

**Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung Molekulare Infektiologie/Infektionsimmunologie  
Direktor: Prof. Dr. U. Schaible**

**Der Einfluss von IL-17 und der IL-27/35-Untereinheit EBI-3  
auf die Immunantwort in der Infektion mit  
*Trypanosoma cruzi***

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Sektion Medizin-**

**Vorgelegt von  
Caroline Anna Roßnagel  
aus Mannheim  
Lübeck, 2012**

1. Berichterstatter: Dr. rer. nat. Christoph Hölscher

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. Martin Kaiser

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2013**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.05.2013**

**-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> und das Immunsystem	1
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> - Erreger der Chagas-Krankheit	1
1.1.2 Das Immunsystem	4
1.1.3 Die Immunantwort in der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	7
1.2 Das Zytokin IL-17A	10
1.2.1 Struktur und Funktionsweise von IL-17A	10
1.2.2 Die Rolle von IL-17A in Autoimmun- und Infektionskrankheiten	11
1.2.3 IL-17A und die Zytokine der IL-12-Familie	13
1.3 Die Regulation einer inflammatorischen Immunantwort durch die EBI-3 tragenden Zytokine IL-27 und IL35	14
1.3.1 Das Zytokin IL-27	14
1.3.2 Das Zytokin IL-35	17
1.3.3 Die IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3	18
1.4 Fragestellung	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Software	21

2.1.3 Labormaterialien	22
2.1.4 Reagenzien	22
2.1.5 Medien	25
2.1.6 Puffer und Lösungen	25
2.1.7 Zytokine und Antikörper	27
2.1.8 Primer für molekularbiologische Untersuchungen	29
2.1.9 Labortiere	29
2.1.10 Parasitenstamm	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Infektion der Tiere	30
2.2.2 Bestimmung der Parasitämie	30
2.2.3 Bestimmung des Überlebens	30
2.2.4 Organentnahmen	30
2.2.5 Histopathologische und immunhistopathologische Untersuchungen	31
2.2.6 Molekularbiologische Untersuchungen	34
2.2.7 Herstellung von Einzellsuspensionen aus Geweben	36
2.2.8 Immunologische Untersuchungen	37
2.2.9 Bestimmung der Transaminasenkonzentration im Serum	41
2.2.10 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Die Bedeutung von IL-17A in der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	43
3.1.1 Die Auswirkung der Deletion von IL-17A auf Infektionsverlauf und Pathologie	43
3.1.2 Die Auswirkung der Deletion von IL-17A auf die Immunantwort	45
3.2 Die Bedeutung der IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 in der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	50
3.2.1 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die IL-17A-Produktion	51

3.2.2 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf Infektionsverlauf und Pathologie	53
3.2.3 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die Th1-Immunantwort	55
3.2.4 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die Th2-Immunantwort	60
4 Diskussion	66
4.1 Der Einfluss von IL-17A auf den Verlauf einer Infektion mit <i>T. cruzi</i>	66
4.1.1 Die Bedeutung von IL-17A für die Immunabwehr in der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	66
4.1.2 Der Einfluss von IL-17A auf die IFN $\gamma$ -Produktion während einer <i>T. cruzi</i> -Infektion	67
4.1.3 IL-17A und Neutrophile Granulozyten in der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	68
4.1.4 Der Einfluss von IL-17A auf Makrophageneffektorfunktionen	69
4.1.5 Die Rolle von IL-17A in der Entstehung der Leberpathologie	72
4.2 Der Einfluss von EBI-3 auf den Verlauf einer Infektion mit <i>T. cruzi</i>	74
4.2.1 Der Einfluss von EBI-3 auf die Th1- und Th17-Immunantwort nach der Infektion mit <i>T. cruzi</i>	75
4.2.2 Die Regulation der infektionsassoziierten Leberpathologie durch EBI-3	76
4.2.3 Der Einfluss von EBI-3 auf die Th2-Immunantwort und die Förderung des Parasitenwachstums in alternativ aktivierten Makrophagen	76
4.3 Mögliche therapeutische Ansatzpunkte	82
5 Zusammenfassung	84
Literaturverzeichnis	85
Danksagung	105
Erklärung	1066
Aufstellung der aus dieser Arbeit resultierenden Veröffentlichungen	1077

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Entwicklungszyklus von und Immunantwort gegen <i>T. cruzi</i>	9
<b>Abb. 2</b> Einfluss von IL-27 auf die Immunantwort in verschiedenen Krankheitsmodellen	16
<b>Abb. 3</b> Einfluss von EBI-3 auf die Immunantwort in verschiedenen Krankheitsmodellen	19
<b>Abb. 4</b> Reaktionsformeln der GOT- und GPT-Teststreifen	41
<b>Abb. 5</b> Parasitämie und Überlebensrate in <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen	43
<b>Abb. 6</b> Abschätzung des Leberschadens anhand der Transaminasenkonzentration im Serum von C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	44
<b>Abb. 7</b> Histologische Darstellung des Leberschadens von C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	45
<b>Abb. 8</b> TNF und IL-12/23p40-Konzentration im Serum von mit <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen	46
<b>Abb. 9</b> IFN $\gamma$ Konzentration im Serum von mit <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen	47
<b>Abb. 10</b> Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> -Th-Zellen in Milz und Leber von <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen	48
<b>Abb. 11</b> IFN $\gamma$ Sekretion in der Milz von C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	49
<b>Abb. 12</b> Produktion von <i>Irg47</i> und <i>nos2</i> in der Milz von C57Bl/6- und IL-17A <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	50
<b>Abb. 13</b> Frequenz IL-17A-produzierender CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> -Th-Zellen in Milz und Leber von <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	51
<b>Abb. 14</b> IL-17A-Sekretion in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	52
<b>Abb. 15</b> Parasitämie in <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	53
<b>Abb. 16</b> Abschätzung des Leberschadens anhand der Transaminasenkonzentration im Serum von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	54
<b>Abb. 17</b> Histologische Darstellung des Leberschadens von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	55
<b>Abb. 18</b> TNF- und IL-12/23p40-Konzentration im Serum von mit <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	56
<b>Abb. 19</b> IFN $\gamma$ -Konzentration im Serum von mit <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	57

<b>Abb. 20</b> Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> -Th-Zellen in Milz und Leber von <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	57
<b>Abb. 21</b> IFN $\gamma$ -Sekretion in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	58
<b>Abb. 22</b> Produktion von <i>Irg47</i> und <i>nos2</i> in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	59
<b>Abb. 23</b> Histologische Darstellung NOS2-enthaltender Zellen in Lebern von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	60
<b>Abb. 24</b> Frequenz IL4-produzierender CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> -Th-Zellen in Milz und Leber von <i>T. cruzi</i> -infizierten C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen	61
<b>Abb. 25</b> IL-4-Sekretion in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	62
<b>Abb. 26</b> Expression von <i>Arg-1</i> in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	63
<b>Abb. 27</b> Histologische Darstellung Arg-1-enthaltender Zellen in Milzen von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	64
<b>Abb. 28</b> Produktion von <i>ym1</i> und <i>fizz1</i> in der Milz von C57Bl/6- und EBI-3 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>T. cruzi</i>	65

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Immunhistologische Antikörper	27
<b>Tabelle 2</b> Antikörper zur Zellstimulation	27
<b>Tabelle 3</b> Standard für ELISA und CBA	27
<b>Tabelle 4</b> Antikörper für ELISA und CBA	28
<b>Tabelle 5</b> Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	28
<b>Tabelle 6</b> Primer für molekularbiologische Untersuchungen	29

## Abkürzungsverzeichnis

α-	anti-
μ	Mikro-(entspricht: 10 <sup>-6</sup> -fach)
-/-	defizient
+	positiv
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APZ	Antigen-Präsentierende-Zellen
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> ; destilliertes Wasser
Arg	Arginase
BALB/c	Immuninkompetenter Mausstamm
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL	Biologisches Sicherheitslabor
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
C57Bl/6	Immunkompetenter Mausstamm
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CIA	<i>Collagen-induced arthritis</i> (Kollagen induzierte Arthritis)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI-3	Epstein-Barr-Virus-induziertes-Gen-3
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i> (Transkriptionsfaktor für T <sub>reg</sub> )
FZB	Forschungszentrum Borstel
g	Gramm
GATA	Name einer Familie von Transkriptionsfaktoren
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
gp130	Glykoprotein 130
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde(n)
hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k	Kilo-(entspricht: 10 <sup>3</sup> -fach)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l	Liter
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LRG47	IFN $\gamma$ -induzierbare GTPase

m	Milli-(entspricht: 10 <sup>-3</sup> -fach)
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
<i>M. tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MHC	Haupt-( <i>Major</i> -)Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
n	nano (entspricht: 10 <sup>-9</sup> -fach)
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NKZ	Natürliche-Killerzelle
NO	Stickstoff
NOS2	Induzierbare Stickstoffsynthase 2
OVA	Ovalbumin
p	Piko-(entspricht: 10 <sup>-12</sup> -fach)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
R	Rezeptor
Rα	Rezeptor alpha
<i>Real time</i> RT-PCR	<i>real time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RORγt	<i>Retinoic acid receptor related Orphan Receptor γt</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T-bet	<i>T box expressed in T-cells</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	T-Helfer
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Units
u.a.	unter anderem
V. cava inferior	Vena cava inferior; untere Hohlvene
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WSX-1	IL-27-Rezeptoruntereinheit
xg	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

### 1.1 *Trypanosoma cruzi* und das Immunsystem

#### 1.1.1 *Trypanosoma cruzi*- Erreger der Chagas-Krankheit

*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* ist ein einzelliges, flagelliertes Protozoon und Auslöser der Chagas-Krankheit, einer der bedeutendsten Tropenparasitosen Süd- und Mittelamerikas. In Lateinamerika sind 15 Millionen Menschen infiziert und weitere 28 Millionen gefährdet, sich zu infizieren. Im Jahr 2006 starben 12 500 Menschen an den Folgen der Infektion mit *Trypanosoma (T.) cruzi* (Hotez et al. 2007; WHO/TDR 2007). Der erste Bericht über den Flagellaten erschien 1909. Hierin beschrieb Carlos Chagas den Parasiten, seinen Entwicklungszyklus und das Krankheitsbild der später nach ihm benannten Chagas-Krankheit (Chagas 1909). Das Protozoon *T. cruzi* gehört zur Familie der Trypanosomatida und zur Ordnung der Kinetoplastida (Mehlhorn und Armstrong 2001; World Health Organization 2002). Die Spezies *T. cruzi* ist sehr heterogen. Es existieren eine Vielzahl verschiedener Stämme, die sich zum Teil stark in ihrem regionalen Vorkommen, ihrem Hauptwirtsorganismus und ihrer Virulenz unterscheiden (Zingales et al. 1999; Buscaglia und Di Noia 2003; Rassi und Marin-Neto 2010).

#### Der Entwicklungszyklus von *T. cruzi*

Im Rahmen seiner Entwicklung durchläuft *T. cruzi* 2 Wirtssysteme: den Vektor und einen Säugetierwirt (Abb. 1). Als Vektor dient eine blutsaugende Raubwanze aus der Familie der Reduviidae, Subfamilie der Triatominae, die sowohl in der freien Wildnis als auch in urbanisierten Gegenden vorkommt. Die nachtaktive Wanze lebt bevorzugt in unverputzten, mit Stroh bedeckten Hütten der ärmeren Landbevölkerung, die gute Verstecke für den Tag bieten (Mehlhorn und Armstrong 2001; World Health Organization 2002). Während der Blutmahlzeit hinterlässt die Wanze Fäzes, der infektiöse metazyklische Trypomastigote *T. cruzi* enthält. Diese bewegliche Form der Parasiten dringt durch die Einstichstelle, über andere Hautläsionen oder direkt über die Schleimhaut in den Menschen- oder Säugetierwirt ein. Im Wirtsorganismus invadiert der Parasit Zellen, indem er von ihnen in parasitophore Vakuolen aufgenommen wird. Kurz nach der Aufnahme verlässt *T. cruzi* die Vakuole aktiv,

um sich im Zytoplasma der Zellen in abgerundeter, amastigoter Form zu replizieren. Sind genügend Amastigote vorhanden, wird der Untergang der Zelle induziert, wodurch die Parasiten frei werden, um benachbarte Zellen zu befallen oder über die Blutbahn in Form von Blut-Trypomastigoten in andere Organsysteme zu gelangen. Nimmt eine Wanze beim Blutsaugen Blut-Trypomastigote auf, wandeln sich diese in deren Verdauungstrakt zu Epimastigoten um. Diese vermehren sich im Enddarm der Wanze longitudinal. Einige der epimastigoten *T. cruzi* gelangen in das Rektum und werden in Form von metazyklischen Trypomastigoten bei der nächsten Defäkation ausgeschieden, um weitere Säugetierwirte zu infizieren (Tanowitz et al. 2000; Rassi und Marin-Neto 2010).

### **Die Chagas-Krankheit**

Während die Chagas-Krankheit früher vor allem die Menschen der ärmeren Landbevölkerung betraf, ist sie heute durch die allgemeine Landflucht auch in den Städten Lateinamerikas und durch zahlreiche Migrationswellen sogar in Europa und Nordamerika zu finden. Durch diese Entwicklung gewinnen andere Übertragungswege wie die Übertragung durch infizierte Blutkonserven oder Spenderorgane immer mehr an Bedeutung (Schmunis 1999). Des Weiteren ist auch eine kongenitale Übertragung von der Mutter auf das Neugeborene möglich (Machado et al. 2009).

Der klinische Verlauf der Chagas-Krankheit erfolgt in 3 Phasen. Die akute Phase beginnt 1-2 Wochen nach der Infektion und hält 4-8 Wochen an. Sie spiegelt eine durch den Parasiten ausgelöste Entzündungsreaktion wider, die sich an der Eintrittsstelle in Form einer Schwellung (Chagom) äußert. Breitet sich die Entzündungsreaktion systemisch aus, so treten weitere Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie oder generalisierte Ödeme hinzu. In vielen Fällen verläuft die akute Phase jedoch völlig asymptomatisch. Sie geht allerdings in jedem Fall mit einer sehr hohen Parasitämie einher, deren Detektion als diagnostisches Mittel genutzt wird. Selten treten schwere Komplikationen wie Meningoenzephalitis, Herzrhythmusstörungen oder Myokarditis auf, die schlimmstenfalls zum Tod führen (Tanowitz et al. 2000; World Health Organization 2002; Coura und Borges-Pereira 2010).

In der intermediären Phase fällt die Parasitämie 4-8 Wochen nach Infektion mit dem Anstieg der Antikörper gegen *T. cruzi* ab. Die Parasiten verschwinden aus der Blutbahn, persistieren

jedoch ein Leben lang als intrazelluläre Form in den Organen des Wirtes. Da Patienten in dieser Phase keine Symptome zeigen, kann die Diagnose ausschließlich durch die Detektion spezifischer, gegen *T. cruzi* gerichteter Immunglobulin (Ig)G-Antikörper, erfolgen (Silveira da et al. 2001; World Health Organization 2002; Coura und Borges-Pereira 2010).

Nur 20-40% der infizierten Personen entwickeln im Verlauf der Krankheit, häufig nach 10-30 Jahren, Symptome und gehen somit in die chronisch symptomatische Phase der Chagas-Krankheit über. Diese Phase ist geprägt durch die Destruktion autonomer Nervenganglien und Muskelzellen des Herzens und des Verdauungstraktes. Hieraus resultiert eine Muskelschwäche und eine Dilatation der betroffenen Organe. Es entstehen Megaviszera wie Megaösophagus oder Megakolon. Am Herzen äußert sich die Krankheit in Form einer dilatativen Kardiomyopathie oder durch Herzrhythmusstörungen. Aus diesen Pathologien heraus können schwerwiegende Komplikationen entstehen (Herzwandaneurysma, plötzlicher Herztod, Ösophagusruptur, Volvulus oder Ileus), die häufig die Notwendigkeit operativer Eingriffe mit sich bringen und in vielen Fällen nach einem langen Leidensweg zum Tod führen (Tanowitz et al. 2000; World Health Organization 2002; Coura und Borges-Pereira 2010).

Da sich die meisten Menschen schon im Kindesalter infizieren, weisen viele Patienten bereits im frühen Erwachsenenalter schwerwiegende Symptome auf. So sind in Endemiegebieten fast alle Fälle von Herzinsuffizienz vor dem 50. Lebensjahr auf eine Infektion mit *T. cruzi* zurückzuführen. Trotz der sinkenden Zahl an Neuerkrankungen von 700.000 (1990) auf 41.200 (2006), die durch großflächige Vektoreradikationsprogramme sowie verschärfte Kontrollen von Blutkonserven erreicht werden konnte (WHO/TDR 2007), stellen die durch die Chagas-Krankheit entstehenden hohen medizinischen Kosten, verbunden mit einer sehr frühen Arbeitsunfähigkeit der Patienten, in den betroffenen Ländern auch weiterhin ein großes wirtschaftliches sowie gesundheitsökonomisches Problem dar (Moncayo 2004). Durch die Globalisierung gewinnt die Chagas-Krankheit seit einigen Jahren auch in Europa, den USA, Australien und Japan zunehmend an Bedeutung. Die meisten medizinischen Einrichtungen haben keine Erfahrungen im Umgang mit dieser Krankheit und in vielen Ländern wird die Chagas-Krankheit noch nicht beim *Screening* von Blutkonserven oder Organtransplantaten beachtet (Schmunis 2007). Momentan existiert noch keine Impfung gegen *T. cruzi* und die einzigen bisher in Lateinamerika zugelassenen Medikamente

Benzonidazol und Nifurtimox zeigen nur in der akuten Phase befriedigende Ergebnisse, wobei der Therapieerfolg oft an mangelnder *Compliance* aufgrund komplizierter Darreichungsformen oder an zu starken Nebenwirkungen scheitert (Jannin und Villa 2007; Coura 2009; Rassi und Marin-Neto 2010). Der Mangel an adäquaten Medikamenten und Impfstoffen lässt sich dadurch erklären, dass noch keine abschließende Klarheit darüber besteht, welche Faktoren maßgeblich für die Entstehung und das Ausmaß der individuell stark variierenden Symptome verantwortlich sind. Es besteht noch keine Einigkeit darüber, ob der Gewebeschaden vornehmlich durch den Parasiten selbst oder durch eine überschießende Entzündungsreaktion hervorgerufen wird. Auch eine durch den Parasiten ausgelöste Bildung von Autoantikörpern wird als Ursache der Symptome diskutiert (Kierszenbaum 2005; Hyland und Engman 2006; Bonney und Engman 2008; Dutra und Gollob 2008).

### **1.1.2 Das Immunsystem**

Das Immunsystem eines jeden Organismus bildet die Basis für eine solide Verteidigung gegen diverse körperfremde Pathogene wie Bakterien, Viren oder Parasiten. Diese Verteidigung wird durch ein Netzwerk aus Immunzellen und löslichen Komponenten garantiert, die indirekt durch Botenstoffe oder direkt durch Zellkontakte miteinander interagieren und dadurch in der Lage sind, den Großteil aller Eindringlinge schnell und effektiv zu eliminieren, noch bevor diese ihre pathogene Funktion entfalten können.

Prinzipiell lässt sich die Immunantwort in Menschen und Säugetieren in eine frühe angeborene Immunantwort und eine etwas später einsetzende spezifische, erworbene (adaptive) Immunantwort unterteilen.

#### **Die angeborene Immunantwort**

Das angeborene Immunsystem ist darauf spezialisiert, Pathogene als körperfremd zu erkennen und diese sofort, jedoch relativ unspezifisch, zu bekämpfen. Gewebeständige Makrophagen sind als erste Zellen der angeborenen Immunantwort am Ort der Infektion. Sie erkennen den Eindringling als körperfremd und locken durch die Freisetzung von Botenstoffen weitere phagozytierende Zellen in das infizierte Gebiet. Zu den einwandernden Zellen gehören u.a. Neutrophile Granulozyten und im Blut flottierende Monozyten, die sich beim Verlassen der Blutbahn in Makrophagen oder Dendritische Zellen differenzieren. Diese

Zellen nehmen die Pathogene mittels Phagozytose auf und töten sie ab. In den Phagosomen erfolgt die Destruktion der Pathogene u.a. durch die Senkung des pH-Wertes oder durch die Fusion der Phagosomen mit Lysosomen, die pathogendestruierende Effektorenzyme enthalten (Tjelle et al. 2000; Ramachandra et al. 2009). Die enzymatische Bildung von reaktiven Stickstoff (NO)- oder Sauerstoffintermediaten befähigt diese Zellen dazu, sowohl intra-als auch extrazelluläre Keime abzutöten. Die Einzelteile der prozessierten Pathogene gelangen mit Hilfe von Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC) an die Oberfläche der phagozytierenden Zellen. Auf diese Weise können die aufgenommenen Pathogene den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert werden (Tjelle et al. 2000; Ramachandra et al. 2009). Auf Grund der Eigenschaft, Antigene zu präsentieren, werden Zellen wie Makrophagen und Dendritische Zellen unter dem Begriff der Antigen-Präsentierenden-Zellen (APZ) zusammengefasst. Zu der angeborenen Immunantwort gehören auch Natürliche-Killer-Zellen (NKZ). Sie werden von den Botenstoffen der APZ angelockt und sind sehr effizient in der Entfernung viral-infizierter oder maligne entarteter Zellen. Des Weiteren können NKZ schnell eine große Zahl an Botenstoffen freisetzen und damit weitere Entzündungszellen rekrutieren und aktivieren (Vivier et al. 2011). Durch die früh einsetzende angeborene Immunantwort können eine Vielzahl von eingedrungenen potentiellen Krankheitserregern direkt und ohne weitere Hilfe eliminiert werden. Allerdings haben manche Pathogene Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe sie dem angeborenen Immunsystem entgehen können (Dermine und Desjardins 1999; Tjelle et al. 2000). In diesem Fall reicht die angeborene Immunantwort nicht aus. Der infizierte Organismus benötigt eine spezifischere, genau auf dieses Antigen abgestimmte, so genannte erworbene Immunantwort. Die Zellen der erworbenen Immunantwort werden sowohl durch Zytokine als auch durch APZ aktiviert. Hierbei wandern vor allem Dendritische Zellen aus dem Infektionsgebiet in lymphatische Gewebe, um dort ihr aufgenommenes Pathogen einer Vielzahl von Zellen des erworbenen Immunsystems zu präsentieren (Murphy et al. 2009a; Chaplin 2010).

