clin Cancer Res*, 2015.

53. Fourcade, J., et al., Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med*, 2010. **207**(10): p. 2175-86.
54. Mackroth, M.S., et al., Acute Malaria Induces PD1+CTLA4+ Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function. *PLoS pathogens*, 2016. **12**(11): p. e1005909-e1005909.
55. Gutierrez, F.R.S., et al., Regulation of Trypanosoma cruzi-Induced Myocarditis by Programmed Death Cell Receptor 1. *Infect. Immun*, 2011. **79**(5): p. 1873-1881.
56. Fonseca, R., et al., Programmed Cell Death Protein 1-PDL1 Interaction Prevents Heart Damage in Chronic Trypanosoma cruzi Infection. *Front. Immunol.*, 2018. **9**: p. 997-997.
57. Durham, N.M., et al., Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) Modulates the Ability of CD4 T-cells to Be Suppressed In Vivo. *PLOS ONE*, 2014. **9**(11): p. e109080.
58. Vignali, D.A.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-532.
59. Gagliani, N., et al., Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med*, 2013. **19**(6): p. 739-746.
60. Maruhashi, T., et al., LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat. Immunol.*, 2018. **19**(12): p. 1415-1426.
61. Joller, N. and V.K. Kuchroo, Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017. **410**: p. 127-156.
62. Blackburn, S.D., et al., Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.*, 2009. **10**(1): p. 29-37.
63. Woo, S.-R., et al., Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Research*, 2012. **72**(4): p. 917-927.
64. Butler, N.S., et al., Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat. Immunol.*, 2011. **13**: p. 188.

65. Hastings, W.D., et al., TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.*, 2009. **39**(9): p. 2492-2501.
66. Zhu, C., et al., An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6072.
67. Meyers, J.H., et al., The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol. Med.*, 2005. **11**(8): p. 362-369.
68. Li, S., et al., TIM-3 Genetic Variations Affect Susceptibility to Osteoarthritis by Interfering with Interferon Gamma in CD4+ T Cells. *Inflammation*, 2015. **38**(5): p. 1857-1863.
69. Rangachari, M., et al., Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med*, 2012. **18**(9): p. 1394-400.
70. Ji, J., et al., Long non-coding RNA Lnc-Tim3 exacerbates CD8 T cell exhaustion via binding to Tim-3 and inducing nuclear translocation of Bat3 in HCC. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(5): p. 478.
71. Avery, L., et al., Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2018. **115**(10): p. 2455-2460.
72. Fourcade, J., et al., PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8(+) T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Res*, 2014. **74**(4): p. 1045-55.
73. Chen, B.J., et al., The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2019. **10**(21): p. 2030-2040.
74. Zhou, Q., et al., Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2011. **117**(17): p. 4501-10.
75. Golden-Mason, L., et al., Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*, 2009. **83**(18): p. 9122-30.
76. Sada-Ovalle, I., et al., Tim-3 blocking rescue macrophage and T cell function against Mycobacterium tuberculosis infection in HIV+ patients. *J Int AIDS Soc.*, 2015; **18**

77. Schwartz, J.A., et al., Tim-3 is a Marker of Plasmacytoid Dendritic Cell Dysfunction during HIV Infection and Is Associated with the Recruitment of IRF7 and p85 into Lysosomes and with the Submembrane Displacement of TLR9. *J Immunol*, 2017. **198**(8): p. 3181-3194.
78. Birge, R.B., et al., Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*, 2016. **23**(6): p. 962-78.
79. Weber, J.K. and R. Zhou, Phosphatidylserine-Induced Conformational Modulation of Immune Cell Exhaustion-Associated Receptor TIM3. *Sci. Rep.*, 2017. **7**(1): p. 13579.
80. He, Y., et al., TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 7005-7009.
81. Angeletti, D., et al., Elevated levels of high-mobility group box-1 (HMGB1) in patients with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2013. **88**(4): p. 733-735.
82. Mendonça Gorgulho, C., et al., Chapter Eleven - Different measures of HMGB1 location in cancer immunology, in *Methods in Enzymology*, L. Galluzzi and N.-P. Rudqvist, Editors. 2019, Academic Press. p. 195-217.
83. Bianchi, M.E., et al., High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol. Rev.*, 2017. **280**(1): p. 74-82.
84. Martin, D.L., et al., TGF- β regulates pathology but not tissue CD8⁺ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(10): p. 2764-2771.
85. Sousa, G.R., et al., Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. *PLOS ONE*, 2014. **9**(3): p. e87082.
86. Cribb, P., et al., *Trypanosoma cruzi* High Mobility Group B (TcHMGB) can act as an inflammatory mediator on mammalian cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017. **11**(2): p. e0005350.
87. Huang, Y.H., et al., CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*, 2015. **517**(7534): p. 386-90.