### **Die erworbene adaptive Immunantwort**

Zu den Zellen der erworbenen adaptiven Immunantwort gehören sowohl T- als auch B-Zellen, wobei die von aktivierten reifen B-Zellen (Plasmazellen) gebildeten Antikörper die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort bilden (Löffler et al. 1998c). T-Zellen

lassen sich wiederum anhand ihrer Oberflächenbestandteile, der *Cluster of Differentiation* (CD), in weitere Untergruppen einteilen. Zu den bedeutendsten T-Zellarten gehören CD4-positive-(<sup>+</sup>) T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Naive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen hauptsächlich viral befallene oder entartete Zellen und eliminieren diese in Form von aktivierten CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen. Aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können sich mehrere aktivierte T-Effektorzellen entwickeln, die unter dem Begriff T-Helfer-(Th)-Zellen zusammengefasst werden (Löffler et al. 1998c; Murphy et al. 2009b). Die Differenzierung zu reifen Th-Zellen erfolgt über mehrere Schritte: Zunächst flottieren naive CD4<sup>+</sup>-Zellen im Blut- und Lymphkreislauf und passieren dadurch täglich mehrere lymphatische Organe. Mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TZR) suchen die T-Zellen APZ nach passenden Antigenen ab. Hat eine naive T-Zelle ein passendes Antigen gefunden, so wird sie durch Interaktion ihres TZR mit dem MHC-II-Komplex der APZ aktiviert. Diese Interaktion wird durch das CD4 Molekül der T-Zelle stabilisiert (Murphy et al. 2009b). Kostimulatoren sichern das Überleben der sich differenzierenden Zellen und treiben deren Proliferation an. Zu den Kostimulatoren gehört u.a. das T-Zell-Oberflächenmolekül CD28 (Croft 1994; Murphy et al. 2009b). Die endgültige Differenzierung in die jeweilige T-Effektorzelle ist abhängig von der Anwesenheit spezifischer Zytokine.

In Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und Interferon (IFN) $\gamma$  differenzieren sich naive T-Zellen mit Hilfe des Transkriptionsfaktors T-bet (*T box expressed in T-cells*) in IFN $\gamma$ -produzierende Th1-Effektorzellen. Th1-Zellen aktivieren über IFN $\gamma$  Makrophagen und spielen vor allem in der Eliminierung intrazellulärer Pathogene, wie z.B. *T. cruzi* oder *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) eine wichtige Rolle. Gleichzeitig kann eine Überreaktion dieser Zellen starke Entzündungsreaktionen hervorrufen und damit dem eigenen Organismus schaden (Wan und Flavell 2009).

Dominiert das Zytokin IL-4, so erfolgt über die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 die Differenzierung zu IL-4-, IL-5- und IL-13-produzierenden Th2-Zellen. Diese regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an und aktivieren Mastzellen und eosinophile Granulozyten zur Bekämpfung von extrazellulären Parasiten. Eine überschießende Th2-Immunantwort kann jedoch auch starke allergische Reaktionen hervorrufen (Wan und Flavell 2009).

Überwiegen die Zytokine *Transforming Growth Factor* (TGF) $\beta$  und IL-6, so entstehen unter dem Einfluss von IL-23, über die Expression des Transkriptionsfaktors RoR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor related Orphan Receptor  $\gamma$ t*), Th17-Zellen. Diese bilden u.a. IL-17A, ein Zytokin, das vor allem als Auslöser vieler Autoimmunerkrankungen bekannt ist, gleichzeitig jedoch auch zur Eliminierung extrazellulärer Pathogene beiträgt (Basso et al. 2009; McGeachy und Cua 2008).

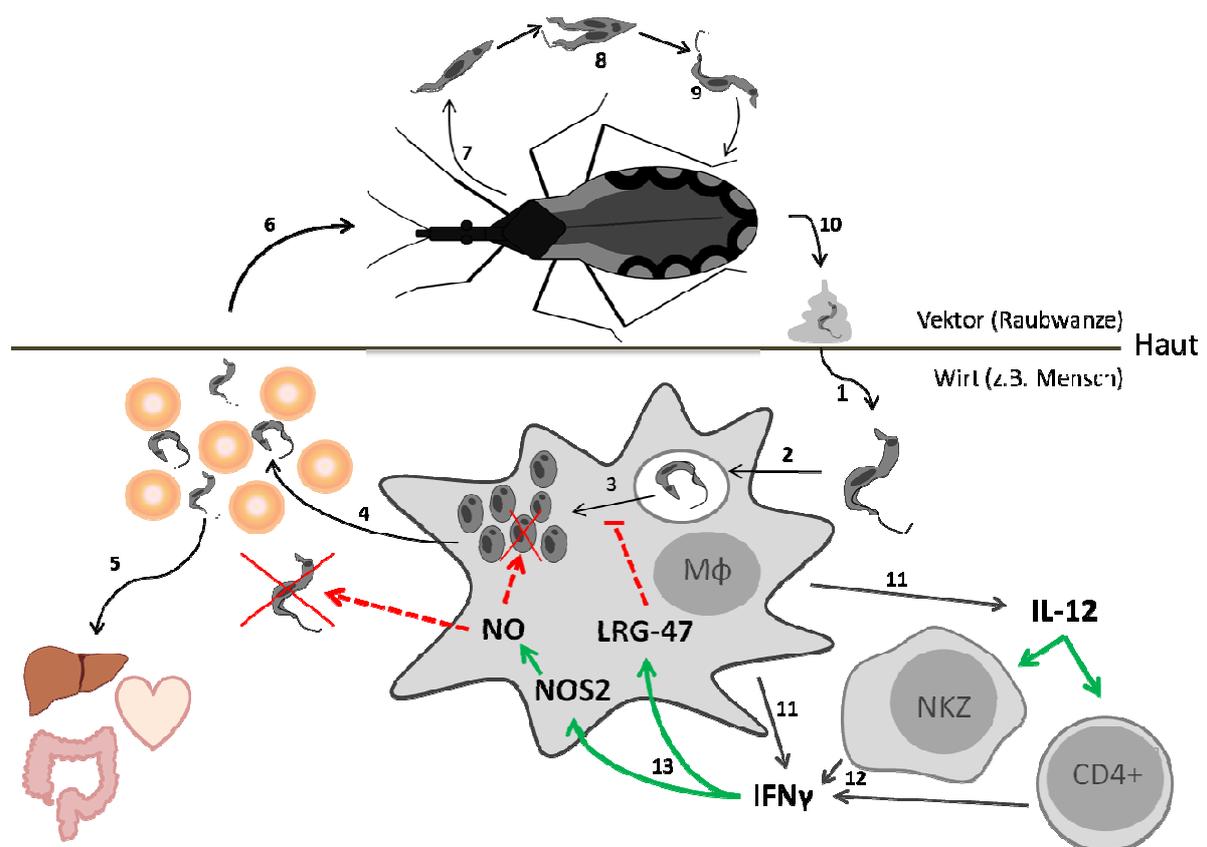
Ein funktionierendes Immunsystem besteht jedoch nicht ausschließlich aus Pathogenbekämpfenden Bestandteilen. Einen mindestens genauso wichtigen Teil machen Mediatoren aus, die die Immunzellen hemmen und dadurch eine dem Organismus schadende Überreaktion dieser Zellen vereiteln. Zu diesen Mediatoren gehören u. a. Regulatorische T- (T<sub>reg</sub>)-Zellen, die sich in Anwesenheit von TGF $\beta$  und in Abwesenheit von IL-6 mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*Forkhead box P3*) aus naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen differenzieren. Über die Produktion inhibierender Zytokine wie IL-10, TGF $\beta$  und IL-35 sind diese Zellen in der Lage, alle anderen Th-Zellarten zu inhibieren. Hierdurch wird das immune Gleichgewicht aufrechterhalten und einer Autodestruktion entgegengewirkt (Ozdemir et al. 2009; Wan und Flavell 2009; Kimura und Kishimoto 2010). Auch die einzelnen Th-Zellen haben regulierende Eigenschaften, indem sie sich gegenseitig in ihrer Aktivität einschränken (Chaplin 2010).

### **1.1.3 Die Immunantwort in der Infektion mit *T. cruzi***

Die Immunantwort gegen *T. cruzi* kann in verschiedenen Wirtsorganismen sehr unterschiedlich ablaufen. Je nach genetischem Hintergrund von Wirt und Parasit wirkt sich die jeweils ausgelöste Immunreaktion positiv oder negativ auf die Resistenzfähigkeit des Wirtes aus. Viele Wirtsorganismen wie Menschen oder Mäuse sind selbst mit einer starken Immunantwort nicht in der Lage, den Parasiten *T. cruzi* vollständig zu eliminieren. Eine bestehende Parasitämie führt in diesen Organismen jedoch nicht zwangsläufig zum Krankheitsausbruch. Im Folgenden wird der Begriff Resistenz in der akuten Phase der Infektion daher sowohl über eine niedrige Parasitämie als auch über das Überleben des Wirtes definiert. Der Vergleich resistenter und suszeptibler Infektionsmodelle in Mäusen führte zu einem besseren Verständnis über die Rolle verschiedener Zellen und Signalstoffe in der Verteidigung gegen *T. cruzi* (Hoft et al. 1993; Revelli et al. 1999; Guiñazú et al. 2004).

Hierbei konnte der Th1-Immunantwort die bedeutendste Funktion in der Resistenzentwicklung gegen *T. cruzi* zugesprochen werden. Bei einer suffizienten Th1-Antwort erkennen APZ den Parasiten sofort nach dessen Penetration in den Wirt und nehmen ihn auf. *T. cruzi* wird von einer Vielzahl von Rezeptoren, u.a. *Toll-Like*-Rezeptoren (TLR), erkannt (Tarleton 2007; Kayama und Takeda 2010). Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt in APZ zu einer gesteigerten Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12, Tumornekrosefaktor (TNF) und IFN $\gamma$  (Frosch et al. 1996; Campos und Gazzinelli 2004). IFN $\gamma$  induziert eine klassische Makrophagenaktivierung und steigert in Makrophagen die Expression der induzierbaren Stickstoffsynthase 2 (NOS2) (Silva et al. 1995; Hölscher et al. 1998). NOS2 ist ein Enzym, das für die Bildung reaktiver Stickstoffintermediate (RNI) durch die Spaltung von L-Arginin in L-Hydroxyarginin und NO unerlässlich ist. Die hieraus entstehenden RNI sind essentiell für eine effektive Eliminierung von *T. cruzi* (Muñoz-Fernández et al. 1992; Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998). Zusätzlich steigert IFN $\gamma$  in Makrophagen die Expression von LRG47, einer IFN $\gamma$  induzierbaren GTPase (Sorace et al. 1995). Auch LRG47 spielt in der Verteidigung gegen *T. cruzi* eine wichtige Rolle (Santiago et al. 2005). Hierbei wird vermutet, dass LRG47 eine frühe Fusion von Lysosomen mit den parasitophoren Vakuolen unterstützt und damit bereits in den Vakuolen zu einer vermehrten Destruktion der Parasiten beiträgt (MacMicking et al. 2003; Martens et al. 2004). Diese Art der Aktivierung von Makrophagen durch IFN $\gamma$  nennt man Klassische Makrophagenaktivierung. Um die Aktivität der Makrophagen aufrecht zu erhalten ist eine hohe Konzentration von IFN $\gamma$  vonnöten. In der frühen Phase der Infektion wird IFN $\gamma$  hauptsächlich durch NKZ bereitgestellt (Une et al. 2000; Lieke et al. 2004; Sardinha et al. 2006), die ihrerseits durch die bereits vorhandenen hohen Spiegel von IL-12 und TNF aktiviert werden (Ostensen et al. 1987; Gately et al. 1994; Une et al. 2003). Im weiteren Verlauf der Infektion favorisieren die hohe Konzentration von IL-12, TNF und IFN $\gamma$  die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu Th1-Zellen (Wolf et al. 1991; Germann et al. 1993; Planelles et al. 2002; Graefe et al. 2003; Monteiro et al. 2006). Diese übernehmen nun die pathogenspezifische Produktion von IFN $\gamma$ . Durch den gleitenden Übergang der angeborenen in die erworbene Immunantwort wird über den gesamten Infektionsverlauf ein konstanter IFN $\gamma$ -Spiegel gewährleistet, der hoch genug ist, um den aktivierten Zustand der Makrophagen zu erhalten und *T. cruzi* einzudämmen (Rodrigues et al. 2000; Sardinha et al.

2006) (Abb. 1). Zur erfolgreichen Bekämpfung von *T. cruzi* ist demnach ein kontinuierlich aufrechterhaltender Spiegel von IFN $\gamma$  und RNI unabdingbar. Andererseits führen zu hohe Spiegel von IFN $\gamma$ , TNF und RNI zu starken, gewebedestruierenden Entzündungsreaktionen, die dem Organismus mehr schaden als nutzen (Hölscher et al. 2000; Dutra und Gollob 2008; Bombeiro et al. 2010). Gerade in Infektionsmodellen mit stark pathogenen Keimen wie *T. cruzi* ist daher ein adäquater Regulationsmechanismus vonnöten, der die Entwicklung von Resistenzen zulässt und gleichzeitig der Entstehung von Immunpathologien entgegenwirkt.



**Abb. 1 Entwicklungszyklus von und Immunantwort gegen *T. cruzi*.** Die im Kot der Wanze enthaltenen metazyklischen Trypomastigoten *T. cruzi* gelangen über eine Hautläsion in den Wirtsorganismus(1). Dort werden sie von den Wirtszellen in parasitophore Vakuolen aufgenommen(2). Nach dem aktiven Verlassen der Vakuole erfolgt die Umwandlung in Amastigote *T. cruzi*, die sich intrazytoplasmatisch replizieren(3). Sind genug Amastigote vorhanden, wird der Zelluntergang eingeleitet und die *T. cruzi* gelangen als Blut-Trypomastigote in die Blutbahn (4). Von dort befallen sie andere Organsysteme (5) oder werden bei einer Blutmahlzeit wieder von einer Wanze aufgenommen (6). Im Darm der Wanze wandeln sich die Trypomastigoten zu Epimastigoten *T. cruzi* um (7) und replizieren sich longitudinal (8). Im Enddarm der Wanze erfolgt die Umwandlung in die Trypomastigote Form (9). Die beweglichen, metazyklischen Trypomastigoten werden mit der nächsten Defäkation ausgeschieden (10).

Makrophagen (M $\phi$ ), die *T. cruzi* als körperfremd erkannt haben, produzieren IL-12 und IFN $\gamma$  (11). Durch die gesteigerten Spiegel von IL-12 werden NKZ und CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen zur Produktion von IFN $\gamma$  angeregt (12). Die hohen Mengen an IFN $\gamma$  steigern in Makrophagen die Expression von NOS2 und LRG47 (13). NOS2 spielt über die Generierung RNI eine wichtige Rolle in der Eliminierung von *T. cruzi* und LRG47 fördert die frühzeitige Fusion der parasitophoren Vakuole mit Lysosomen.

Ob und in welcher Form weitere Th-Zellarten an der Immunantwort gegen *T. cruzi* beteiligt sind, war zu Beginn dieser Arbeit kaum überprüft worden. Es war lediglich erwiesen, dass eine starke Th2 Antwort über eine IL-4 und IL-10 gesteuerte Inhibierung der IFN $\gamma$ - und RNI-Produktion zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *T. cruzi* beiträgt (Barbosa et al. 1996; Laucella et al. 1996). Über die Bedeutung einer Th17- oder T<sub>reg</sub>-Immunantwort während der Infektion mit *T. cruzi* war zu diesem Zeitpunkt noch nichts bekannt.

In Modellen mit suszeptiblen BALB/c Mäusen zeigte sich, dass *T. cruzi* in der Abwesenheit von IFN $\gamma$  selbst dazu in der Lage ist, die RNI-Produktion durch Makrophagen zu unterbinden. In diesem Fall bewirken spezifische *T. cruzi*-Antigene (z.B. Cruzipain) in Makrophagen eine gesteigerte Produktion des Enzyms Arginase-1 (Arg-1) (Giordanengo et al. 2002; Stempin et al. 2002). Dieses Enzym verwendet ebenso wie NOS2 L-Arginin als Substrat. Durch die gesteigerte Aktivität der Arg-1 entsteht ein Mangel an L-Arginin. Über diesen Mangel wird NOS2 kompetitiv gehemmt (Stempin et al. 2008). Diese Art der Aktivierung von Makrophagen über eine gesteigerte Expression der Arg-1 wird Alternative Makrophagenaktivierung genannt. Alternativ aktivierte Makrophagen favorisieren eine Th2-Antwort (Giordanengo et al. 2002; Zhang et al. 2010). Das hierdurch vermehrt gebildete Zytokin IL-4 aktiviert wiederum Makrophagen alternativ. Durch diesen Prozess wird eine starke Th2-Antwort hervorgerufen, die die resistenzfördernde Th1-Antwort inhibiert. Die verminderte Produktion von RNI bedingt hierbei die gesteigerte Anfälligkeit gegenüber *T. cruzi* (Giordanengo et al. 2002; Zhang et al. 2010).

## **1.2 Das Zytokin IL-17A**

### **1.2.1 Struktur und Funktionsweise von IL-17A**

Das Zytokin IL-17A, früher bekannt als CTLA8 oder IL-17, war das erste entdeckte Zytokin der IL-17-Familie (Rouvier et al. 1993), die mittlerweile schon 6 Mitglieder zählt (IL17-A-F). Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die homodimeren Zytokine der IL-17-Familie z.T. deutlich in ihrem funktionellen Wirkspektrum (Kawaguchi et al. 2004; Kolls und Lindén 2004; Wang und Liu 2008). IL-17A zählt zu den bekanntesten Zytokinen dieser Familie. Das Gen dieses Zytokins stimmt zu über 50% mit einem Gen des Herpesvirus Saimiri

überein, weshalb ein viraler Ursprung von IL-17A vermutet wird (Rouvier et al. 1993; Yao et al. 1996). Strukturell und funktionell weist das mit Disulfidbrücken verbundene Homodimer IL-17A große Ähnlichkeiten zu IL-17F auf (Fossiez et al. 1996; Gerhardt et al. 2009). Daher wird vermutet, dass auch IL-17A, ähnlich wie IL-17F, eine Cystin-Knotenstruktur besitzt (Hymowitz et al. 2001). Zusätzlich können die Zytokine IL-17A und IL-17F eine heterodimere Verbindung eingehen, über deren Funktion bisher noch wenig bekannt ist (Chang und Dong 2007; Wright et al. 2007).

IL-17A wird sowohl von CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen (Ferretti et al. 2003; Harrington et al. 2005; Dong 2008) als auch von Zellen des angeborenen Immunsystems wie NKZ, Neutrophilen Granulozyten und  $\gamma\delta$ T-Zellen gebildet (Ferretti et al. 2003; Rachitskaya et al. 2008; Sutton et al. 2009). Die IL-17A-Produktion dieser Zellen wird hierbei durch die Zytokine TGF $\beta$ , IL-6, IL-1 und IL-23 induziert bzw. aufrechterhalten (Bettelli et al. 2006; McGeachy und Cua 2008; Sutton et al. 2009; Passos et al. 2010). Das sezernierte IL-17A führt seine Funktion über einen IL-17-Rezeptor-(IL-17R)-Komplex aus, der sich aus den Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC zusammensetzt (Toy et al. 2006). Diese Typ1-Transmembranrezeptoren gehören der Familie der IL-17R an und sind auf einer Vielzahl von Gewebe- und Immunzellen exprimiert (Gaffen 2009a; Ho und Gaffen 2010). Die Bindung von IL-17A an den IL-17R-Komplex steigert in diesen Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF sowie die Produktion von einigen Chemokinen, die zur Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten beitragen (Kawaguchi et al. 2004; Kolls und Lindén 2004; Lindén et al. 2005; Wang und Liu 2008).

### **1.2.2 Die Rolle von IL-17A in Autoimmun- und Infektionskrankheiten**

Auf Grund seiner stark entzündungsfördernden Wirkung begünstigt IL-17A in vielen Geweben die Ausbildung autoaggressiver Prozesse. Hierbei ist IL-17A maßgeblich an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie der Kollagen-Induzierten-Arthritis (CIA) oder der Experimentellen-Autoimmunen-Enzephalomyelitis (EAE), einem murinen Modell der Multiplen Sklerose, beteiligt. In diesen Krankheitsbildern zählt die Gabe von anti ( $\alpha$ )-IL-17A-Antikörpern als erfolgsversprechender Therapieansatz (Gaffen 2009b; Mesquita Jr et al. 2009; Li et al. 2010).

IL-17A wirkt allerdings nicht nur destruierend. Vor allem in Infektionen mit extrazellulären Erregern erwies sich IL-17A als äußerst protektiv. So entwickelten IL-17RA-defiziente<sup>(-/-)</sup> Mäuse eine gesteigerte Suszeptibilität in der Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) oder *Candida albicans* (*C. albicans*) (Huang et al. 2004; Happel et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Neutralisation von IL-17A in murinen Infektionsmodellen mit *Pneumocystis Carinii* und *Bordetella pertussis* erreicht (Higgins et al. 2006; Rudner et al. 2007). In der Infektion mit *K. pneumoniae* und *C. albicans* wirkte die künstliche Erhöhung von IL-17A außerordentlich resistenzfördernd (Ye et al. 2001a; Huang et al. 2004). Auch im menschlichen Organismus ist IL-17A für die Verteidigung gegen *C. albicans* und gram-positiven Bakterien unabdingbar (Ma et al. 2008; Milner et al. 2008).

Zu der Rolle von IL-17A in der Infektion mit intrazellulären Keimen lässt die aktuelle Studienlage noch keine eindeutige Aussage zu. Intrazelluläre Bakterien wie *M. tb.*, *Salmonella enterica* oder *Chlamydia trachomatis* steigern zwar die Expression von IL-17A (Infante-Duarte et al. 2000; Schulz et al. 2008; Veerdonk van de et al. 2010; Jha et al. 2011), es ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt, ob und wie die gesteigerte IL-17A Konzentration zum Schutz des Organismus beiträgt. In Infektionsmodellen mit Chlamydien konnte in suszeptiblen Mausstämmen eine gesteigerte IL-17A-Produktion festgestellt werden (Zhou et al. 2009). Andererseits führte die Neutralisierung von IL-17A in der Infektion mit *Chlamydia muridarum* zu einer verminderten Resistenzentwicklung (Zhang et al. 2009). Ähnlich diskrepante Ergebnisse fanden sich auch in der Infektion mit Mykobakterien. Hier führte die verminderte Produktion von IL-17A in IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen zu keiner Veränderung der Bakterienlast (Chackerian et al. 2006; Khader et al. 2007), wohingegen diese in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen erst in der chronischen Phase der Infektion gesteigert ist (C. Hölscher, persönliche Mitteilung). Die verminderte Eliminierung der Mykobakterien in diesen Mäusen wurde mit einer geringeren, insuffizienten Granulombildung in Verbindung gebracht (Umemura et al. 2007; Okamoto Yoshida et al. 2010). Allerdings bewirkte gerade die gesteigerte Granulombildung durch IL-17A in mit *M. tb.*-infizierten, mehrmals mit BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) geimpften Mäusen, eine schwere Gewebedestruktion der Lunge. Dieser Lungenschaden ließ sich durch die Neutralisierung von IL-17A fast vollständig revidieren (Cruz et al. 2010). Auch in Infektionen mit intrazellulären Protozoen konnten solche, IL-17A-vermittelte, destruktive Entzündungsreaktionen beobachtet werden. So

fürten in der Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) sowohl die Deletion des IL-17RA als auch die Neutralisierung von IL-17A zu einer geringeren Gewebsdestruktion bei verminderter Granulozytenrekrutierung (Guiton et al. 2010). Gleichzeitig trug eine gesteigerte IL-17A-Konzentration in IL-27 $\alpha^{-/-}$  Mäusen nach der Infektion mit *T. gondii* oder *Leishmania* (*L.*) *major* zur Entstehung von fulminanten Entzündungsreaktionen bei (Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009). Der Einfluss von IL-17A in der Verteidigung gegen intrazelluläre Protozoen wird noch kontrovers diskutiert. IL-17A $^{-/-}$  Mäuse waren zwar suszeptibel gegenüber einer leichten Infektion mit *T. gondii*, in einer schweren Infektion mit dem selben Parasiten ging die Deletion des IL-17RA allerdings mit einem resistenten Phänotyp einher (Kelly et al. 2005; Guiton et al. 2010). In der Infektion mit *L. major* konnte die Anfälligkeit von suszeptiblen BALB/c Mäusen auf die gesteigerte Produktion von IL-17A zurückgeführt werden (Lopez Kostka et al. 2009). Im Gegensatz hierzu wurde beim Menschen eine erhöhte IL-17A-Produktion mit einer verstärkten Resistenz gegen *L. donovani* in Verbindung gebracht (Pitta et al. 2009). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten noch keine Erkenntnisse über die Rolle von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi*.

### **1.2.3 IL-17A und die Zytokine der IL-12-Familie**

Die Regulation der IL-17A-Produktion erfolgt zum Großteil durch die Zytokine der IL-12-Familie. Die Zytokine dieser Familie zeichnen sich durch ihre heterodimere Struktur aus. Hierbei verbindet sich jeweils ein Molekül aus der Familie der Hemopoietin-Rezeptoren (p40 oder EBI-3) mit einem, dem Zytokin IL-6 ähnelnden, Molekül (p35, p19 oder p28) (Hölscher 2004; Collison und Vignali 2008; Gee et al. 2009). Das bekannteste Zytokin der IL-12-Familie ist IL-12 selbst. Dieses proinflammatorische Zytokin setzt sich aus den Untereinheiten p40 und p35 zusammen. IL-12 induziert in CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen und NK-Zellen die Produktion von IFN $\gamma$  (Kobayashi et al. 1989; Chan et al. 1991; Wolf et al. 1991). Auf Grund der immunpathologischen Funktion der IL-12-Untereinheit p40 wurde IL-12 lange Zeit für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verantwortlich gemacht. Später konnte diese gewebsdestruierende Wirkung der p40-Untereinheit allerdings auf das damals neu entdeckte Zytokin IL-23 zurückgeführt werden (Langrish et al. 2004; Hölscher 2005). Dieses Zytokin nutzt genau wie IL-12 das Molekül p40 als Untereinheit, allerdings in Verbindung mit dem Molekül p19 (Oppmann et al. 2000; Langrish et al. 2004). Anders als IL-12 hat IL-23 eine stark fördernde Wirkung auf die IL-17A-Produktion (Frucht 2002; Parham et al. 2002). Das

Zytokin IL-27 setzt sich aus der Untereinheit EBI-3 und dem Molekül p28 zusammen (Pflanz et al. 2002). Es hemmt die Produktion von IL-17A durch Th17- und andere Immunzellen und wirkt damit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und Immunpathologien entgegen. Auch das neuste Zytokin der IL-12-Familie, IL-35, hemmt die IL-17A-Produktion durch Th17-Zellen. Genau wie IL-27 nutzt IL-35 das Molekül EBI-3 als Untereinheit. Hierbei geht EBI-3 allerdings eine Bindung mit der IL-12-Untereinheit p35 ein (Devergne et al. 1997). Abgesehen von der inhibierenden Wirkung auf die IL-17A-Produktion erfüllen die Zytokine IL-27 und IL-35 und deren gemeinsame Untereinheit EBI-3 in der Immunantwort jedoch noch eine Vielzahl anderer Funktionen.

### **1.3 Die Regulation einer inflammatorischen Immunantwort durch die EBI-3 tragenden Zytokine IL-27 und IL35**

#### **1.3.1 Das Zytokin IL-27**

IL-27 wird vor allem durch APZ der angeborenen Immunantwort produziert. Die Expression der Untereinheiten EBI-3 und p28 wird durch die Bindung pathogener Keime an Rezeptoren der APZ (z.B. TLR2, 4 oder 9) über die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren angeregt (Wirtz et al. 2005; Liu et al. 2007; Molle et al. 2007; Jankowski et al. 2010). Das sezernierte IL-27 erzielt seine Effekte über den IL-27R, der sich aus 2 Komponenten zusammensetzt: IL-27R $\alpha$ , eine Rezeptoruntereinheit, die den Klasse-I-Zytokinrezeptoren angehört, und Glykoprotein (gp)-130, eine verbreitete Rezeptorkette, die in monomerer Form auch anderen Zytokinen, wie beispielsweise IL-6, als Rezeptor dient (Kishimoto et al. 1995; Sprecher et al. 1998; Chen et al. 2000; Pflanz et al. 2004). Der IL-27R wird in großer Zahl auf Monozyten, Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert. Hierbei bewirkt die Interaktion von IL-27 mit dem Rezeptor die Phosphorylierung unterschiedlicher STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)-Moleküle. Diese leiten in den aktivierten Zellen die entsprechenden IL-27-typischen Effektorfunktionen ein (Pflanz et al. 2004; Villarino und Hunter 2004; Carl und Bai 2008).

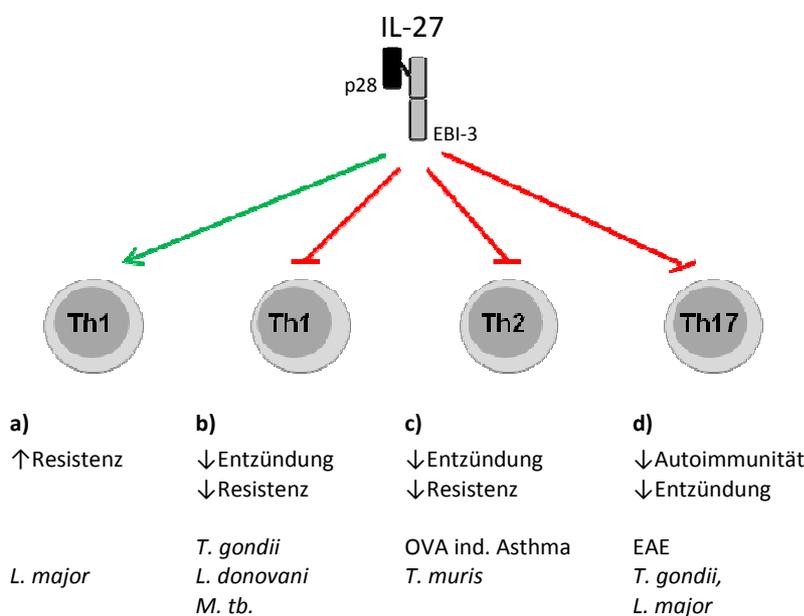
Bereits vor der Entdeckung von IL-27 beschrieben Chen *et al.* einen stimulierenden Effekt der IL-27R-Untereinheit IL-27R $\alpha$  auf die adaptive Th1-Immunantwort (Chen et al. 2000). Später konnte dieser stimulierende Effekt dann auf das damals neu entdeckte Zytokin IL-27 zurückgeführt werden (Pflanz et al. 2002). So entstand in der Infektion mit *L. major* sowohl

durch die Deletion der IL-27R-Untereinheit IL-27R $\alpha$  als auch durch die Deletion der IL-27-Untereinheit EBI-3 in sonst resistenten C57Bl/6 Mäusen ein susceptibler Phänotyp. Dieser beruhte auf einer verminderten Th1-Aktivität in der Anfangsphase der Infektion bei gesteigerter IL-4-Produktion (Artis et al. 2004a; Zahn et al. 2005). Gleichzeitig entwickelten susceptible, mit *L. major*-infizierte BALB/c Mäuse nach der Therapie mit rekombinantem IL-27 eine kräftige Th1-Immunantwort bei verminderter IL-4-Produktion, wodurch die Parasiten vollständig eliminiert wurden (Yoshimoto et al. 2007). In weiteren Studien stellte sich heraus, dass IL-27 in naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression einer der beiden IL-12-Rezeptoruntereinheiten (IL-12R $\beta$ 2) steigert und damit diese Zellen für IL-12 sensibilisiert. Hierdurch fördert IL-27 die frühe Einleitung einer potenten Th1-Immunantwort (Abb. 2a); (Lucas et al. 2003; Takeda et al. 2003; Owaki et al. 2005).

Wie bereits in den Studien mit *L. major* beschrieben, hemmt IL-27 zusätzlich die Produktion von IL-4 (Zahn et al. 2005; Yoshimoto et al. 2007). Dieser Th2-inhibierende Effekt von IL-27 war auch in der Infektion mit dem Nematoden *Trichuris muris* zu beobachten, in der infizierte IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse verstärkt IL-4 und IL-5 produzierten und den Parasiten dadurch erfolgreich eliminierten. Hierbei wurde die Aktivität von Th2-Zellen direkt durch IL-27 gedrosselt (Artis et al. 2004b; Bancroft et al. 2004). In einem murinen Modell des Asthma bronchiale führte die gesteigerte Th2-Antwort in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen nach der Irritation mit Ovalbumin (OVA) zu einem hochgradig hyperreagiblen Bronchialsystem. *In vitro* konnte die hemmende Wirkung von IL-27 auf eine STAT1- und STAT3-vermittelte Blockade der GATA-3-Expression in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zurückgeführt werden (Abb. 2c); (Zheng und Flavell 1997; Lucas et al. 2003; Yoshimoto et al. 2007).

IL-27 behindert jedoch nicht nur die Aktivität von Th2-Zellen, es inhibiert auch die Produktion von IL-17A durch Th17- und andere Immunzellen. In der Infektion mit *T. gondii* und *L. major* ging die Deletion der IL-27-Rezeptoruntereinheit IL-27R $\alpha$  mit einer gesteigerten IL-17A-Produktion einher, die eine fulminante Entzündungsreaktion auslöste (Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009). Auch in Autoimmunkrankheiten wie der EAE war die IL-17A-Produktion sowohl in IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> als auch in IL-27p28<sup>-/-</sup> Mäusen stark erhöht, wodurch diese Mäuse unter einer ausgeprägten Gewebedestruktion litten (Batten et al. 2006; Diveu et al. 2009). Zusätzlich konnte die Autoimmunpathologie der EAE durch die Gabe von rekombinantem IL-27 über eine verminderte IL-17A-Produktion erfolgreich therapiert

werden (Fitzgerald et al. 2007). Dieser inhibierende Effekt von IL-27 konnte zumindest teilweise auf eine STAT1-vermittelte Reduktion der Expression von ROR $\gamma$ t und IL-17A in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zurückgeführt werden (Abb. 2d); (Stumhofer et al. 2006; Diveu et al. 2009; Khan et al. 2010).



**Abb. 2 Einfluss von IL-27 auf die Immunantwort in verschiedenen Krankheitsmodellen.** Der Einfluss von IL-27 auf die einzelnen CD4<sup>+</sup>-Th Zellantworten variiert beträchtlich in unterschiedlichen Infektions- und Autoimmunkrankheiten. Die Abbildung präsentiert den Einfluss von IL-27 auf die Aktivität der einzelnen Th-Zellen und die Auswirkungen von IL-27 auf die Entstehung von Resistenzen oder überschießenden Entzündungsreaktionen in den angegebenen Krankheitsmodellen. Rote Pfeile: hemmender Einfluss, grüner Pfeil: stimulierender Einfluss

Nachdem IL-27 vorwiegend als Th1-aktivierendes Zytokin gehandelt wurde, boten Studien zur Rolle von IL-27 in Infektionsmodellen mit stark pathogenen intrazellulären Keimen wie *M. tb.*, *T. gondii* oder *L. donovani* eine völlig neue Perspektive auf die Funktion von IL-27. In IL-27R $\alpha$  Mäusen führte die Infektion mit einem jeden dieser 3 Pathogene zu einer unverhältnismäßig starken Produktion von IFN $\gamma$  und anderen proinflammatorischen Zytokinen. Durch die außerordentlich potente Th1-Immunantwort erfolgte die Abtötung der Pathogene wesentlich schneller und effizienter. Im weiteren Verlauf der Infektion führte diese stark inflammatorische Th1-Antwort jedoch zu nicht beherrschbaren hyperreaktiven Entzündungsreaktionen, die in den meisten Fällen mit einer gesteigerten Mortalität der IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse einhergingen (Abb. 2b); (Villarino et al. 2003; Hölscher et al. 2005; Rosas et al. 2006). Die durch IL-27 geschwächte Th1-Immunantwort beruhte hierbei auf der STAT3-vermittelten Suppression von aktivierten Th1-Zellen und Makrophagen (Hölscher et al. 2005; Rückerl et al. 2006; Yoshimura et al. 2006). Eine Sonderposition nahm die Infektion von IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen mit *T. cruzi* ein. Trotz der gesteigerten Th1-Antwort entwickelte sich in diesen Mäusen eine extrem hohe Parasitämie. Gleichzeitig entstand auch hier durch die

gesteigerte Entzündungsreaktion eine schwere Gewebedestruktion der Leber (Hamano et al. 2003).

IL-27 wirkt demnach vor allem inhibierend auf alle Th-Zellarten. Hierdurch werden stark schädigende Entzündungsreaktionen in vielen Fällen verhindert. Andererseits kann IL-27 durch diese regulierende Eigenschaft auch die Verteidigung gegen Pathogene schwächen. Nur in seltenen Fällen fördert IL-27 die Verteidigung gegen Pathogene. Dieser Effekt beruht vornehmlich auf einer frühen Einleitung der Th1-Immunantwort.

### **1.3.2 Das Zytokin IL-35**

IL-35 ist das neuste Zytokin der IL-12-Familie. Genau wie IL-27 besteht auch IL-35 aus der Untereinheit EBI-3, die in diesem Fall allerdings eine Bindung mit der IL-12-Untereinheit p35 eingeht (Devergne et al. 1997). Obwohl die Existenz dieser heterodimeren Verbindung schon lange bekannt war, konnte dem Zytokin IL-35 erst 2007 eine immunregulatorische Funktion zugesprochen werden (Collison et al. 2007; Niedbala et al. 2007). Mittlerweile weiss man jedoch, dass die Produktion von IL-35, im Gegensatz zu den restlichen Zytokinen der IL-12-Familie, vorzugsweise durch T<sub>reg</sub>-Zellen erfolgt (Collison et al. 2007). Hierbei erfüllt IL-35 wichtige Effektor-Funktionen dieser Zellen (Collison et al. 2009). *In vitro* supprimierte IL-35 sowohl die Proliferation von Effektor-T-Zellen als auch deren Produktion von IL-17A, IFN $\gamma$  und IL-4 (Collison et al. 2007; Niedbala et al. 2007; Kochetkova et al. 2010). *In vivo* konnte in Modellen von Autoimmunkrankheiten eine immunregulatorische Wirkung von IL-35 nachgewiesen werden. So waren sowohl IL-12/35p35<sup>-/-</sup> Mäuse als auch EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse stark suszeptibel gegenüber der induzierten experimentellen Kolitis (Collison et al. 2007). Gleichzeitig sistierte in Mäusen mit Kollagen-induzierter chronischer Arthritis die Gelenkdestruktion nach der Gabe von rekombinantem IL-35. Dieses Phänomen ging einher mit einer verminderter IL-17A-Produktion (Niedbala et al. 2007; Kochetkova et al. 2010). Die bisherigen Studienergebnisse lassen einen immunsupprimierenden Effekt von IL-35 vor allem auf Th17-Zellen, eventuell jedoch auch auf Th1- und Th2-Zellen, vermuten. Allerdings sind für eine abschließende Aussage über die Funktion von IL-35 noch weitere Studien vonnöten. Mehr Aufschluss über die Wirkungsweise von IL-35 könnte auch die Entdeckung des bisher noch unbekanntem IL-35 Rezeptors bringen.

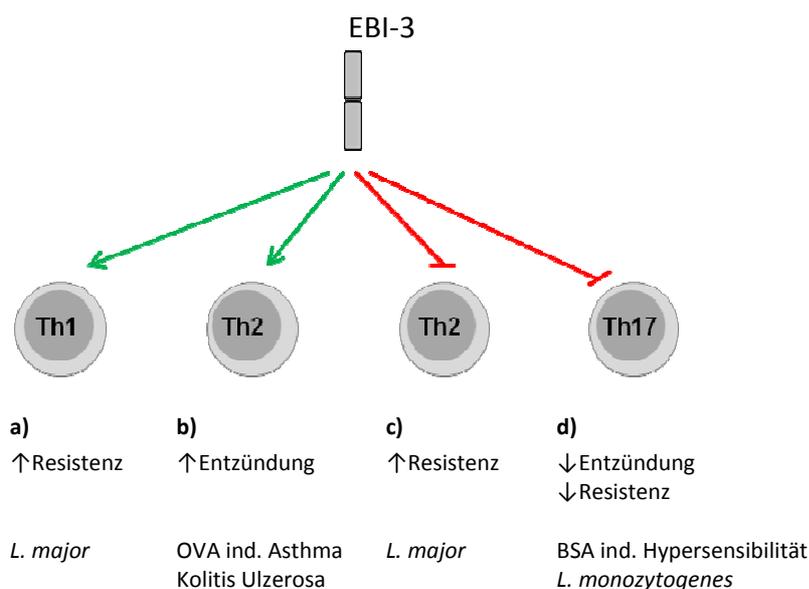
### 1.3.3 Die IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3

Die Besonderheit aller Zytokine der IL-12-Familie besteht in ihrer heterodimeren Struktur. Dabei fungiert nicht nur ein und dasselbe Molekül als Untereinheit verschiedener Zytokine, manche Untereinheiten sind sogar in der Lage, als homodimere Verbindungen eine eigenständige Funktion auszuführen (Heinzel et al. 1997; Hölscher 2004; Brahmachari und Pahan 2009). Aufgrund dieser Tatsache sollten die einzelnen Untereinheiten der IL-12-Familie nicht nur als Funktionsträger spezifischer Zytokine, sondern auch als eigenständige Mediatoren der Immunantwort betrachtet werden.

EBI-3 ist ein 34 kDa großes Protein, das strukturelle Ähnlichkeiten mit der Klasse-I-Zytokinfamilie aufweist (Devergne et al. 1996) und sowohl IL-27 als auch IL-35 als Untereinheit dient (Devergne et al. 1997; Pflanz et al. 2002). Auch eine homodimere EBI-3-Verbindung wäre vorstellbar, allerdings ist über die Existenz einer solchen Verbindung bisher noch nichts bekannt (Hölscher 2004). Wie bereits erwähnt, spielt die Untereinheit EBI-3 genau wie IL-27 eine wichtige Rolle in der Initiierung der Th1-Antwort (Abb. 3a). Dieser Effekt konnte für EBI-3 nicht nur in der Infektion mit *L. major* gezeigt werden (Zahn et al. 2005). Auch in einem Modell der T-Zell-vermittelten Hepatitis führte die Deletion von EBI-3 zu einer verminderten Expression von IFN $\gamma$  und STAT1 (Siebler et al. 2008).

Genau wie IL-27 hemmt auch EBI-3 die Produktion von IL-17A. *In vitro* führte die Deletion von EBI-3 in CD4<sup>+</sup>-Zellen zu einer gesteigerten Expression von IL-17A, IL-22 und ROR $\gamma$ t (Yang et al. 2008). *In vivo* verschlechterte die vermehrte IL-17A-Produktion in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen eine Rinderserumalbumin (BSA)-induzierte Hypersensibilitätsreaktion (Tong et al. 2010). Auch in mit *Listeria monocytogenes*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen war eine gesteigerte IL-17A-Produktion zu beobachten, die mit einer verstärkten Resistenz einherging (Abb. 3d) (Yang et al. 2008). Nachdem EBI-3 in den vorherigen Beispielen dieselbe Funktion wie IL-27 ausübte, bewirkte EBI-3 in Th2-vermittelten, immunpathologischen Krankheitsbildern genau das Gegenteil von IL-27. In dem OVA-induzierten, murinen Modell des Asthma bronchiale trug IL-27 über eine Hemmung der Th2-Aktivität maßgeblich zu einer Verbesserung der Symptomatik bei (Yoshimoto et al. 2007; Fujita et al. 2009). Zusätzlich rief die Deletion von IL-27R $\alpha$  im selben Modell eine IL-4-bedingte fulminante Überempfindlichkeit des Bronchialsystems, im Sinne eines Asthmaanfalles, hervor (Miyazaki et al. 2005). Im Gegensatz hierzu erwiesen sich EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse als äußerst resistent gegenüber einer

Irritierung des Bronchialsystems mit OVA. Diese Resistenz konnte auf eine verminderte IL-4-Produktion in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen zurückgeführt werden (Hausding et al. 2007). Die EBI-3-vermittelte, gesteigerte IL-4-Produktion scheint auch an der Entstehung der Kolitis Ulzerosa beteiligt zu sein (Abb. 3b) (Omata et al. 2001; Nieuwenhuis et al. 2002). EBI-3 fördert allerdings nicht in allen Krankheitsbildern die IL-4-Produktion. In der Infektion mit *L. major* hat EBI-3, genau wie IL-27, einen hemmenden Effekt auf die IL-4-Produktion (Abb. 3c) (Zahn et al. 2005).