88. Sabatos-Peyton, C.A., et al., Blockade of Tim-3 binding to phosphatidylserine and CEACAM1 is a shared feature of anti-Tim-3 antibodies that have functional efficacy. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(2): p. e1385690.
89. Berrocal Almanza, L.C., et al., Tim-3 is differently expressed in genetically susceptible C57BL/6 and resistant BALB/c mice during oral infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2013. **3**(3): p. 211-21.
90. Martin, D.L., et al., CD8+ T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Are Highly Focused on Strain-Variant trans-Sialidase Epitopes. *PLOS Pathogens*, 2006. **2**(8): p. e77.
91. Lewis, M.D., et al., Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell. Microbiol.*, 2014. **16**(9): p. 1285-1300.
92. Cummings, K.L. and R.L. Tarleton, Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003. **129**(1): p. 53-59.
93. Seiringer, P., et al., Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2017. **88**(3): p. 225-232.
94. Pan, S.C.-t., Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization in vitro and in vivo. *Bulletin of the World Health Organization*, 1982. **60**(1): p. 101-107.
95. Grote-Gálvez, R.I., Charakterisierung von CD39 und C73 im Verlauf der experimentellen Malaria. 2014, Masterarbeit, Universität Hamburg und Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. p. 86.
96. Herndler-Brandstetter, D., et al., KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. *Immunity*, 2018. **48**(4): p. 716-729.e8.
97. Henson, S.M. and A.N. Akbar, KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 2009. **31**(4): p. 285-291.
98. Greenberg, S.A., et al., Co-inhibitory T cell receptor KLRG1: human cancer expression and efficacy of neutralization in murine cancer models. *Oncotarget*, 2019. **10**(14): p. 1399-1406.

99. Martin, M.D. and V.P. Badovinac, Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol*, 2018. **9**(2692).
100. Beltra, J.-C., et al., Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*, 2020. **52**(5): p. 825-841.e8.
101. Lannes-Vieira, J., et al., TNF-alpha and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol*, 2011. **691**: p. 221-30.
102. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Ann Rev Immunol*, 2015. **33**(1): p. 643-675.
103. Yilmaz, M.I., et al., The relationship between IL-10 levels and cardiovascular vents in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014. **9**(7): p. 1207-1216.
104. Peng, H., et al., Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension*, 2015. **66**(3): p. 582-589.
105. Waldmann, T.A., The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(8): p. 595-601.
106. Patidar, M., N. Yadav, and S.K. Dalai, Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016. **31**: p. 49-59.
107. Pérez-López, A., et al., Skeletal muscle IL-15/IL-15R α and myofibrillar protein synthesis after resistance exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 2018. **28**(1): p. 116-125.
108. Wu, J., et al., Skeletal muscle antagonizes antiviral CD8+ T cell exhaustion. *Sci Adv*, 2020. **6**(24): p. eaba3458.
109. Álvarez-Hernández, D.A., et al., Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de México*, 2018. **81**(3): p. 154-164.
110. Blank, C.U., et al., Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(11): p. 665-674.
111. Chatelain, E. and I. Scandale, Animal models of Chagas disease and their translational value to drug development. *Expert Opin Drug Discov*, 2020: p. 1-22.

112. Chatelain, E. and N. Konar, Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Dev and Ther*, 2015. **9**: p. 4807-4823.
113. Pan, S.C., Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization in vitro and in vivo. *Bulletin of the World Health Organization*, 1982. **60**(1): p. 101-107.
114. Cariola, J., et al., [Susceptibility of the hamster and *Peromyscus* to experimental *Trypanosoma cruzi* infection (Tulahuén strain)]. *Boletín de informaciones parasitarias chilenas*, 1950. **5**(4): p. 44-45.
115. Bustamante, J.M., L.M. Bixby, and R.L. Tarleton, Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med*, 2008. **14**(5): p. 542-550.
116. Perlman, R.L., Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health*, 2016. **2016**(1): p. 170-176.
117. Assunção, A.N., et al., Chagas' heart disease: gender differences in myocardial damage assessed by cardiovascular magnetic resonance. *Journal of Cardiovascular Magn Reson*, 2016. **18**(1): p. 88.
118. Mucci, J., et al., A Sexual Dimorphism in Intrathymic Sialylation Survey Is Revealed by the trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4545.
119. Lidani, K.C.F., et al., Clinical and epidemiological aspects of chronic Chagas disease from Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2020. **53**: p. e20200225.
120. Ezequiel José Zaidel, C.J.F., Gabriel Novick, Rachel Marcus, Antonio Luiz P. Ribeiro, María-Jesus Pinazo, Carlos A. Morillo, Luis Eduardo Echeverría, Maria Aparecida Shikanai-Yasuda, Pierre Buekens, Pablo Perel, Sheba K. Meymandi, Kate Ralston, Fausto Pinto, Sergio Sosa-Estani, COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. *Glob Heart*, 15(1), 69., 2020.
121. Zheng, D., T. Liwinski, and E. Elinav, Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*, 2020. **30**(6): p. 492-506.
122. Tanoue, T., et al., A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti cancer immunity. *Nature*, 2019. **565**(7741): p. 600-605.

123. Seok, J., et al., Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
124. Brenière, S.F., E. Waleckx, and C. Barnabé, Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016. **10**(8): p. e0004792-e0004792.
125. Pérez-Mazliah, D., A.I. Ward, and M.D. Lewis, Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. *Parasite Immunol*, 2020: p. e12786.
126. Gorman, J.V., et al., Tim-3 directly enhances CD8 T cell responses to acute *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2014. **192**(7): p. 3133-42.
127. Anderson, Ana C., N. Joller, and Vijay K. Kuchroo, Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 2016. **44**(5): p. 989-1004.
128. Zhu, C., et al., The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
129. Leclerc, M., et al., Regulation of antitumour CD8 T-cell immunity and checkpoint blockade immunotherapy by Neuropilin-1. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3345.
130. Ferris, R.L., B. Lu, and L.P. Kane, Too much of a good thing? Tim-3 and TCR Signaling in T cell exhaustion. *J Immunol*, 2014. **193**(4): p. 1525-1530.
131. Du, W., et al., TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3).
132. Jin, H.T., et al., Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(33): p. 14733-8.
133. Monney, L., et al., Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 2002. **415**(6871): p. 536-41.
134. Khan, O., et al., TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature*, 2019. **571**(7764): p. 211-218.
135. Pack, A.D. and R.L. Tarleton, Cutting Edge: Augmenting Muscle MHC Expression Enhances Systemic Pathogen Control at the Expense of T Cell Exhaustion. *J Immunol*, 2020: p. ji2000218.
136. Marinho, C.R., et al., IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential

- for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(2-3): p. 297-308.
137. Bern, C., Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis*, 2012. **25**(4): p. 450-457.
138. Pérez-Molina, J.A., Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis*, 2014. **27**(1): p. 9-15.
139. Abel, L.C., et al., Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*, 2001. **17**(1): p. 99-107.
140. Lieke, T., et al., Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(2): p. 357-64.
141. Cunha-Neto, E. and C. Chevillard, Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators Inflamm*, 2014. **2014**: p. 11.
142. Chevillard, C., et al., Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol*, 2018. **9**(2791).
143. Banham, Powrie FM, and E. Suri-Payer, FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol*, 2006(36).
144. Leem, G., et al., IL-15 enhances anti-PD-1-induced reinvigoration of tumor infiltrating CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 2019. **202**(1 Supplement): p. 136.13.

Danksagung

Alle in meinen Leben bisher erreichten Ziele waren niemals eine einzelne Leistung. Darum ist es für mich das Schönste, Dank und Anerkennung all den Menschen zu zollen, die entscheidend zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei der Konrad-Adenauer-Stiftung für die Unterstützung und Förderung von ganzen Herzen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Lohn bedanken für die Betreuung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Thomas Jacobs bedanken, der mich seit wir uns begegnet sind, inspiriert. Thomas, mit deiner natürlichen Neugier, immer wieder Neues wissen zu wollen, motivierst du mich. Mit konstruktiver Kritik sowie viel Ermutigung hast du mich durch dieses herausfordernde Projekt getragen. Besonders danke ich dir, dass du mich stets meine eigenen Ideen umsetzen ließ.

Für die große und ständige Hilfsbereitschaft danke ich herzlichst **allen Labormitgliedern**, die in der AG Jacobs mit mir in diese Zeit gearbeitet haben. Ganz besonders danke ich meiner lieben Christiane Steeg, Ulli Richard, Julie Sellau, Rafael Freitas e Silva, Lidia Bosurgi, Imke Liebold und Nadine Stetter.

Die **Chagas-Ladies** (Cari Lehman und Jessica) danke ich, dass Sie die Begeisterung für dieses Thema mit mir teilen. Zutiefst danke ich Franziska Muscate (*Paulina, meine Ehren-Latina*), Catherine Fuentes Alvarado (*Mi Bebé*) und Sandy, weil ihr euer Leben mit mir teilt und für mich stets da seid.

Ein großer Dank geht an Carl Röthig für seinen Korrektureinsatz zur Rettung der deutschen Sprache.

Mein größter Dank geht an meine Familie, eine Zusammensetzung von außergewöhnlich großartigen Menschen, ohne die nichts in meinem Leben einen Sinn hätte. Ich danke euch für eure Geborgenheit, Fürsorge, Respekt, Freundschaft und Liebe: Meine Kinder Diego Elias (*Escobar*) & Lukas José (*Lu*) und ihrem Vater André (*Gi*), meine Schwester Nia (*La Chata*) und ihre „wilden Männer“: Torsten (*Toti*), Maxi (*Eier-Mann*) & Johannes (*Keule*), mein Bruder José Miguel (*La China*) und Jasmin (*Böshi*) sowie meine lieben Eltern Norma (*Momi*) und José Maria (*Popi*).

Mein letzter aber wichtigster Dank geht an Gott, denn sein Wort leuchtet mir dort, wo ich gehe; es ist ein Licht auf meinem Weg.