**Abb. 3 Einfluss von EBI-3 auf die Immunantwort in verschiedenen Krankheitsmodellen.** Der Einfluss von EBI-3 auf die einzelnen CD4<sup>+</sup>-Th-Zellantworten variiert beträchtlich in unterschiedlichen Infektions- und Autoimmunkrankheiten. Die Abbildung präsentiert den Einfluss von EBI-3 auf die Aktivität der einzelnen Th-Zellen und die Auswirkungen von EBI-3 auf die Entstehung von Resistenzen oder überschießenden Entzündungsreaktionen in den jeweils angegebenen Krankheitsmodellen.

Bisher wurden noch keine Studien zu dem Verhalten von EBI-3 in der Infektion mit stark pathogenen, intrazellulären Erregern wie *M. tb.*, *T. gondii* oder *T. cruzi* durchgeführt. Die Ergebnisse solcher Studien könnten zu einem besseren Verständnis über die Funktionsweise von EBI-3, vor allem in Bezug auf die verschiedenen Th-Zellantworten, führen.

## 1.4 Fragestellung

Das Zytokin IL-17A ist aufgrund seiner proinflammatorischen Eigenschaften ein starker Induktor von Autoimmunkrankheiten. Gleichzeitig ist IL-17A auch ein wichtiger Bestandteil der protektiven Immunantwort gegen extrazelluläre Keime. Über die Funktion dieses proinflammatorischen Zytokins in der Infektion mit intrazellulären Erregern wird dagegen noch kontrovers diskutiert. Auch die wenigen Studien, die den Einfluss von IL-17A in der Infektion mit intrazellulären Protozoen untersuchten, lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine Studien zu der Funktion von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* vorlagen, ergab sich folgende Fragestellung:

- Welche Bedeutung hat IL-17A für den Infektionsverlauf und die Pathologie in *T. cruzi*-infizierten Mäusen?
- Auf welche Weise beeinflusst IL-17A die protektive Immunantwort gegen *T. cruzi*?

Gleichzeitig wurde in mehreren vorangehenden Arbeiten erwiesen, dass die Produktion von IL-17A maßgeblich durch die Zytokine IL-27 und IL-35 gehemmt wird. Diese Zytokine spielen auch in der Regulation von Mediatoren der Th1- und Th2-Immunantwort eine wichtige Rolle. Hierbei ist bemerkenswert, dass sich die Funktionsweise der gemeinsamen IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 zum Teil von der Funktion der beiden Zytokine unterscheidet. Bisher haben sich nur wenige Studien mit der Rolle der Untereinheit EBI-3 in Infektionskrankheiten befasst. Darunter existieren noch keine Daten zur Infektion mit *T. cruzi*. Aus dieser Studienlage ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

- Auf welche Weise wirkt sich die Untereinheit EBI-3 auf die IL-17A-Produktion in der Infektion mit *T. cruzi* aus?
- Hat die Untereinheit EBI-3 einen Einfluss auf den Infektionsverlauf und die Pathologie in *T. cruzi*-infizierten Mäusen?
- Welchen Einfluss hat die Untereinheit EBI-3 auf die Th1- und Th2-Immunantwort in der Infektion mit *T. cruzi*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autotechnicon (Hypercenter XP; SHADON, Pittsburgh, USA)

Biophotometer (EPPENDORF, Wesseling-Berzdorf)

Brutschränke (HERAEUS, Hanau)

Digitalkamera (Digital Sight DS-L1; NIKON, Düsseldorf)

Durchflusszytometer (FACS Calibur®; BD BIOSCIENCES, Heidelberg)

ELISA-Lesegerät (Magellan, TECAN, Crailsheim)

Heizblock (EPPENDORF)

Heizplatte (MEDAX, Kiel)

Homogenisator (PotterS; B.BRAUN, Melsungen)

Mikroskop (ZEISS, Oberkochen)

Mikroskop in Hamburg (Wilore)

Paraffingießstation (Leica EG1140C; LEICA, Nussloch)

Reflotron® Plus (ROCHE)

Rotationsmikrotom (Leica RM 2155; LEICA)

Schnellkochtopf (FISSLER, Idar-Oberstein)

ThermoCycler (LightCycler; ROCHE)

Wasserbad (GFL1052, GFL, Burgwedel)

Zentrifuge in Hamburg (Modell 5415C Eppendorf)

Zentrifugen (Rotanta460R, MIKRO22R, MIKRO200R; HETTICH ZENTRIFUGEN)

#### 2.1.2 Software

„CellQuest™Pro“ (Version 5.1.1, MacApp®R15.1©; BD)

„Magellan“ (ELISA Software;TECAN)

„LightCycler“ Software (Version 3.5; ROCHE)

„FCAP Array™v1.01“ (BD)

„Graph Pad Prism 4.0“ (GRAPH PAD, San Diego, CA, USA)

### 2.1.3 Labormaterialien

Deckgläschen (24x60 mm; MENZEL Gläser)  
FACS-Röhrchen (5 ml; BD)  
Glaskapillaren (LightCycler; ROCHE)  
Histogrid (SIMPORT, Bernard-Pilon, Kanada)  
Kanülen und Spritzen (BD BIOSCIENCES)  
Mikrotiterplatte (24 Vertiefungen, Flachboden; NUNC)  
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Flachboden, MaxiSorp™, NUNC)  
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Rundboden, NUNC)  
Neubauer Zählkammer (BRAND, Wertheim)  
Objektträger (MENZEL Gläser)  
Objektträger (SuperFrost Plus; LANGENBRINK, Emmendingen)  
Petrischalen (SARSTEDT)  
Pipetten (EPPENDORF)  
Pistillen (RETTBERG, Göttingen)  
Plastiksieb (Cell strainer 100 µm Maschenweite; BD)  
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, EPPENDORF)  
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml; SARSTEDT)  
Reflotron GOT (AST) Indikationsstreifen (ROCHE)  
Reflotron GPT (ALT) Indikationsstreifen (ROCHE)  
Serumseparationsröhrchen (BD BIOSCIENCES)

### 2.1.4 Reagenzien

10x PBS (*phosphate buffered saline*; PAA)  
2-Propanol (Isopropanol; SIGMA)  
Aceton (2-Propanon; MERCK, Darmstadt)  
Aluminiumsulfat hydrat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ; SIGMA)  
Ammoniumchlorid (MERCK)  
*Aqua destilla* (Aqua dest.; zweifach deionisiertes Wasser; Deionisierungsanlage,  
Forschungszentrum Borstel)  
Assay Diluent (BD)

BCP (1-Brom-3-Chlorpropan; SIGMA, Deisenhofen)

Blocking Kit (VECTOR)

Inhalt: Avidin D Blocking Reagent, Biotin Blocking Reagent

BSA (Rinderserumalbumin; SIGMA)

Cytofix/Cytoperm™ (BD)

DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat; AMBION, Huntingdon, England)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*; PAA)

dNTP (Desoxynucleosidtriphosphat; PEQLAB)

DTT (DL-Dithiothreitol; FERMENTAS)

EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure; ICN BIOMEDICALS, Eschwege)

Eisessig (MERCK)

Entellan (MERCK)

Eosin Y diNatrium-Salz (SIGMA)

Ethanol (für Molekularbiologie) (MERCK)

Ethanol (MERCK)

Ethylenglycol (SIGMA)

FCS (Fötales Kälberserum; BIOCHROM, Berlin)

Formalin (37%) (MERCK)

GolgiPlug™ (BD)

Hämatoxylin (SIGMA)

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; PAA)

Heparin (RATIOPHARM, Ulm)

IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*; PAA)

Iohexol (NycoPrep Universal; PROGEN)

Kaisers Glycerin-Gelatine (MERCK)

Kaliumchlorid (INVITROGEN)

Kaliumhydrogenphosphat (MERCK)

L-Glutamin (BIOCHROM)

M.O.M. Immunodetection Kit (VECTOR)

Inhalt: M.O.M. Protein Concentrate, Mouse-Ig Blocking Reagent, M.O.M. Biotinylated Anti Mouse-IgG Reagent, Vectastain ABC Reagent A und Reagent B

Magnesiumchlorid (INVITROGEN)

Mausserum (PAA)

Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit (BD<sup>TM</sup>CBA; BD)

Inhalt: Assay Diluent; Capture Bead Diluent; Detection Reagent Diluent;  
Waschpuffer; Setup beads

Natriumazid (MERCK)

Natriumcarbonat (MERCK)

Natriumchlorid (MERCK)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (MERCK)

Natriumhydrogencarbonat (MERCK)

Natriumhydrogenphosphat (MERCK)

Natriumiodat (SIGMA)

Oligo-dT-Nukleotide (12-18 mer, 25U; AMERSHAM BIOSCIENCES)

Paraffin (Paraplast Plus; SHERWOOD MEDICAL, St. Louis, USA)

Paraformaldehyd (PFA; MERCK)

PCR-Puffer (10x; für quantitative LightCycler-PCR; INVITROGEN)

Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM)

Perm/Wash<sup>TM</sup>-Puffer (BD)

Phenol/Chloroform (ROTH)

Rattenserum (PAA)

RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV Reverse Transkriptase (FERMENTAS, Burlington, Kanada)

RiboLock<sup>TM</sup> Ribonuclease-Inhibitor (2500 U; FERMENTAS)

Rotihistol (ROTH, Karlsruhe)

Schwefelsäure, 95-97% (MERCK)

Streptavidin Meerrettichperoxidase (R&D)

Streptavidin PE (BD)

Substrate Reagent Set (BD)

Sucrose (Saccharose) (SIGMA)

SYBR<sup>®</sup>-Green-I (INVITROGEN)

Taq DNA Polymerase (INVITROGEN)

TM3,3'-Diaminobenzidin Tabletten Set (SIGMA)  
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; FLUKA, Buchs, Schweiz)  
TriFast (PEQLAB; Erlangen)  
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris; SERVA)  
Trypanblau (SIGMA)  
Tween-20 (SIGMA)  
Wasser (steril, pyogenfrei) (B.BRAUN)  
Wasserstoffperoxid (35%; MERCK)  
Xylol (MERCK)  
Zitronensäuremonohydrat (Zitrat; MERCK)

### 2.1.5 Medien

DMEM Medium: DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin

IMDM Medium complete: IMDM , 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Erythrozyten Lysierungs Puffer (RCLB): NH<sub>4</sub>Cl (156 mM), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12 mM), EDTA (0,13 mM);  
pH 7,3

Erythrozyten Lysierungspuffer zur Bestimmung der Parasitämie: Tris (0,17 M) in NH<sub>4</sub>Cl (0,16 M) 1:10 + Heparin (25 U/ml)

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung): KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 mM), NaCl (137 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (9 mM); pH=7,4

#### 2.1.6.1 Puffer und Lösungen für Histologie und Immunhistologie

1% Eosin: 10 g/l Eosin Y diNatrium-Salz in Leitungswasser, vor Gebrauch filtriert und mit 2 bis 3 Tropfen Eisessig angesäuert

Formalin: Formalin (4%) in PBS

Hämatoxylin nach Gill: Hämatoxylin (6 g/l), NaIO<sub>3</sub> (0,6 g/l), Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·xH<sub>2</sub>O (52,8 g/l), Ethylenglykol (25%), Eisessig (6%) in Leitungswasser

M.O.M. Diluent: 0,08% M.O.M. Proteinkonzentrat in TBS

TBS (Tris gepufferte Salzlösung): NaCl (150 mM), Tris (10 mM); pH= 7,4

Zitratpuffer: Zitronensäure Monohydrat (10 mM) in Aqua dest.

### 2.1.6.2 Molekularbiologische Lösungen

LightCycler-Mastermix: 10xPuffer (10%), dNTP's (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (3,5 mM), BSA (0,6 mg/ml), SYBR®-Green-I (2%), Primer sense (0,25 µM), Primer antisense (0,25 µM), Taq DNA Polymerase (50 U/ml), Aqua B. Braun

10x Puffer: Tris-HCL (200 mM) (pH 8,4), KCl (500 mM)

5x Reaktionspuffer: Tris-HCl (250 mM) (pH 8.3 bei 25°C), KCl (250 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM), DTT (50 mM)

Reverse Transkriptions Mix: dNTP's (20 mM), RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl), RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor(4 U/µl), 5xReaktionspuffer (40%) in Aqua B. Braun

### 2.1.6.3 Puffer und Lösungen für *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*:

Abstopplösung: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M)

Beschichtungspuffer: NaHCO<sub>3</sub> (8,4 g/l), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,56 g/l) in Aqua dest.; pH=9,5

Blockierlösung (DuoSet): BSA (10 g/l), Saccharose (50 g/l), NaN<sub>3</sub> (0,5 g/l) in Aqua dest.

Substratpuffer: 3,3,5,5-Tetramethylbenzidin (204 µg/ml), Aceton(0,5%), Ethanol (0,5%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03%) in Zitronensäure (33 mM); pH= 4,1

Verdünnungspuffer (Duoset): BSA (10 g/l) in PBS

Verdünnungspuffer (PAIRS): BSA (1 g/l), Tween-20 (0,05%), Tris (2,4 g/l), NaCl (8,8 g/l); (pH7,3) in Aqua dest

Waschpuffer: Tween-20 (0,05%) in PBS

### 2.1.6.4 Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen:

FACS Puffer: FCS (3%),NaN<sub>3</sub>(0,1%), in PBS

Fc-Blockierlösung: αCD16/CD32 (25 µg/ml), Mausserum (2,5%), Rattenserum (2,5%) in FACS-Puffer

Waschpuffer: Perm/Wash™ 1:10 in Aqua dest.

## 2.1.7 Zytokine und Antikörper

### 2.1.7.1 Immunhistologische Antikörper

Zur immunhistologischen Detektion der NOS2 wurden  $\alpha$ NOS2 und  $\alpha$ Ziege in TBS, supplementiert mit 10% FCS, verdünnt. Als Verdünnungspuffer für  $\alpha$ Ziege diente TBS, supplementiert mit 10% FCS und 10% Mausserum. Zur Immunhistologischen Detektion der Arg-1 wurde  $\alpha$ Arg-1 in M.O.M. *Diluent* verdünnt.

**Tabelle 1 Immunhistologische Antikörper**

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Verwendung/ Hersteller
<b>NOS2</b>	Kaninchen-IgG	Polyklonal	-	1:800	PrimärAK UPSTATE
<b>Kaninchen</b>	Ziege-IgG	Polyklonal	Peroxidase	1:30	1. SekundärAK DIANOVA
<b>Ziege</b>	Kaninchen-IgG	Polyklonal	Peroxidase	1:50	2. SekundärAK DIANOVA
<b>Arg-1</b>	Maus-IgG <sub>1</sub>	19	-	1:250	Primärantikörper BD

### 2.1.7.2 Zellstimulation

**Tabelle 2 Antikörper zur Zellstimulation**

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung	Konzentration
<b>CD3e</b>	Ar Ham-IgG1, $\kappa$	145-2C11	NA/LE	5 $\mu$ g/mg
<b>CD28</b>	Syr Ham-IgG2, $\lambda$ 1	37.51	NA/LE	5 $\mu$ g/mg

### 2.1.7.3 Standard für ELISA und Cytometric Bead Array (CBA) (IL12/23p40)

**Tabelle 3 Standard für ELISA und CBA**

Standard	Marke	Konzentration
<b>IFN<math>\gamma</math> (AN18)</b>	OptEIA; BD BIOSCIENCE	10 ng/ml
<b>IL-4</b>	PAIRS; BD BIOSCIENCE	250 ng/ml
<b>IL-12/23p40</b>	BD BIOSCIENCE	10 ng/ml
<b>IL-17A</b>	DuoSet; R&D SYSTEMS	10 ng/ml

### 2.1.7.4 Antikörper für ELISA und CBA (IL12/23p40)

Die verwendeten Antikörper wurden mit dem entsprechenden ELISA Verdünnungspuffer in der angegebenen Konzentration angesetzt.

**Tabelle 4: Antikörper für ELISA und CBA**

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung	Verd.	Verwendung/ Firma
IFN $\gamma$	Ratte-IgG <sub>1</sub>	AN-18	-	1:250	Primär-AK (OptEIA; BD)
IFN $\gamma$	Ratte-IgG <sub>1</sub>	AN-18	biotyniliert	1:250	Sekundär-AK (OptEIA; BD)
IL-4	Ratte-IgG <sub>1</sub>	11B11	-	1:1000	Primär-AK (PAIRS; BD)
IL-4	Ratte-IgG <sub>1</sub>	BVD6-24G2	biotyniliert	1:1000	Sekundär-AK (PAIRS; BD)
IL-12/23p40	Ratte-IgG <sub>2a</sub>	C17.8	biotyniliert	1:250	CBA Sekundär-AK (OptEIA; BD)
IL-17A	Maus-IL-17A Kit		-	1:180	Primär-AK (DuoSet; R&D SYSTEMS)
IL-17A	Maus-IL-17A Kit		biotyniliert	1:180	Sekundär-AK (DuoSet; R&D SYSTEMS)

### 2.1.7.5 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Alle Antikörper gegen Zellwandbestandteile (CD-Antikörper) wurden zu der entsprechenden Konzentration mit FACS-Puffer verdünnt. Für die intrazelluläre Färbung der Zytokine wurden die jeweiligen Zytokinantikörper mit Perm/Wash<sup>TM</sup> verdünnt. Alle Antikörper stammten von BD BIOSCIENCE.

**Tabelle 5: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen**

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung	Konzentration
CD4	Ratte-IgG2a, $\kappa$	RM 4-5	FITC	0,625 $\mu\text{g}/\text{mg}$
CD16/CD32	Rat-IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	2.4G2	Purified	25 $\mu\text{g}/\text{mg}$
CD44	Ratte-IgG2b, $\kappa$	IM7	APC	1,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$
IFN $\gamma$	Rat-IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	XMG1.2	PE	1:100
IL-4	Rat-IgG <sub>2B</sub>	BVD4-1D11	PE	1:100
IL-17A	Rat-IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	TC11-18H10	PE	1:100

### 2.1.7.6 CBA Flex Sets

Maus IFN $\gamma$  Flex-Set (BD<sup>TM</sup> CBA; BD BIOSCIENCES)

Inhalt: Maus IFN $\gamma$  Standard

Maus IFN $\gamma$  PE Detektions Reagenz

Maus IFN $\gamma$  Capture Bead A4

Maus TNF Flex-Set (BD<sup>TM</sup> CBA; BD BIOSCIENCES)

Inhalt: Maus TNF Standard

Maus TNF PE Detektions Reagenz

Maus IFN $\gamma$  Capture Bead C8

### 2.1.8 Primer für molekularbiologische Untersuchungen

Alle Primer stammten von der Firma EUROGENTEC S.A.

Tabelle 6: Primer für molekularbiologische Untersuchungen

Gen	Primerpaar	Anlagerungs- Temperatur [°C]	Elongations- Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
<i>arg-1</i>	sense: 5`-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3`	63	15	35
	antisense: 5`-CAG-ATA-TGC-AGG-GAG-TCA-CC-3`			
<i>fizz1</i>	sense: 5`-TCC-CAG-TGA-ATA-CTG-ATG-AGA-3`	63	15	28
	antisense: 5`-CCA-CTC-TGG-ATC-TCC-CAA-GA-3`			
<i>hppt</i>	sense: 5`-GCA-GTA-CAG-CCC-CAA-AAT-GG-3`	60	20	35
	antisense: 5`-AAC-AAA-GTC-TGG-CCT-GTA-TCC-AA-3`			
<i>lrg47</i>	sense: 5`-TCC-GCT-GAT-GTT-GGG-ACT-GTG-G-3`	58	20	35
	antisense: 5`-CCA-GGC-AGG-TCC-CAG-AAG-ATC-AC-3`			
<i>nos2</i>	sense: 5`-AGC-TCC-TCC-CAG-GAC-CAC-AC-3`	60	15	35
	antisense: 5`-ACG-CTG-AGT-ACC-TCA-TTG-GC-3`			
<i>ym1</i>	sense: 5`-GGG-CAT-ACC-TTT-ATC-CTG-AG-3`	63	15	29
	antisense: 5`-CAA-CTG-AAG-TCA-TCC-ATG-TC-3`			

### 2.1.9 Labortiere

EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse (Nieuwenhuis et al. 2002) und C57Bl/6 Mäuse wurden im Forschungszentrum Borstel (FZB) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse wurden aus dem Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie Leipzig bezogen (Nakae et al. 2002). Der genetische Hintergrund beider Stämme ist der Mausstamm C57Bl/6.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in speziellen Käfigen mit Filterdeckel in das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNI) Hamburg transportiert und dort in einem Biologischen Sicherheitslabor (BSL)-2-Bereich infiziert und in einzelbelüfteten Käfigen mit Filterdeckel gehalten. Die Tiere waren zu keinem Zeitpunkt viral oder bakteriell erkrankt. Die Tierversuchsvorhaben zu den verschiedenen Experimenten wurden vom Ministerium für

Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Hamburg unter der Genehmigungsnummer G 21307/591-00.33 genehmigt.

### **2.1.10 Parasitenstamm**

Der *T. cruzi* Stamm „Tulahuen“ wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Thomas Jakobs, BNI Hamburg, zur Verfügung gestellt. Dort wird der „Tulahuen“ Stamm in C57Bl/6-Mausstämmen gehalten.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Infektion der Tiere**

Die Infektion der Tiere erfolgte intra-peritoneal (i.p.) mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi* Blut-Trypomastigoten. Die Infektion wurde freundlicherweise von Frau Christiane Steeg, Arbeitskreis PD Dr. Thomas Jakobs, Immunologie, BNI Hamburg, durchgeführt.

### **2.2.2 Bestimmung der Parasitämie**

Die Konzentration der Parasiten im Blut wurde an verschiedenen Tagen im BNI Hamburg bestimmt. Hierfür wurde den Mäusen 3  $\mu$ l Schwanzblut entnommen und in 27  $\mu$ l Erythrozytenlysiierungspuffer gegeben. Sobald das Blut vollständig lysiert war (ca. 3 Minuten (min)), wurde die Parasitenzahl mit der Neubauer Zählkammer (0,02 mm Tief, 0,0025 mm<sup>2</sup>) mikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung bestimmt.

### **2.2.3 Bestimmung des Überlebens**

Jeweils 5 Mäuse wurden zur Bestimmung des Überlebens mit *T. cruzi* infiziert und täglich beobachtet und gewogen. Moribunde Mäuse wurden mittels Genickbruch euthanasiert und der darauffolgende Tag als Todestag angegeben.

### **2.2.4 Organentnahmen**

Die Organentnahme erfolgte im BNI Hamburg. Zu weiteren immunologischen, histopathologischen oder molekularbiologischen Untersuchungen wurden die entnommenen Organe und das Serum an das FZB transportiert. Der Transport erfolgte, abhängig vom anschließenden Vorhaben entweder auf Eis, in 4% Formalin oder in flüssigem NO in jeweils hierfür geeigneten Sicherheitstransportbehältern.

Zur Entnahme wurden je 3-5 *T. cruzi*-infizierte Mäuse einzeln in einem extra Käfig mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Die Bauchdecke wurde eröffnet. Zur Gewinnung von Serum wurde mit einer 25-G-Kanüle Blut aus der Vena (V.) cava inferior entnommen, in ein Serumseparationsröhrchen gegeben und bei 6000 xg für 10 Minuten (min) zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in flüssigem NO transportiert und im FZB bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für immunologische Untersuchungen wurde mit Pinzette und Schere vorsichtig die Milz gelöst und in 5 ml HBSS (mit 10% FCS) überführt. Die Leber wurde vor der Entnahme über die V. cava inferior mit 5 ml PBS durchspült, ein Leberlappen wurde mit Pinzette und Schere entnommen und in 10 ml PBS aufbewahrt. Leber und Milz wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Zur molekularbiologischen und histologischen Untersuchung wurden Milz und Leber entnommen und mit Pinzette und Schere in 2 Hälften geteilt. Eine Hälfte des jeweiligen Organs wurde zur histologischen Untersuchung in ein Histogrid gegeben und in ein lichtundurchlässiges Gefäß mit 4% Formalin überführt. Die andere Hälfte des jeweiligen Organs wurde gewogen, in flüssigem NO schockgefroren und im FZB bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **2.2.5 Histopathologische und immunhistopathologische Untersuchungen**

#### **2.2.5.1 Paraffineinbettung**

Nach 24-stündiger Fixation in 4% Formalin wurden die Organe in einem Autotechnicon in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die entwässerten, paraffinierten Organe wurden nun in einer Paraffingießstation bei 65°C in flüssigem Paraffin eingebettet. Die abgekühlten Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.5.2 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Aus den gekühlten Paraffinblöcken wurden mit einem Rotationsmikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die in kaltem Wasser schwimmend mit der Pinzette entfaltet und im 39°C warmen Wasserbad geglättet wurden. Diese geglätteten Schnitte wurden auf einen Objektträger (SuperFrost) gebracht, für mindestens 4 h auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **2.2.5.3 Färbung der Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin**

Zum Anfärben der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin zur histopathologischen Darstellung der Lebern mussten die Schnitte dreimal für 5 min in Rotihistol entparaffiniert und für 1 min in einem Rohistol-Ethanol-Intermedium (1:2) geschwenkt werden. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Inkubation in Ethanol für jeweils 5 min. Die Bewässerung der Schnitte erfolgte durch Dippen in Ethanol-Wasser-Lösungen mit absteigender Ethanolkonzentration (100%, 96%, 80%, 40%) und anschließender Inkubation in destilliertem Wasser (Aqua dest.) für 5 min. Die gewässerten Schnitte konnten nun für 20 min mit Hämatoxylin nach Gill gefärbt werden. Überschüssige Färbelösung wurde dann durch 3-minütiges Einweichen in Aqua dest. und 10-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser entfernt. Hierdurch nahm das Chromatin in den Zellkernen des Gewebes eine bläuliche Farbe an. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 3 min mit 1% Eosin angesäuert, welches durch kurzes Eintauchen in Aqua dest. abgespült wurde. Hierdurch wurden Zytoplasma und Intrazellulärsubstanzen rosa gefärbt. Es folgte die Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe. Nach 3 mal 5-minütigem Einwirken von Rotihistol wurden die Schnitte mit Entellan und einem Deckgläschen eingedeckelt und für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop betrachtet und repräsentative Abschnitte mit der Digitalkamera aufgenommen.

### **2.2.5.4 Immunhistochemische Arg-1-Färbung**

Zur Abschätzung der Aktivität alternativ aktivierter Makrophagen wurde die Arg-1 in den Lebern von *T. cruzi*-infizierten Mäusen immunhistochemisch dargestellt. Hierfür wurden die angefertigten Schnitte mit Xylol für 10 min entparaffiniert und in Aceton in absteigender Konzentration rehydriert (100%, 70%, 40%, je 10 min). Es folgte ein Waschschrift mit Leitungswasser und 3 Spülgänge mit TBS. Im Anschluss wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 5 min in 1% SDS (in TBS) inkubiert um das Arg1-Antigen freizulegen. Nach dreimaligem Spülen mit TBS erfolgte die Blockierung der Peroxidase und Entfärbung von Erythrozyten durch 20-minütige Inkubation mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in TBS) unter Lichtausschluss. Es folgte ein weiterer Waschgang (3x in TBS).

Für alle weiteren Schritte wurden die Schnitte nach dem Aufbringen der verschiedenen Substanzen jeweils mit einem Deckglas abgedeckt und bei Raumtemperatur in einer

feuchten Kammer inkubiert. Das im Schnitt vorhandene Avidin und Biotin wurde geblockt, indem erst 200 µl *Avidin Blocking Reagent* und dann 200 µl *Biotin Blocking Reagent* (Zubereitung wie im *Blocking Kit* angegeben) auf die Schnitte aufgebracht und jeweils für 15 min inkubiert wurde. Nach der Inkubation erfolgte jeweils ein Waschschrift (3x mit TBS). Um überschüssige Immunglobuline zu blockieren, wurden nun 200 µl *M.O.M.-Mouse-Ig-Blocking-Reagent* (Zubereitung wie im *Blocking-Kit* angegeben) auf die Schnitte aufgebracht und 1h inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS wurden nun 200µl *M.O.M.-Diluent* auf dem Objektträger aufgebracht, welches ohne Deckglas für 5 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Die überschüssige *Diluent* wurde abgeschüttet. Die Detektion der Arg-1 erfolgte mit  $\alpha$ Maus-Arg-1-IgG (Kapitel 2.1.7.1), das in einem Volumen von 200 µl einzeln auf den Objektträger pipettiert und für 45 min inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Spülen mit TBS entfernt. Es folgte die Detektion der Arg-1-Antikörper mit biotinylierten  $\alpha$ Maus-IgG-Sekundärantikörpern (Zubereitung wie im *Blocking-Kit* angegeben). Die überschüssigen Antikörper wurden nach einer Inkubation von 10 min durch 3-maliges Spülen mit TBS ab gespült. Im Anschluss wurden 200 µl Vectastatin-ABC-Reagenz (Zubereitung wie im *Blocking Kit* angegeben) aufgetragen und für 5 min inkubiert. Dieser Schritt diente ebenso wie das sich anschließende Auftragen von 200 µl Farbsubstrat (TM3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten-Set) zur Darstellung der Arg-1-detektierenden Antikörper. Das Farbsubstrat wurde für 5-10 min unter Lichtausschluss inkubiert, die Farbreaktion wurde mikroskopisch untersucht und bei einem ausreichenden Farbumschlag durch einmaliges Waschen in TBS gestoppt. Anschließend erfolgte zur Darstellung des umgebenden Gewebes eine 10-minütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Gill. Die überschüssige Farblösung wurde unter fließendem Leitungswasser (10 min) entfernt. Zuletzt wurden die Schnitte mit 70 µl Kaisers-Glyceringelatine eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop betrachtet und repräsentative Abschnitte mittels Digitalkamera aufgenommen.

### 2.2.5.5 Immunhistochemische Färbung der NOS2

Die immunhistochemische Darstellung der NOS2 diente zur Abschätzung der Aktivität von Makrophagen in der Leber *T. cruzi*-infizierter Mäuse. Hierfür wurden die angefertigten Schnitte mit Xylol für 10 min entparaffiniert und in Aceton in absteigender Konzentration rehydriert (100%, 70%, 40%, je 10 min). Es folgte ein Waschschrift mit Leitungswasser und 3

Spülgänge mit TBS. Um das Gewebe für die Antikörper zu permeabilisieren, wurden die Schnitte für 2 min in Zitratpuffer im Schnellkochtopf gekocht. Nach 3-maligem Spülen mit TBS erfolgte die Blockierung der Peroxidase und Entfärbung von Erythrozyten durch 20-minütige Inkubation mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in TBS) unter Lichtausschluss. Nach 3-maligem Waschen in TBS folgte die Detektion der NOS2 mit polyklonalen Antikörpern (Tabelle 1), die in einem Volumen von 200 µl einzeln auf den Objektträger pipettiert und für 45 min in der feuchten Kammer im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach jeder Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch 3-maliges Spülen mit TBS entfernt. Als Primärantikörper diente an NOS2 bindendes αMaus-NOS2-IgG und als Sekundärantikörper an Peroxidase gekoppeltes αKaninchen-IgG. Als zweiter Sekundärantikörper diente zur Signalverstärkung an Peroxidase gekoppeltes αZiege-IgG. Zur Darstellung der NOS2-detektierenden Antikörper wurden nun 200 µl Farbsubstrat (TM3,3'-Diaminobenzidin Tabletten Set) hinzugegeben und dieses für 5-10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Farbreaktion wurde mikroskopisch untersucht und bei einem ausreichenden Farbumschlag durch einmaliges Waschen in TBS gestoppt. Anschließend erfolgte zur Darstellung des umgebenden Gewebes eine 3-minütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Gill. Die Farblösung wurde unter fließendem Leitungswasser (10 min) entfernt. Zuletzt wurden die Schnitte mit 70 µl Kaisers-Glyceringelatine eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop betrachtet und repräsentative Abschnitte mittels Digitalkamera aufgenommen.

### 2.2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 2.2.6.1 Isolation von *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) aus der Milz

Die bei -80°C gelagerten, schockgefrorenen Milzen (Kapitel 2.2.4) wurden in TriFast (1 ml pro 0,1 mg Organgewicht) angetaut und mit gekühlten Pistillen in einem Homogenisator homogenisiert. Die Homogenate wurden 5 min bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe gehalten und dann bei -80°C aufbewahrt oder zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

Zur Isolation von mRNA wurde 1 ml des Gewebehomogenates mit 100 µl 1-Bromo-3-chlorpropan versetzt, durch kräftiges Schütteln emulgiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 10400 rpm und 4°C. Das Homogenat war nun in 3 Phasen getrennt: eine untere Phenol-Phase, eine

Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteine enthaltende Interphase und eine obere, wässrige Phase mit isolierter mRNA, die in ein neues Röhrchen (RNase frei) überführt wurde. Da die Homogenate sehr proteinhaltig waren, wurde dieser Schritt so oft wiederholt, bis der Interphasering ganz verschwunden war. Allerdings diente nun Phenol/Chloroform als Trennmittel, das 1:1 mit den mit Aqua dest. auf 600 µl aufgefüllten wässrigen mRNA-Überstand verdünnt wurde. Zuletzt wurde die gewonnene reine mRNA-Phase mit eiskaltem Isopropanol für 15 min bei 4°C präzipitiert. Die ausgefällte mRNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation (10400 rpm, 4°C) in Form eines Pellets gewonnen. Dieses wurde 2-mal mit eiskaltem Ethanol (75%) gewaschen und jeweils für 10 min (10400 rpm, 4°C) zentrifugiert. Das gewaschene mRNA-Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend durch kurzes Erhitzen im Heizblock auf 55-60°C in 100 µl DEPC gelöst. Die Konzentration und Reinheit der mRNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt.

#### **2.2.6.2 Reverse Transkription**

Die isolierte mRNA wurde zur einfacheren Analyse und Handhabung in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 8 µl in DEPC gelöste mRNA (nicht mehr als 8 µg totale mRNA) mit 2 µl Oligo-dT-Nucleotiden für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Reverse-Transkriptionsmix und Inkubation bei 37°C für 90 min wurde die Reaktion durch 2-minütiges Kochen der Proben bei 95°C gestoppt. Die so gewonnene cDNA wurde mit Aqua B.Braun auf ein Volumen von 200 µl verdünnt und bei -80°C aufbewahrt oder für den weiteren Verbrauch bei 4°C gelagert.

#### **2.2.6.3 Bestimmung spezifischer Genexpressionen mittels LightCycler- *real time reverse transcription polymerase chain reaction* (real-time RT-PCR)**

Die gesuchte Gensequenz wurde mit Hilfe der im Mastermix enthaltenen spezifischen Primer (Tabelle 6) detektiert und durch die ebenfalls enthaltene Taq-Polymerase in Anwesenheit von ausreichend Dinuklotidtriphosphat amplifiziert. Die Amplifikation konnte mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR®-Green), der sich in die amplifizierte Doppelstrang-DNA integrierte, dargestellt werden. Hierfür wurden 9 µl des unmittelbar vorher zusammengesetzten Mastermixes in gekühlte, spezielle Glaskapillaren vorgelegt und je 1 µl cDNA oder Standard (eine der zu messenden Proben 1:2, 1:8, 1:32 und 1:128 verdünnt in Aqua B. Braum) hinzugegeben. Die Genexpression wurde nach kurzem Anzentrifugieren mit

Hilfe eines *Thermo Cyclers* bestimmt. Zur Kontrolle der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wurde am Schluss jeder Messung eine Schmelzkurve der entstandenen Produkte erstellt. Die Quantifizierung der zu analysierenden Proben erfolgte mit Hilfe der LightCycler-Software (Version 3.5). Den Standardverdünnungen wurden entsprechend der Verdünnungsreihe Expressionswerte zwischen 100 (unverdünnt) und 0,781 (1:128) zugeordnet. Aus den jeweiligen, nach Amplifikation der genspezifischen cDNA (mit Hilfe der Software) ermittelten, Schnittpunkten des logarithmischen Bereiches der Amplifikationskurve jeder einzelnen Standardverdünnung mit der vorher festgelegten Basislinie sowie den per Definition festgelegten Expressionswerten, wurde über lineare Regression eine Standardgerade ermittelt. Die Expressionswerte der zu analysierenden Proben wurden mittels der Standardgeraden relativ zu den Expressionswerten der Standardverdünnungen bestimmt. Zur Normalisierung dieser Werte wurden diese zu einem „house-keeping-gene“ (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase (*hprt*)) ins Verhältnis gesetzt und als relative Genexpression  $[1/hprt]$  angegeben. Zur Verdeutlichung wurden die somit ermittelten Werte von Tag 7 und Tag 14 in Bezug zu den Werten von Tag 0 gesetzt und als relative Induktion angegeben.

### **2.2.7 Herstellung von Einzelsuspensionen aus Geweben**

Die auf Eis gelagerten Organe wurden direkt in den BSL-3-Bereich des FZB überführt. Dort erfolgten alle weiteren Schritte.

#### **2.2.7.1 Herstellung von Einzelsuspensionen aus der Milz**

Die Milz wurde zur Herstellung von Einzelsuspensionen mit dem Stempel einer 5ml-Spritze durch ein Plastiksieb in eine Petrischale gedrückt. Das Sieb wurde mit ca. 10 ml DMEM- oder IMDM-Medium nachgespült und die so gewonnene Zellsuspension wurde für 10 min bei 320xg und 4°C zentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das so erhaltene Pellet in 5 ml kaltem RCLB-Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach maximal 3 min wurde zum Stoppen der Lyse 10 ml DMEM- oder IMDM-Medium hinzugegeben. Das nach 10-minütiger Zentrifugation (320xg, 4°C) erhaltene Pellet wurde je nach nachfolgender Untersuchung in 2 ml IMDM-Medium oder 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert.

### **2.2.7.2 Gewinnung von Mononukleären Zellen aus der Leber**

Zur Gewinnung von Mononukleären Zellen (MNZ) wurde die Leber mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch das Plastiksieb in eine Petrischale gedrückt. Sieb und Stempel wurden mit weiteren 10 ml PBS gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde für 10 min bei 370xg zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml reines HBSS aufgenommen. Die Trennung der einzelnen Zellschichten erfolgte mit 5,5 ml einer 2:1 mit Aqua-dist. verdünnten Iohexol-Lösung, welche der Zellsuspension zugeführt wurde. Diese Lösung wurde nun vorsichtig unter 2 ml reines HBSS gespritzt und 20 min bei 4°C und 670xg zentrifugiert. Die Schicht der MNZ wurde nach Absaugen des Mediums in ein frisches Röhrchen überführt und zum Waschen in Medium suspendiert und zentrifugiert (320xg, 4°C, 10 min). War die Leberperfusion nicht erfolgreich und das Pellet noch erythrozytenreich, erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mit RCLB-Puffer. Nach Resuspension des Pellet in 2 ml IMDM wurde die gewonnene Zellsuspension auf Eis gelagert.

### **2.2.7.3 Zählen der Zellen**

Die Zellzahl der jeweiligen Zellsuspension wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 oder seriell 1:100 mit Trypanblau verdünnt und auf die Neubauerkammer gegeben. Gezählt wurden die lebenden, nicht angefärbten Zellen.

## **2.2.8 Immunologische Untersuchungen**

### **2.2.8.1 Stimulation der Zellsuspensionen zur Aktivitätsbestimmung**

Zur Aktivierung der gewonnenen Leber-MNZ und Milzzellen wurden diese mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert. Hierfür wurden am Vortag die zur Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 vorgesehenen Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (24 Vertiefungen, Flachboden) mit 300 µl  $\alpha$ CD3/CD28 in in PBS (5 µg/ml) gefüllt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde reines PBS verwendet. Am Folgetag wurde die Lösung abgesaugt. In jede Vertiefung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 500 µl IMDM-Medium ausgesät. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 2% CO<sub>2</sub>. Nach 24 H wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.2.8.2 Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA

Zur Detektion der Aktivität von Milzzellen und Leber MNZ wurde in deren Überständen die Menge an freigesetzten Zytokinen nach Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 bestimmt. Die Quantifizierung der gebildeten Zytokine erfolgte mit unterschiedlichen ELISA-Systemen, die alle auf dem Sandwich-Prinzip beruhen. Die hierbei am Boden einer Mikrotiterplatte haftenden Primärantikörper binden die Zytokinmoleküle, die dann durch einen zweiten, an ein Enzymgekoppelten Antikörper detektiert werden. Die Zytokinkonzentration wird nun indirekt durch die enzymatische Umsetzung eines Substrates bestimmt. Die Absorption der Proben wurde bei 450 nm und einem Referenzwert von 630 nm mit Hilfe des ELISA-Lesegerätes bestimmt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software unter Einbeziehung der mitgemessenen Standardreihe. Die jeweilige Vorgehensweise je nach ELISA System erfolgte wie von den Herstellern angegeben:

DuoSet-ELISA (R&D Systems): Zur Beschichtung der 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte wurde in jede Vertiefung 50  $\mu$ l des Primärantikörpers zu angegebener Konzentration (Tabelle 4) in PBS verdünnt gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch 3-maliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt und die überschüssige Waschflüssigkeit auf Papierhandtüchern ausgeklopft, bis die Plattenböden trocken waren. Nun erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Zugabe von 250  $\mu$ l Blockierlösung und einstündiger abgedeckter Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen wurde je 50  $\mu$ l Überstand (Kapitel 2.2.8.1) in die Vertiefungen überführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe (1:3) rekombinanten Proteins (Tabelle 3) in DuoSet-Verdünnungspuffer. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur und 4-maligem Waschen wurde biotinylierter Sekundärantikörper (Tabelle 4) in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l (verdünnt in DuoSet-Verdünnungspuffer) aufgetragen und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 5-maliger Waschgang und das Auftragen von 50  $\mu$ l Streptavidin-Meerrettichperoxidase (1:200 in DuoSet-Verdünnungspuffer). Diese wurde nach 30-45 min Inkubation bei Raumtemperatur durch 6-maliges Waschen entfernt. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l Substratpuffer und Inkubation unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für ca. 5 min wurde die Farbreaktion optisch begutachtet und gegebenenfalls durch Zugabe von 100  $\mu$ l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt.

OPTEIA-ELISA (BD BIOSCIENCE): Zum Großteil verlief das Verfahren für OPTEIA-ELISA analog zu dem für DuoSetELISA. Nachfolgend werden nur die Änderungen beschrieben. Der Primärantikörper wurde in ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers und der Streptavidin-Meerrettichperoxidase (1:250 in *Assay-Diluent*) erfolgte jeweils für 1 Stunde bei Raumtemperatur. *Assay-Diluent* diente als Blockierlösung und als OPTEIA-Verdünnungspuffer. Als Substratlösung wurde ein Gemisch (1:1) aus den im *Substrate-Reagent-Set* enthaltenen Lösungen verwendet.

Pairs ELISA (BD BIOSCIENCE): Der Primärantikörper (verdünnt in ELISA-Beschichtungspuffer) wurde über Nacht bei 4°C oder für 4 h bei 37°C inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 2 h bei Raumtemperatur blockiert und nach dem Auftragen von Proben und Standard folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Der Sekundärantikörper (verdünnt in Pairs-Verdünnungspuffer) wurde für 2 h bei 37°C und die Streptavidin-Meerrettichperoxidase (1:1000 in Pairs-Verdünnungspuffer) für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Als Substratlösung wurde ein Gemisch (1:1) aus den im Substrate-Reagent-Set enthaltenen Lösungen verwendet.

### 2.2.8.3 Intrazelluläre Detektion von Zytokinen mittels Durchflusszytometrie

Zur polyklonalen Stimulation der Einzellsuspension (Kapitel 2.2.7) wurden am Vortag 300 µl αCD3/CD28 in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS auf einer Mikrotiterplatten (24 Vertiefungen, Flachboden) auspipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Nach Absaugen der Lösung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml IMDM-Medium pro Vertiefung ausgesät und 1 µl GolgiPlug<sup>TM</sup> hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet, in ein FACS Röhrchen überführt und nach Zugabe von 1 ml *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Puffer für 8 min bei 320xg und 4°C zentrifugiert. Bei allen folgenden Waschvorgängen wurde ebenso verfahren. Das Pellet wurde in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und nochmals gewaschen. Zur Bestimmung der nicht antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde das Pellet in 50 µl Fc-Blockierlösung suspendiert und für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Blocklösung wurde abgewaschen und die oberflächliche Markierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von je 50 µl αCD4- und αCD44-Antikörperlösung und 30-minütiger Inkubation (4°C, dunkel). Im Anschluss an einen weiteren Waschvorgang wurde die Zellmembran durch

Zugabe von 250 µl Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>-Puffer und Inkubation für 20 min bei 4°C permeabilisiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch 2-maliges Waschen entfernt. Diese und alle weiteren Waschvorgänge erfolgten mit Perm/Wash<sup>TM</sup>-Puffer an Stelle des vorher verwendeten FACS-Puffers. Zur intrazellulären Färbung der Zytokine wurden die Zellen mit 100 µl der jeweiligen Zytokin-Antikörperlösung (Tabelle 5) versetzt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten Waschgang wurden die Zellen in 300 µl PFA (1%) aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Messung wurde an einem mit einem 488 nm Argon-Laser und einem 635 nm roten Dioden-Laser ausgerüsteten Durchflusszytometer durchgeführt. Die endgültige Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes CellQuest<sup>TM</sup>Pro.

#### **2.2.8.4 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Serum mittels *Cytometric Bead Array***

Die Bestimmung der Konzentration von IFN $\gamma$ , TNF und IL-12/23p40 im Serum *T. cruzi*-infizierter Mäuse erfolgte mit Hilfe eines CBA-Systems. Dieses basiert auf synthetisch hergestellten kugelförmigen Teilchen, so genannten *Beads*, die Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin tragen. Die Zytokin-bindenden *Beads* werden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und ihre Konzentration wird durchflusszytometrisch bestimmt.

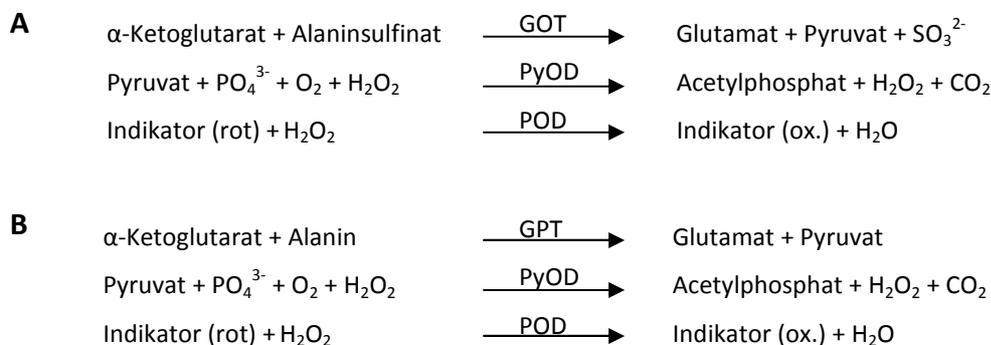
Zur Bestimmung der IFN $\gamma$ - und TNF- Konzentration im Serum wurden das *Mouse/Rat-Soluble-Protein-Master-Buffer-Kit* und die *CBA-Flex-Sets* für IFN $\gamma$  und TNF von BD BIOSCIENCE verwendet (Kapitel 2.1.7.6). Verfahren wurde wie vom Hersteller empfohlen. 50 µl des aufgetauten Serums oder Standards wurden in einer 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatte mit 50 µl *Bead-Mischung* (je 1 µl *Bead-Lösung* der verwendeten *Flex-Sets* verdünnt in *Capture-Bead-Diluent*) vermischt und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Als Standard diente die mitgelieferte Standardlösung seriell 1:2 in *Assay-Diluent* verdünnt. Danach folgte zur Entfernung überschüssiger Serumbestandteile eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 270xg, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 200 µl Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang erfolgte 2 mal. Zur Detektion der *Beads* wurden nun 50 µl Detektions-Reagenz (enthält je 1 µl *PE-Detection-Reagent* pro verwendetem *Flex-Set* verdünnt in *PE-Detection-Reagent-Diluent*) hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss wurde nicht gebundenes Detektions-Reagenz durch 2-maliges Waschen, wie bereits geschildert, entfernt. Die

gewaschenen *Beads* wurden in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometer analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit einer speziell entwickelten Software (FCAP-Array™) ausgewertet.

Da zur Bestimmung von IL-12/23p40 kein *Flex-Set* zur Verfügung stand, wurden hierfür im Labor hergestellte Maus-IL-12/23p40-*Beads* verwendet. Die Vorgehensweise entsprach der bereits für IFN $\gamma$  und TNF beschriebenen. Allerdings diente als Standard 10.000 pg/ml rekombinantes Maus-IL-12/23p40 (Tabelle 3) in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit *Assay-Diluent*. An Stelle des Detektion-Reagens wurde ein Biotin-Streptavidin-PE-Mix (je 0,2 µl biotinylierter IL-12/23p40-Antikörper (Tabelle 4) und je 0,33 µl Streptavidin-PE in *Assay-Diluent*) verwendet, der 1 h vor der Färbung angesetzt und für diese Zeit bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert wurde.

### 2.2.9 Bestimmung der Transaminasenkonzentration im Serum

Zur Abschätzung des Leberschadens *T. cruzi*-infizierter Mäuse wurden die Transaminasen GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) und GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) mit Hilfe des Reflotrons® bestimmt.



**Abb. 4 Reaktionsformeln der GOT- und GPT-Teststreifen.** Reaktionsformeln für die Konzentrationsermittlung von GOT (A) und GPT (B) im Serum mittels Teststreifen von Reflotron®. Die Formeln stammen aus der Gebrauchsanweisung der jeweiligen Teststreifen.

Hierfür wurden 30 µl Serum auf einen eigens für dieses Gerät hergestellten Indikatorstreifen gegeben. Dieser Streifen wurde im Reflotron® ausgewertet, wobei in beiden Fällen die enzymatische Pyruvatbildung (durch GPT oder GOT) nach vorheriger Eliminierung endogenen Pyruvats, durch einen Farbumschlag des Indikators ermittelt wird. Abb. 4 zeigt die jeweiligen im Reflotron® ablaufenden Reaktionswege.

### 2.2.10 Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der in der vorliegenden Arbeit angegebenen Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 berechnet. Auch die statistische Auswertung erfolgte mit diesem Programm, wobei die Ermittlung der Signifikanz über den Student's t-Test (two tailed, Konfidenz-Intervall 95%) und die statistische Analyse der Überlebensrate über den Log-Rank-Test erfolgte. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* (entspricht  $p < 0.05$ ); \*\* (entspricht  $p < 0.01$ ); \*\*\* (entspricht  $p < 0.001$ ).

### 3 Ergebnisse

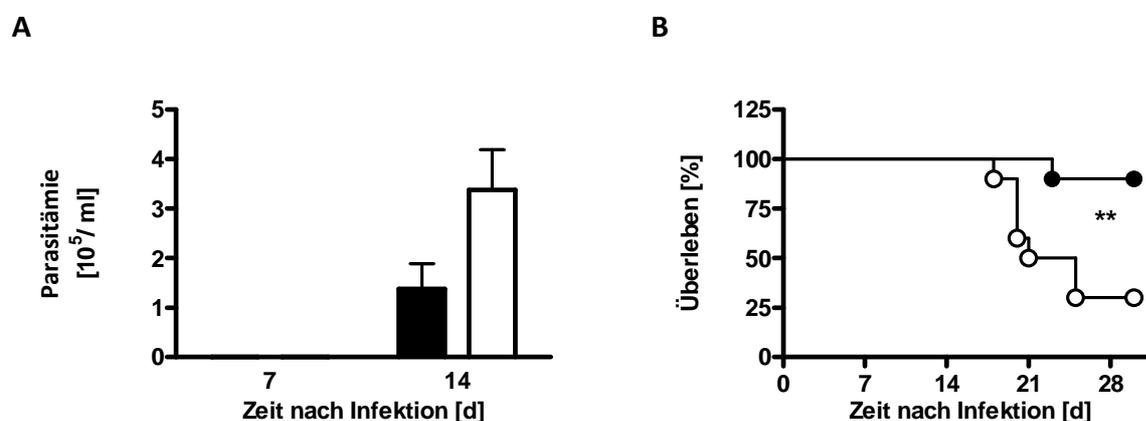
#### 3.1 Die Bedeutung von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi*

Kurz nach Beginn dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* untersucht. Hierbei führte die Deletion eines Kininrezeptors (B2R) zu einer gesteigerten IL-17A-Produktion, die mit einer vermehrten Anfälligkeit gegen *T. cruzi* einherging (Monteiro et al. 2007). Um Näheres über die direkte Funktion von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* zu erfahren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse i.p. mit *T. cruzi* infiziert und der Infektionsverlauf mit dem in Wildtypmäusen verglichen.

##### 3.1.1 Die Auswirkung der Deletion von IL-17A auf Infektionsverlauf und Pathologie

###### 3.1.1.1 IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse sind suszeptibel gegenüber der Infektion mit *T. cruzi*

Zur Bestimmung des Infektionsverlaufes von *T. cruzi* in C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgte die Ermittlung der Parasitämie aus 3µl Schwanzblut 7 und 14 Tage nach der i.p. Infektion mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi* Blut-Trypomastigoten.



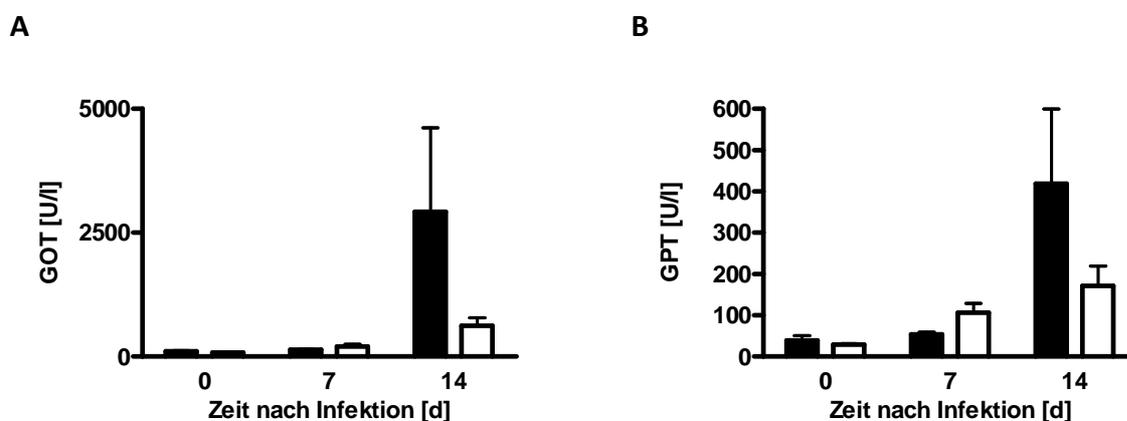
**Abb. 5** Parasitämie und Überlebensrate in *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. (A) Die Parasitämie wurde an Tag 7 und Tag 14 aus 3µl Schwanzblut mikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment. (B) Die Sterblichkeit der Mäuse wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist die Überlebensrate von 10 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment. (Statistik: \*\*: p< 0,01; Log Rank Test)

In beiden Mausstämmen konnten erst 14 Tage nach Infektion mikroskopisch Parasiten im Blut festgestellt werden. Hierbei fiel die Parasitämie in Wildtypmäusen deutlich, wenn auch

nicht signifikant geringer als in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 5A). Das Unvermögen der IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse, die Parasiten adäquat einzudämmen, wirkte sich auch signifikant auf das Überleben dieser Mäuse aus (Abb. 5B). So überlebten 90% der C57Bl/6 Mäuse den 28. Tag der Infektion. Zum selben Zeitpunkt waren nur noch 25% der IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse am Leben.

### 3.1.1.2 Verringerte Leberpathologie in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen

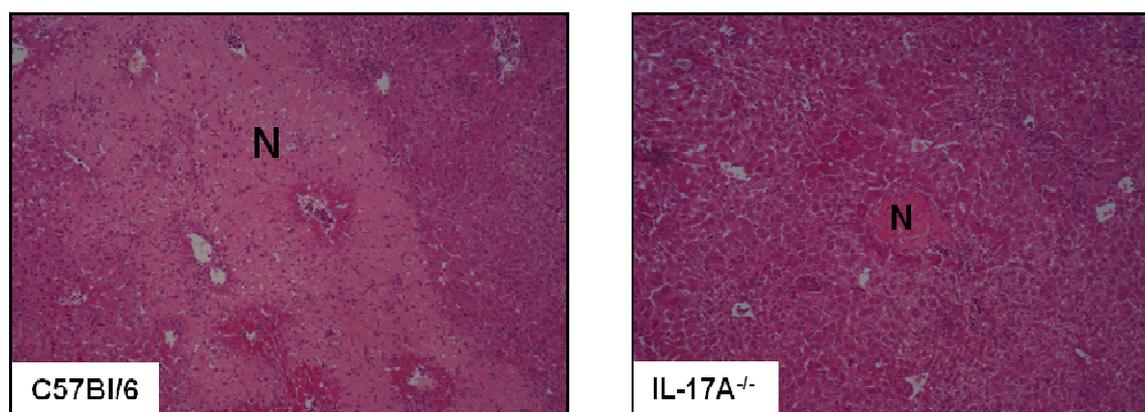
Im murinen Infektionsmodell mit *T. cruzi* geht die akute Phase der Infektion für gewöhnlich mit einer gesteigerten Leberzelldestruktion einher (Palhares et al. 1988; Carrera-Silva et al. 2008). Ein Leberschaden kann über die Leberenzyme GOT und GPT abgeschätzt werden, die bei einer Schädigung von Leberzellen in das Blut gelangen und die Serumkonzentration dieser Transaminasen korreliert positiv mit dem Ausmaß der Leberzelldestruktion. Um zu ermitteln, inwiefern sich die Deletion von IL-17A auf die Leberpathologie in *T. cruzi*-infizierten Mäusen auswirkt, wurden C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse mit 10<sup>4</sup> Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Sieben und 14 Tage nach der Infektion erfolgte die Bestimmung der Transaminasenkonzentration im Serum der Mäuse.



**Abb. 6 Abschätzung des Leberschadens anhand der Transaminasenkonzentration im Serum von C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 1x10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Vor Infektion und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und mit Hilfe des *Reflotron* die Konzentration von GOT (A) und GPT (B) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 bis 5 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment.

In C57Bl/6 Mäusen stiegen die Leberenzyme erst 14 Tage nach der Infektion beträchtlich an. Hierbei war in C57Bl/6 Mäusen die Konzentration von GOT auf das 30-fache (Abb. 6A) und die Konzentration von GPT auf das 10-fache (Abb. 6B) der Enzymkonzentrationen nicht-infizierter Mäuse gestiegen. Im Gegensatz hierzu begann der Transaminasenanstieg in

IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen bereits 7 Tage nach Infektion. Er verlief jedoch weniger steil, so dass die GOT- und GPT-Konzentration an Tag 14 in C57Bl/6 Mäusen im Mittel 5 bzw. 2,5 mal stärker ausfiel als in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. Trotz fehlender Signifikanz weisen diese Ergebnisse zumindest an Tag 14 auf eine geringere Leberpathologie in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen hin. Diese Annahme bestätigte sich in der histologischen Untersuchung der Lebern von C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierbei erfolgte 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* die Entnahme der Lebern. Es wurden Gewebeschnitte hergestellt und diese mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt.



**Abb. 7** Histologische Darstellung des Leberschadens von C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert und nach 14 Tagen die Lebern präpariert. Nach Fixierung in 4% Formalin wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Originalvergrößerung: 40-fach). N: Nekrose. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus einem Experiment mit 5 Mäusen pro Genotyp.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Schnitte konnten in C57Bl/6 Mäusen vermehrt Entzündungszellinfiltrate und mittel- bis großflächige Nekrosen als Zeichen einer Leberentzündung mit deutlicher Leberzelldestruktion beobachtet werden. Dieselben entzündlichen Veränderungen traten auch in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen auf, allerdings in geringerer Zahl und geringerem Ausmaß (Abb. 7). Zusammengenommen können diese Ergebnisse als Anzeichen einer verminderten Leberpathologie in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen gewertet werden.

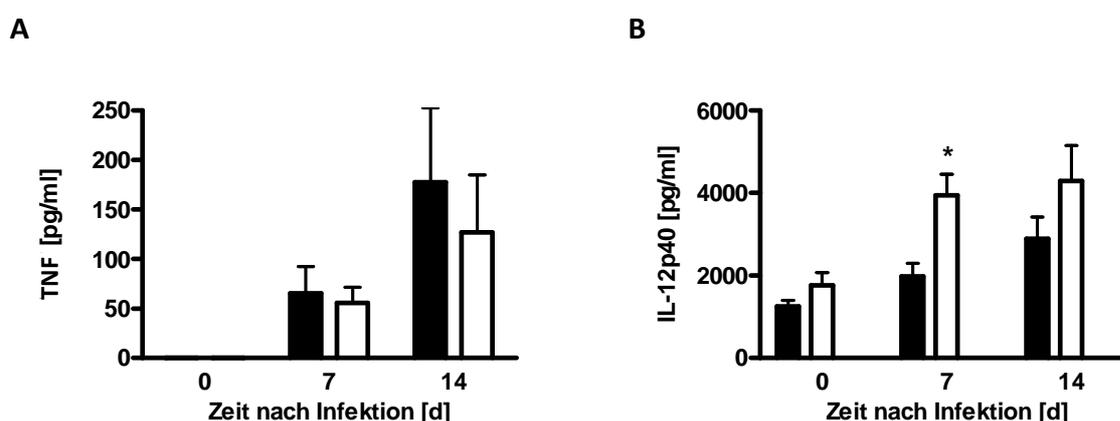
### 3.1.2 Die Auswirkung der Deletion von IL-17A auf die Immunantwort

Bisher zeigten *T. cruzi*-infizierte IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse einen suszeptiblen Phänotyp mit verringerter Leberpathologie in der frühen Phase der Infektion. Um zu erfahren, welche immunologischen Faktoren zu diesem Phänotyp beitragen, wurden im Folgenden die

Parameter der Immunantwort untersucht, die an der Verteidigung gegen *T. cruzi* maßgeblich beteiligt sind.

### 3.1.2.1 Die proinflammatorische Zytokinantwort in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen

Proinflammatorische Entzündungsmediatoren wie TNF oder IL-12 sind Voraussetzung für eine effiziente Immunantwort gegen *T. cruzi* (Aliberti et al. 1996; Hunter et al. 1996; Lima et al. 1997). In zu hoher Konzentration können sie jedoch auch autoaggressiv wirken (Hölscher et al. 2000; Paiva et al. 2003). Um bessere Erkenntnisse über die Auswirkung der Deletion von IL-17A auf die proinflammatorische Immunantwort gegen *T. cruzi* zu gewinnen, wurden C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse i.p. mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi* Blut-Trypomastigoten infiziert. Sieben und 14 Tage nach Infektion wurde die systemische Konzentration von TNF und IL-12/23p40 im Serum dieser Mäuse mittels CBA bestimmt.



**Abb. 8** TNF und IL-12/23p40-Konzentration im Serum von mit *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 1x10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und die Konzentration von TNF (A) und IL-12/23p40 (B) im Serum mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 bis 5 Mäusen pro Genotyp. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. (Signifikanz: \*: p<0,05; Student's t-Test)

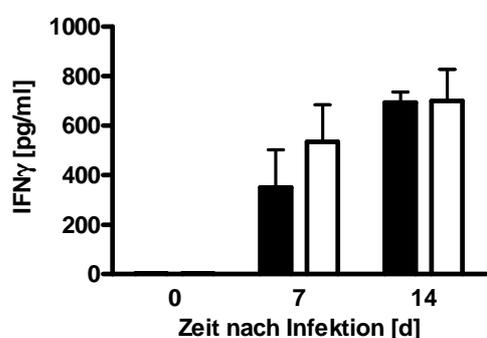
Als Antwort auf die Infektion mit *T. cruzi* stieg die Konzentration von TNF in beiden Mausstämmen kontinuierlich an und lag 14 Tage nach Infektion bereits doppelt so hoch wie an Tag 7. Hierbei bestand zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 8A).

Auch die IL-12/23p40-Konzentration stieg im Verlauf der Infektion in beiden Mausstämmen kontinuierlich an. In C57Bl/6 Mäusen fiel der Gehalt von IL-12/23p40 im Serum jedoch zu allen Zeitpunkten geringer aus als in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. Der größte Unterschied bestand 7

Tage nach der Infektion. Hier überstieg die IL-12/23p40-Konzentration in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen die der C57Bl/6-Kontrollen um fast das Doppelte (Abb. 8B).

### 3.1.2.2 Unveränderte IFN $\gamma$ -Produktion in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen

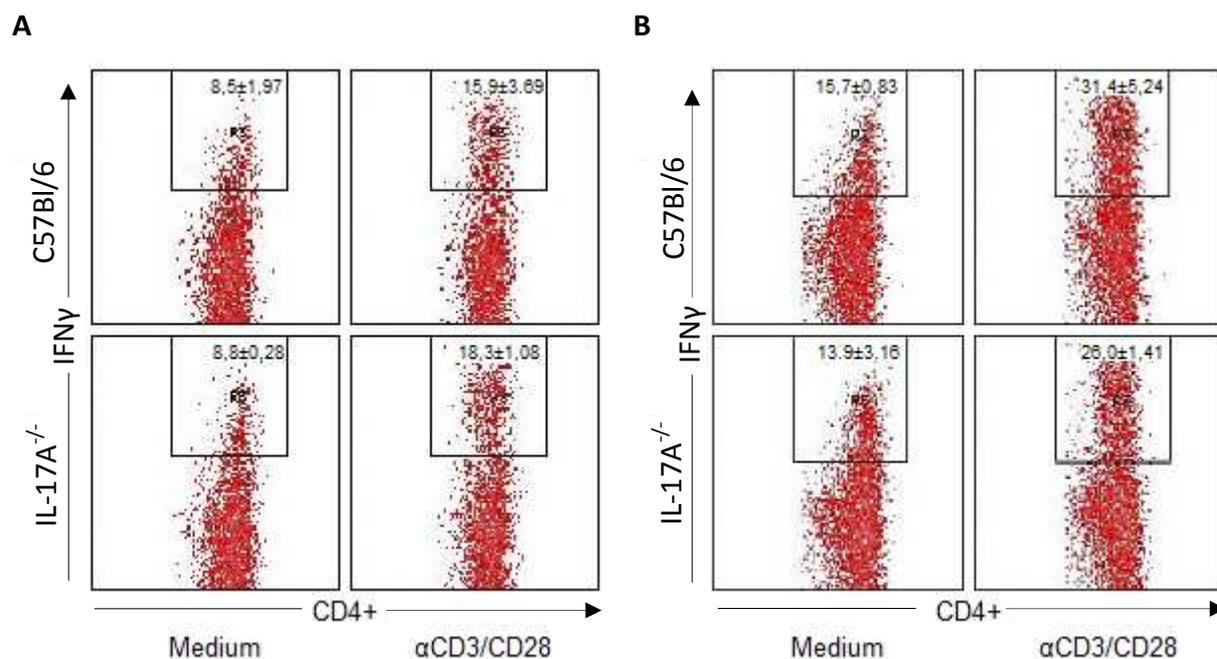
Die IFN $\gamma$ -vermittelte Th1-Immunantwort trägt in der Infektion mit *T. cruzi* entscheidend zur Parasitenelimination und Resistenzentwicklung bei (McCabe et al. 1991; Torrico et al. 1991; Hölscher et al. 1998; Hoft und Eickhoff 2005). Zur Untersuchung des Einflusses der IL-17A Deletion auf die Produktion von IFN $\gamma$  wurden C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse i.p. mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten infiziert. Zunächst erfolgte 7 und 14 Tage nach Infektion die Bestimmung der systemischen IFN $\gamma$ -Konzentration aus dem Serum dieser Mäuse mittels CBA.



**Abb. 9 IFN $\gamma$  Konzentration im Serum von mit *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen.** C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und die Konzentration von IFN $\gamma$  im Serum mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 bis 5 Mäusen pro Genotyp. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

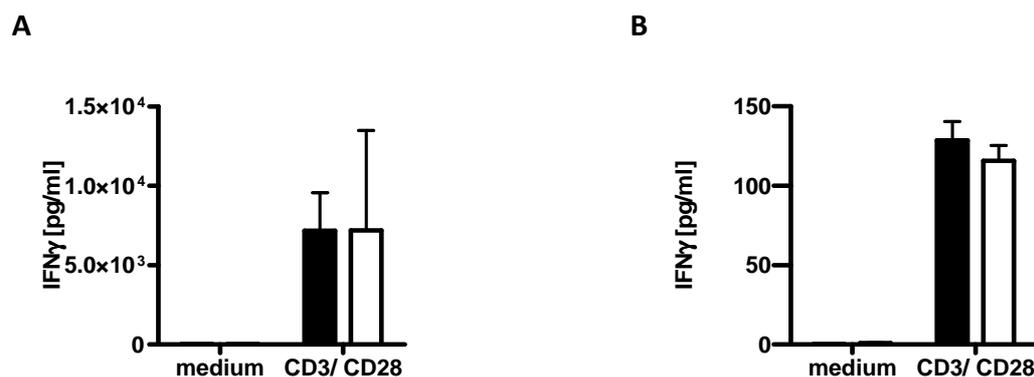
Als Zeichen einer funktionierenden Aktivierung IFN $\gamma$ -produzierender Zellen in der systemischen Immunreaktion gegen *T. cruzi*, war in beiden Stämmen ein deutlicher Anstieg der IFN $\gamma$ -Konzentration sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 nach Infektion festzustellen. Ein Unterschied zwischen C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb.9).

Im Anschluss folgte die Bestimmung der Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen in der Milz und Leber von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierfür wurden 14 Tage nach Infektion die Organe entnommen, Zellsuspensionen hergestellt und diese für 4 h mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert. Die Frequenz der mit intra- und extrazellulären Antikörpern gefärbten CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ -enthaltenden T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie dargestellt.



**Abb. 10** Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in Milz und Leber von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Nach 14 Tagen erfolgte die Analyse der Frequenz an intrazellulär IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in der Milz (A) und Leber (B), nach 4-stündiger Stimulierung mit Medium bzw.  $\alpha$ CD3/CD28, mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Mäusen je Genotyp in % aller CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Bereits ohne Stimulation konnte in beiden Organen sowohl in C57Bl/6 als auch in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen eine große Zahl an IFN $\gamma$ -produzierenden T-Zellen gefunden werden. Durch die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 steigerte sich die Frequenz der CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen in beiden Organen noch einmal um das Doppelte. Auch hier entsprachen die Werte der C57Bl/6 Mäuse den Werten von IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 10). Da die Frequenz an IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen noch nicht zwangsläufig etwas über die Aktivität dieser Zellen aussagt, wurde zusätzlich die Aktivität IFN $\gamma$ -produzierender Milzzellen mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden 7 und 14 Tage nach Infektion Milzen aus C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen entnommen. Die gewonnenen Einzelsuspensionen wurden für 24 h mit Medium oder  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert. Der Gehalt an IFN $\gamma$  in den abgenommenen Überständen entsprach der Menge an IFN $\gamma$ , das in dieser Zeit durch Th-Zellen produziert wurde. Zu beiden Zeitpunkten wurde die IFN $\gamma$ -Produktion der Th-Zellen beider Mausstämmen durch die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 stark angeregt. Ein Unterschied zwischen C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen war auch hier zu keinem Zeitpunkt feststellbar (Abb. 11).

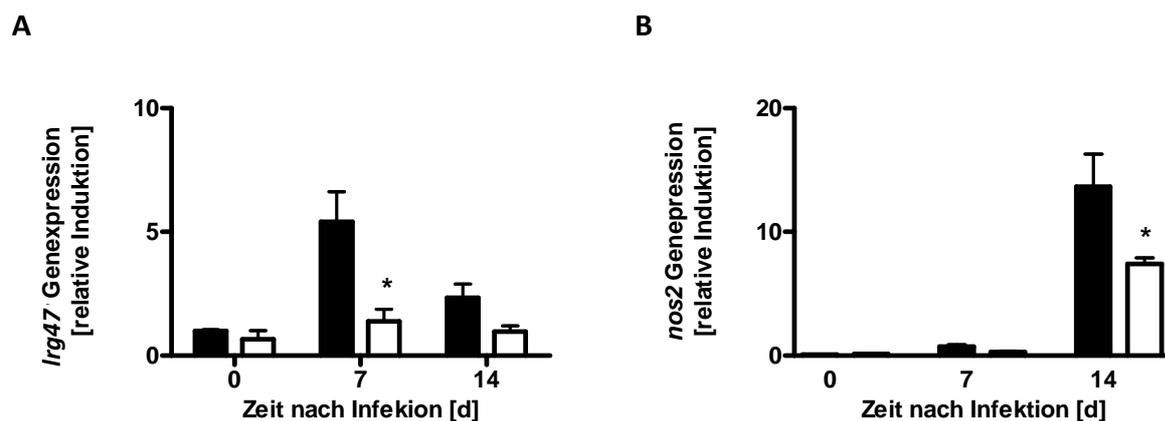


**Abb. 11 IFN $\gamma$  Sekretion in der Milz von C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die IFN $\gamma$ -Sekretion durch Milzzellen wurde mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden 7 (A) und 14 (B) Tage nach der Infektion Milzen entnommen, Zellen isoliert und für 24 h mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Mäusen je Genotyp.

Die Deletion von IL-17A hat demnach in der Infektion mit *T. cruzi* keinen Einfluss auf die systemische oder lokale Produktion von IFN $\gamma$ .

### 3.1.2.2 Die IFN $\gamma$ -abhängige Makrophageneffektorfunktionen in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen

Wie bereits beschrieben, führen über IFN $\gamma$  klassisch aktivierte Makrophagen wichtige Effektorfunktionen in der Verteidigung gegen *T. cruzi* aus. Hierbei tragen vor allem die IFN $\gamma$ -gesteuerten Enzyme LRG47 und NOS2 zur Eliminierung des Parasiten bei (Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998; Santiago et al. 2005). Zur Überprüfung der klassischen Makrophagenfunktionen wurde in *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen die mRNA-Expression von NOS2 und LRG47 ermittelt. Hierfür erfolgte 7 und 14 Tage nach der i.p. Infektion mit  $10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten die Entnahme der Milzen. Diese wurden schockgefroren. Später folgte die Isolierung von mRNA aus den gefrorenen Organen und die Bestimmung der jeweiligen Genexpression mittels *real time* RT-PCR. Die Expression von *Irg47* lag in C57Bl/6 Mäusen 7 Tage nach Infektion signifikant über den Werten nicht-infizierter Kontrollen. An Tag 14 nach Infektion war die Menge an exprimiertem *Irg47* bereits wieder annähernd auf das Ausgangsniveau gesunken. Im Gegensatz hierzu wurde in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen kaum *Irg47* exprimiert. Hierdurch lag die Expression von *Irg47* in C57Bl/6 Mäusen 7 Tage nach Infektion signifikant über der *Irg47*-Expression in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 12A).



**Abb. 12** Produktion von *Irg47* und *nos2* in der Milz von C57Bl/6 und IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6 (●) und IL-17A<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die Genexpression von *Irg47* (A) und *nos2* (B) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in der Milz mittels quantitativer *real time* RT-PCR auf die Expression von *hprt* normalisiert und auf die Expression nicht-infizierter Mäuse bezogen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ ; Student's t-Test)

Die Expression von *nos2* setzte erst eine Woche später ein. So war erst 14 Tage nach Infektion eine deutliche Steigerung der *nos2*-Expression zu erkennen. Auch hier fiel die *nos2*-Expression in C57Bl/6 Mäusen signifikant höher aus als in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 12B).

Trotz einer unveränderten IFN $\gamma$ -Produktion kam es in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer verminderten Expression der Gene für die Makrophagen Effektorenzyme LRG47 und NOS2. Diese Ergebnisse lassen eine IFN $\gamma$ -unabhängige Induktion dieser Enzyme durch IL-17A vermuten, welche für die erhöhte Suszeptibilität der IL-17<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber einer *T. cruzi*-Infektion verantwortlich sein könnte.

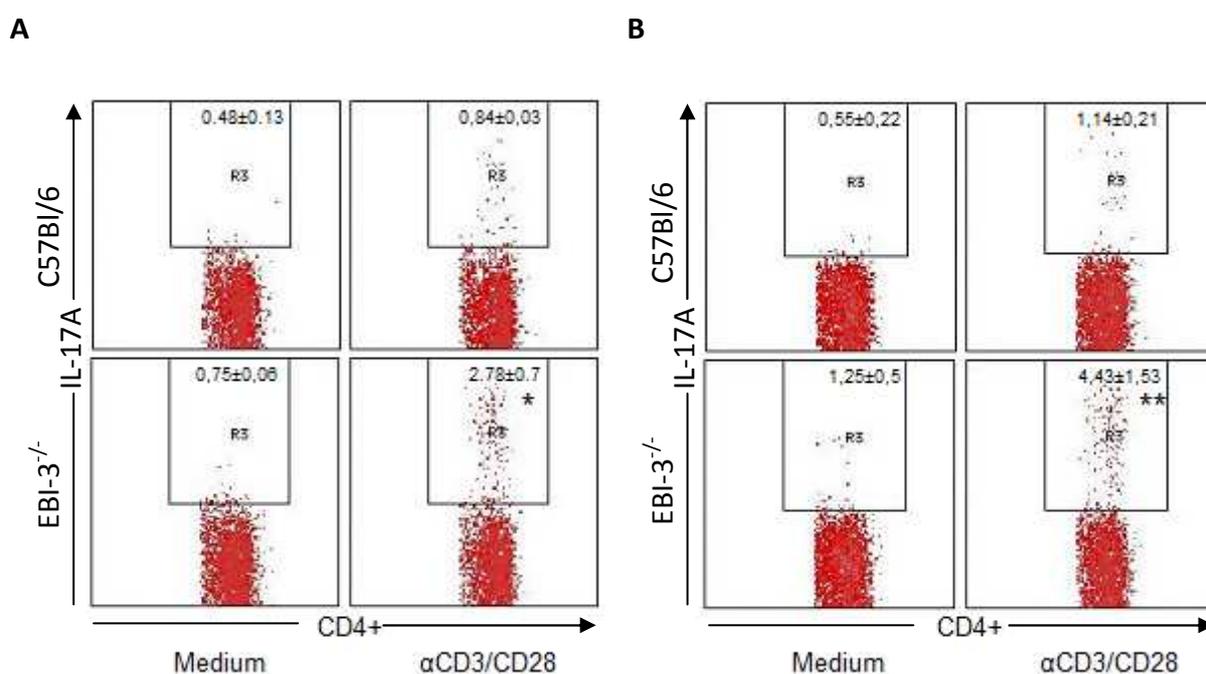
### 3.2 Die Bedeutung der IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi*

Die EBI-3-haltigen Zytokine IL-27 und IL-35 haben einen stark regulierenden Einfluss auf die Entwicklung von IL-17A-produzierenden Th17-Zellen (Stumhofer et al. 2006; Fitzgerald et al. 2007; Diveu et al. 2009). Um herauszufinden, zu welchem Phänotyp die Deletion von EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* führt und auf welche Weise die Immunantwort gegen diesen Parasiten durch die Abwesenheit von EBI-3 beeinflusst wird, erfolgte eine Untersuchung des Infektionsverlaufes in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen.

### 3.2.1 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die IL-17A-Produktion

Die hemmende Wirkung von EBI-3 auf die IL-17A-Produktion wurde bereits für manche Infektions- und Autoimmunkrankheiten belegt (Yang et al. 2008; Tong et al. 2010). Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in der Infektion mit *T. cruzi* bewahrheitet, erfolgte die Ermittlung der IL-17A-Produktion in *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen.

Zunächst wurde die Frequenz IL-17A-produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-T-Zellen in den Milzen und Lebern dieser Mäuse ermittelt. Hierfür erfolgte 7 Tage nach Infektion in C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen die Organentnahme und die Herstellung von Einzellsuspensionen, die für 4 h mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert wurden. Nach der Färbung der Zellen mit intra- und extrazellulären Antikörpern wurde die Frequenz an CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, IL-17A-produzierenden T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

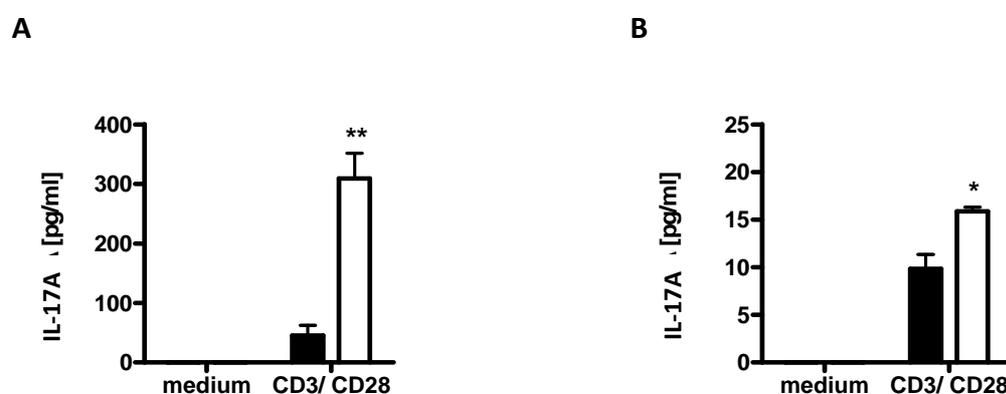


**Abb. 13** Frequenz IL-17A-produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in Milz und Leber von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Nach 14 Tagen erfolgte die Analyse der Frequenz intrazellulär IL-17A-produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in der Milz (A) und Leber (B), nach 4-stündiger Stimulierung mit Medium bzw.  $\alpha$ CD3/CD28, mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Mäusen je Genotyp in % aller CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. (Signifikanz: \*: p<0,05, \*\*: p<0,01; Student's t-Test)

In beiden Mausstämmen konnte die Frequenz der IL-17A-produzierenden Th-Zellen durch Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 sowohl in der Leber als auch in der Milz gesteigert werden.

Allerdings fiel in C57Bl/6 Mäusen die Frequenz IL-17A-produzierender Th-Zellen nach Stimulation im Vergleich zu EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen wesentlich geringer aus (Abb. 13). So stieg die Frequenz der IL-17A-produzierenden Zellen in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Stimulation signifikant in der Milz auf das Dreifache und in der Leber auf das Vierfache der jeweiligen C57Bl/6 Kontrollmäusen an.

Im Anschluss wurde die Aktivität der IL-17A-produzierenden Milzzellen in C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen überprüft. Sieben und 14 Tage nach Infektion mit *T. cruzi* wurden die hierfür isolierten Milzzellen 24 h mit Medium oder  $\alpha$ CD3/CD28 inkubiert. Die Messung der IL-17A-Konzentration in den Überständen erfolgte mittels ELISA.



**Abb. 14 IL-17A-Sekretion in der Milz von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurde mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die IL-17A-Sekretion durch Milzzellen wurde nach Restimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurde 7 (A) und 14 (B) Tage nach der Infektion die Milz entnommen, Milzzellen isoliert und 24 h stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Mäusen je Genotyp. (Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; Student's t-Test)

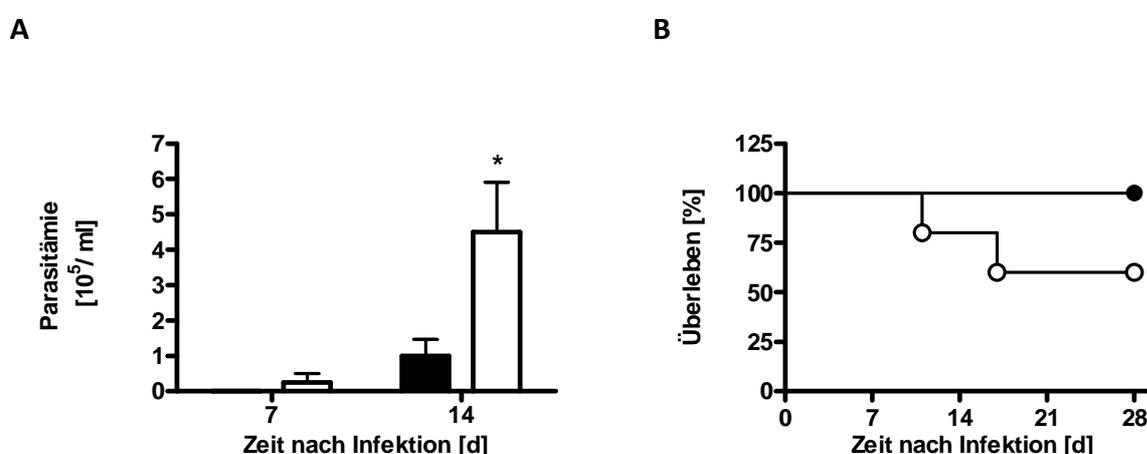
C57Bl/6 Th17-Zellen ließen sich genau wie EBI-3<sup>-/-</sup> Th17-Zellen sowohl 7 als auch 14 Tage nach Infektion durch  $\alpha$ CD3/CD28 zu einer Produktion von IL-17A anregen. Im Vergleich zu C57Bl/6 Th17-Zellen war die Produktion von IL-17A durch EBI-3<sup>-/-</sup> Th17-Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht (Abb. 14). Wie bereits in anderen Infektionskrankheiten beschrieben, führt die Deletion von EBI-3 also auch in der Infektion mit *T. cruzi* zu einer gesteigerten IL-17A-Produktion durch stimulierte Th17-Zellen.

### 3.2.2 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf Infektionsverlauf und Pathologie

Nachdem die Deletion von EBI-3 also auch in der Infektion mit *T. cruzi* zu einer gesteigerten IL-17A-Produktion führte, wurde nun überprüft, in welcher Weise sich diese Deletion auf den Infektionsverlauf und die Pathologie in der Infektion mit *T. cruzi* auswirkt.

#### 3.2.2.1 EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse sind suszeptibel gegenüber der Infektion mit *T. cruzi*

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten infiziert und deren Parasitämie 7 und 14 Tage nach Infektion mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer bei 20-facher Vergrößerung bestimmt.



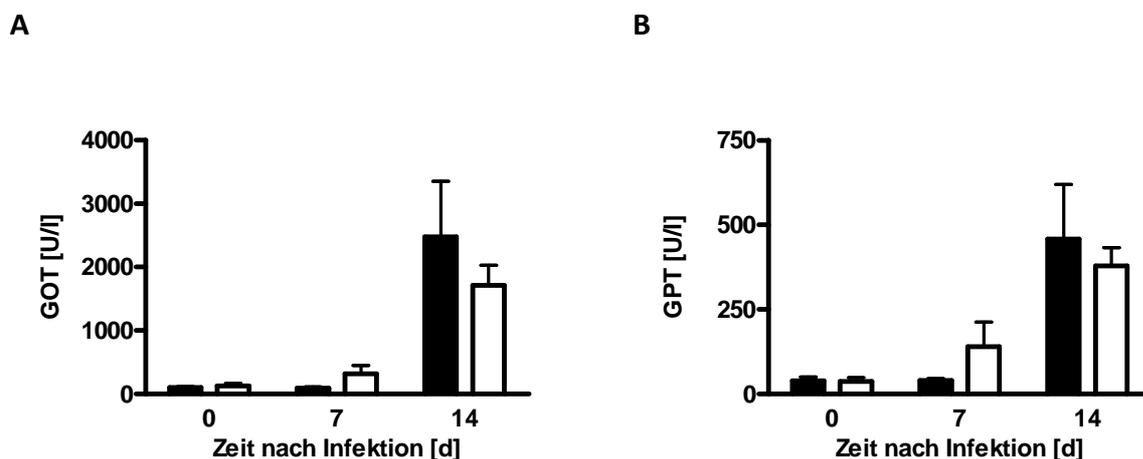
**Abb. 15 Parasitämie in *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen.** C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. (A) Die Parasitämie wurde an Tag 7 und Tag 14 aus 3µl Schwanzblut mikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment. (B) Die Sterblichkeit der Mäuse wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist die Überlebensrate von 5 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment. (Statistik: \*: p < 0,05; Student's t-Test)

In C57Bl/6 Mäusen war erst 14 Tage nach Infektion ein Anstieg der Parasitämie zu erkennen. Im Gegensatz hierzu waren im Blut der EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse bereits 7 Tage nach Infektion einige Parasiten detektierbar. Im Verlauf stieg die Parasitämie in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen rasch an, so dass sie 14 Tage nach Infektion bereits das ca. 5-fache der C57Bl/6 Kontrollen erreichte (Abb. 15A). Die signifikant gesteigerte Parasitämie in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen spiegelte sich auch in der Überlebensrate dieser Mäuse wider. Während alle C57Bl/6 Mäuse den 28. Tag nach Infektion mit *T. cruzi* überlebten, waren an diesem Tag nur noch 60% der *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse am Leben (Abb. 15B). Auch wenn dieser Unterschied zwischen C57Bl/6 und

EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen keine Signifikanz erreichte, spricht dieses Ergebnis in Kombination mit der Parasitämie trotzdem für eine vermehrte Suszeptibilität von EBI3<sup>-/-</sup> Mäusen in der Infektion mit *T. cruzi*.

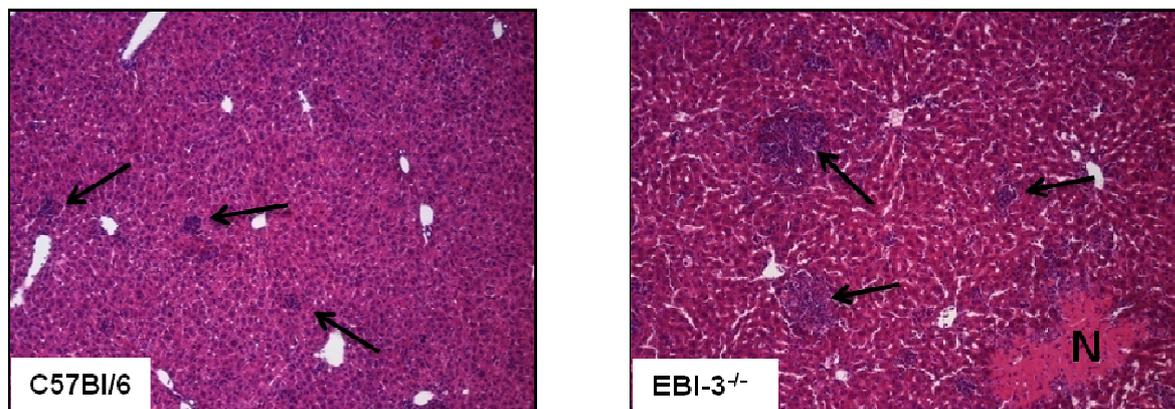
### 3.2.2.2 Gesteigerte Leberpathologie in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

Das Ausmaß des Leberzellschadens wurde mit Hilfe der Serumkonzentration von GOT und GPT in C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen 7 und 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* bestimmt. In C57Bl/6 Mäusen führte die Infektion mit *T. cruzi* erst nach 14 Tagen zu einem deutlichen Anstieg beider Transaminasen (Abb. 16). Im Gegensatz hierzu konnte in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen bereits 7 Tage nach Infektion eine erhöhte Transaminasenkonzentration festgestellt werden, die im Verlauf noch weiter anstieg. So fiel die Transaminasenkonzentration in C57Bl/6 Mäusen zumindest an Tag 7 etwas niedriger aus als in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. Da der Unterschied zwischen beiden Mausstämmen jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant ausfiel, erfolgte zusätzlich die histologische Einschätzung der Leberpathologie. C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen wurden hierfür 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* die Lebern entnommen, Paraffinschnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Der Grad des Leberschadens wurde mikroskopisch über die Anzahl und Größe von Zellinfiltraten und Nekrosen abgeschätzt.



**Abb. 16** Abschätzung des Leberschadens anhand der Transaminasenkonzentration im Serum von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Vor Infektion und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und mit Hilfe des *Reflotron* die Konzentration von GOT (A) und GPT (B) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 bis 5 Mäusen pro Genotyp aus einem durchgeführten Experiment.

In beiden Mausstämmen waren vereinzelte kleine Zellinfiltrate als Zeichen einer beginnenden Entzündung zu erkennen (Abb. 17A). Im Vergleich mit C57Bl/6 Mäusen fielen diese Ansammlungen eingewanderter Entzündungszellen in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch größer und vielzähliger aus (Abb. 17B). Außerdem konnten in einigen Lebern von EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen auch Nekrosen als Zeichen einer Leberzelldestruktion gefunden werden.



**Abb. 17 Histologische Darstellung des Leberschadens von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert und nach 14 Tagen die Lebern präpariert. Nach Fixierung in 4% Formalin wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Originalvergrößerung: 10-fach). N: Nekrose, Pfeile: Zellinfiltrationen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus einem Experimenten mit 4 bis 5 Mäusen pro Genotyp.

Das histologische Ergebnis spricht demnach für eine gesteigerte Leberpathologie in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen, auch wenn sich diese nicht eindeutig in der Serumkonzentration der Leberenzyme widerspiegelt.

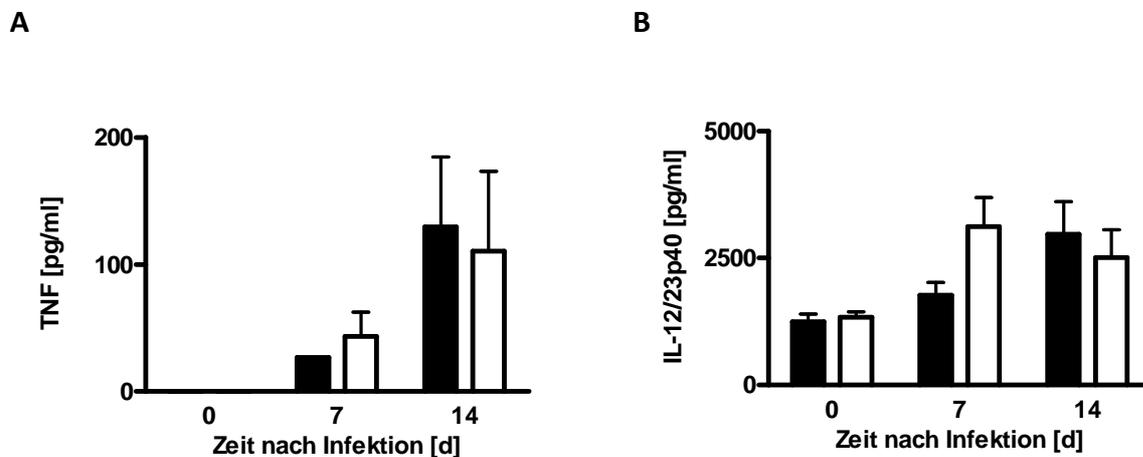
### 3.2.3 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die Th1-Immunantwort

Überraschenderweise konnte für die Untereinheit EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* trotz eines hemmenden Einflusses auf die IL-17A-Produktion eine protektive Wirkung festgestellt werden. Im Folgenden wurde daher der Einfluss der EBI-3 Deletion auf die resistenzfördernden Parameter in der Infektion mit *T. cruzi* untersucht.

#### 3.2.3.1 Unveränderte proinflammatorische Zytokinantwort in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Bestimmung der Konzentration von TNF und IL-12/23p40 im Serum *T. cruzi* infizierter C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse erfolgte 7 und 14 Tage nach Infektion mittels CBA. Nachdem am Tag der Infektion in beiden Genotypen noch kein TNF detektierbar war, betrug die TNF-

Konzentration 7 Tage nach Infektion bereits 50 pg/ml und stieg im weiteren Verlauf bis 14 Tage nach Infektion noch auf das Dreifache an. Dieser Verlauf traf für beide Mausstämmen in gleichem Maße zu (Abb. 18A).



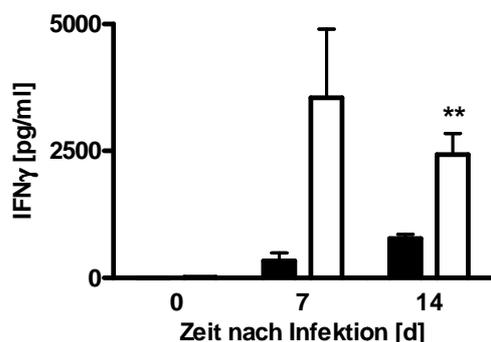
**Abb. 18** TNF- und IL-12/23p40-Konzentration im Serum von mit *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und die Konzentration von TNF (A) und IL-12/23p40 (B) im Serum mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 Mäusen pro Genotyp. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Im Einklang hiermit konnte auch in der IL-12/23p40-Konzentration zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden (Abb. 18B).

### 3.2.3.2 Gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

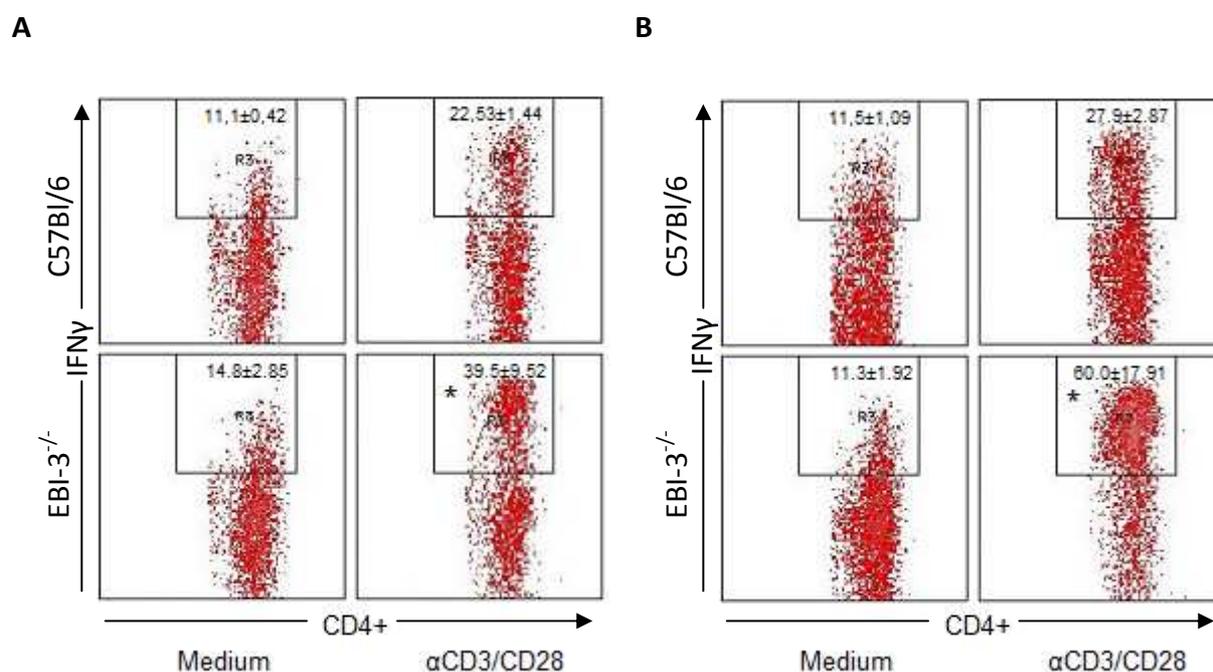
In vorausgehenden Studien bewirkte die Deletion der IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 eine verminderte Th1-vermittelte Immunantwort, sowohl in der Infektion mit *L. major* als auch im murinen Modell der Autoimmunhepatitis (Zahn et al. 2005; Siebler et al. 2008).

Um der Frage nachzugehen, ob dieser Effekt auch auf die Infektion mit *T. cruzi* zutrifft, wurde im Folgenden die systemische und lokale IFN $\gamma$ -Produktion von EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen ermittelt. Im Serum der C57Bl/6 Mäuse stieg die Konzentration von IFN $\gamma$ , dem Verlauf der Parasitämie folgend, langsam auf 340 pg/ml an Tag 7, auf das Doppelte an Tag 14 an. Demgegenüber war in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen die Konzentration von IFN $\gamma$  an Tag 7 um das 10-fache, und an Tag 14 um das 3-fache der C57Bl/6 Werte gesteigert (Abb. 19).



**Abb. 19** IFN $\gamma$ -Konzentration im Serum von mit *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi* Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus der V. cava inferior Blut entnommen, Serum gewonnen und die Konzentration von IFN $\gamma$  im Serum mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen pro Genotyp. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. (Signifikanz: \*\*:  $p < 0,01$ ; Student's t-Test)

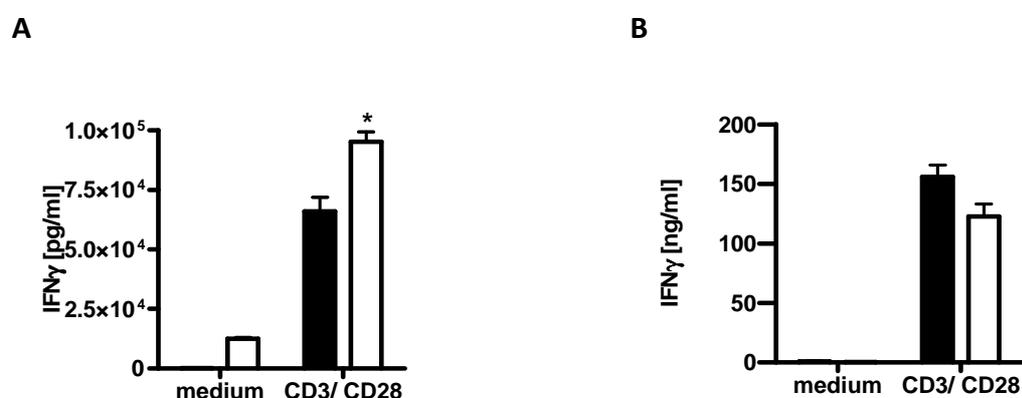
Die Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-T-Zellen in Milzen und Lebern *T. cruzi*-infizierter C56Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurden den Mäusen 14 Tage nach Infektion die Organe entnommen. Die gewonnenen Einzellsuspensionen wurden für 4 h mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert und mit intra- und extrazellulären Antikörpern gefärbt.



**Abb. 20** Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in Milz und Leber von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Nach 14 Tagen erfolgte die Analyse der Frequenz an intrazellulär IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in der Milz (A) und Leber (B), nach 4-stündiger Stimulierung mit Medium bzw.  $\alpha$ CD3/CD28, mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Mäusen je Genotyp in % aller CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. (Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ ; Student's t-Test)

Durch die Stimulation der T-Zellen kam es in beiden Mausstämmen sowohl in der Milz als auch in der Leber zu einem Anstieg der Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-T-Zellen. Allerdings betrug die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Th-Zellen in C57Bl/6 Mäusen nach Stimulation in beiden Organen nur die Hälfte der Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden Th-Zellen aus EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 20).

Im Anschluss folgte die Überprüfung der Aktivität IFN $\gamma$ -produzierender Milzzellen. Hierfür wurden aus den Milzen von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen 7 und 14 Tage nach Infektion mit *T. cruzi* Zellsuspensionen gewonnen und diese für 24 h mit Medium oder  $\alpha$ CD3/CD28 inkubiert. Die Detektion von IFN $\gamma$  in den Überständen erfolgte mittels ELISA.

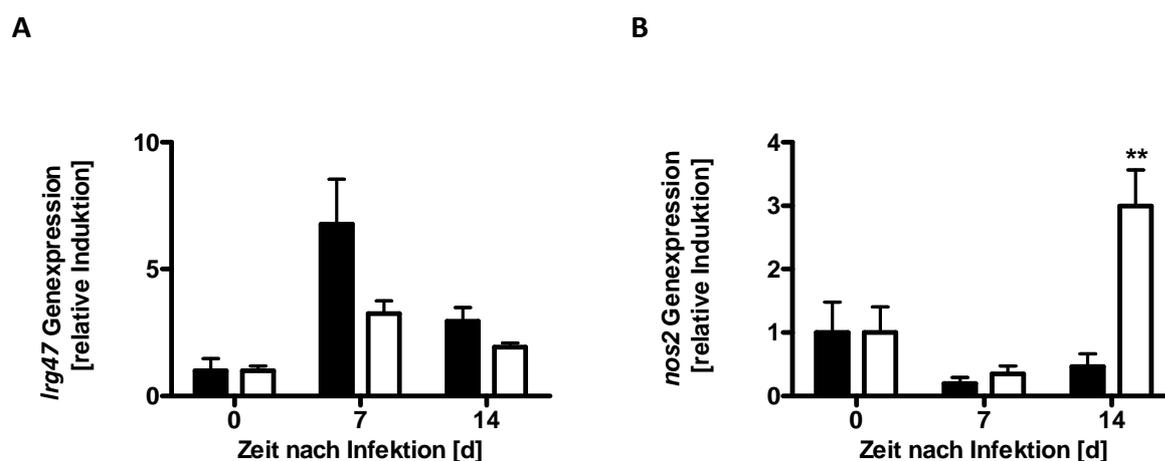


**Abb. 21 IFN $\gamma$ -Sekretion in der Milz von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die IFN $\gamma$ -Sekretion durch Milzzellen wurde nach Restimulation mit den angegebenen Substanzen mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden 7 (A) und 14 (B) Tage nach der Infektion Organe entnommen, Zellen isoliert und 24 h stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Mäusen je Genotyp. (Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ ; Student's t-Test)

Sowohl 7 als auch 14 Tage nach Infektion ließ sich die Aktivität IFN $\gamma$ -produzierender Milzzellen durch den Kontakt mit  $\alpha$ CD3/CD28 in beiden Genotypen deutlich steigern. Im Vergleich beider Mausstämme lag am 7. Tag nach Infektion die Produktion von IFN $\gamma$  durch  $\alpha$ CD3/CD28-stimulierte Th-Zellen in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant über der IFN $\gamma$ -Produktion der Wildtypkontrollen (Abb. 21A). Dieser Unterschied zwischen C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen war 14 Tage nach Infektion nicht mehr zu beobachten (Abb. 21B).

### 3.2.3.3 Gesteigerte IFN $\gamma$ -abhängige Makrophageneffektorfunktion in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

Bisher führte die Deletion von EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* trotz einer verstärkten Produktion der für die Resistenzentwicklung bekannten Zytokine IFN $\gamma$  und IL-17A zu einer gesteigerten Suszeptibilität. Um eine mangelhafte Makrophageneffektorfunktion als Ursache dieses Phänotyps zu untersuchen, wurden C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten infiziert und die Expression von *Irg47* und *nos2* in deren Milzen bestimmt.



**Abb. 22** Produktion von *Irg47* und *nos2* in der Milz von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.

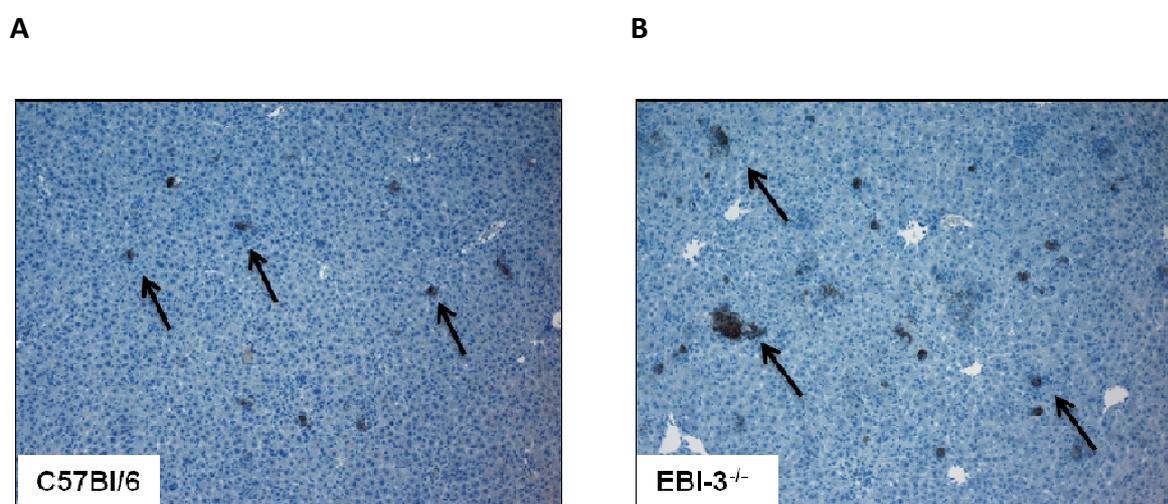
C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit 1x10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die Genexpression von *Irg47* (A) und *nos2* (B) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in der Milz mittels quantitativer *real time* RT-PCR ermittelt, auf die Expression von *hprt* normalisiert und auf die Expression nicht-infizierter Mäuse bezogen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Signifikanz: \*\*: p<0,01; Student's t-Test)

Hierfür wurden 7 und 14 Tage nach Infektion die Milzen entnommen und mRNA isoliert. Die Expression von *Irg47* und *nos2* wurde mittels *real time* RT-PCR bestimmt. In C57Bl/6 Mäusen stieg die *Irg47*-Expression zu Beginn der Infektion bis zum 7. Tag an um dann im weiteren Verlauf bis Tag 14 nach Infektion wieder abzunehmen. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Allerdings fiel die *Irg47*-Expression hier im Vergleich zu den Wildtypmäusen sichtbar, jedoch nicht signifikant geringer aus (Abb. 22A).

Die leicht verminderte *Irg47*-Expression allein konnte den suszeptiblen Phänotyp der EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch nicht ausreichend erklären. Daher wurde nun die hauptsächlich IFN $\gamma$ -vermittelte Expression der zur Abtötung der Parasiten notwendigen *nos2* untersucht. In C57Bl/6 Mäusen kam es zu keiner wesentlichen Veränderung der *nos2*-Expression im Verlauf

der Infektion mit *T. cruzi*. Im Gegensatz hierzu führte die Infektion in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen am 14. Tag zu einer signifikant gesteigerten *nos2*-Expression auf das Dreifache der C57Bl/6 Kontrollgruppe (Abb. 22B).

Ähnliche Ergebnisse bot auch die immunhistochemische Detektion der NOS2 in Lebern von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. Vierzehn Tage nach Infektion wurden die Lebern entnommen, Paraffinschnitte hergestellt und diese mit  $\alpha$ NOS2-Antikörpern gefärbt. Die Dichte der NOS2-enthaltenden Zellen in der Leber wurde durch das Betrachten der Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt.



**Abb. 23** Histologische Darstellung NOS2-enthaltender Zellen in Lebern von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert und nach 14 Tagen die Lebern präpariert. Nach Fixierung in 4% Formalin wurden Paraffinschnitte angefertigt, mit  $\alpha$ NOS2-Antikörpern inkubiert und mit Hämalun nach Gill gegengefärbt (Originalvergrößerung: 10-fach). Die NO-Synthase zeigt sich braun-schwarz angefärbt. Pfeile: angefärbte NO-Synthase. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus einem Experimenten mit jeweils 4 bis 5 Mäusen.

Sowohl in C57Bl/6 als auch in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen konnte man deutliche Ansammlungen NOS2-produzierender Zellen erkennen. Im Vergleich zu den C57Bl/6 Kontrollmäusen traten diese in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch wesentlich häufiger und großflächiger auf (Abb. 23).

Diese Ergebnisse belegen eine entsprechend der erhöhten IFN $\gamma$ -Produktion gesteigerte Makrophageneffektorfunktion in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen.

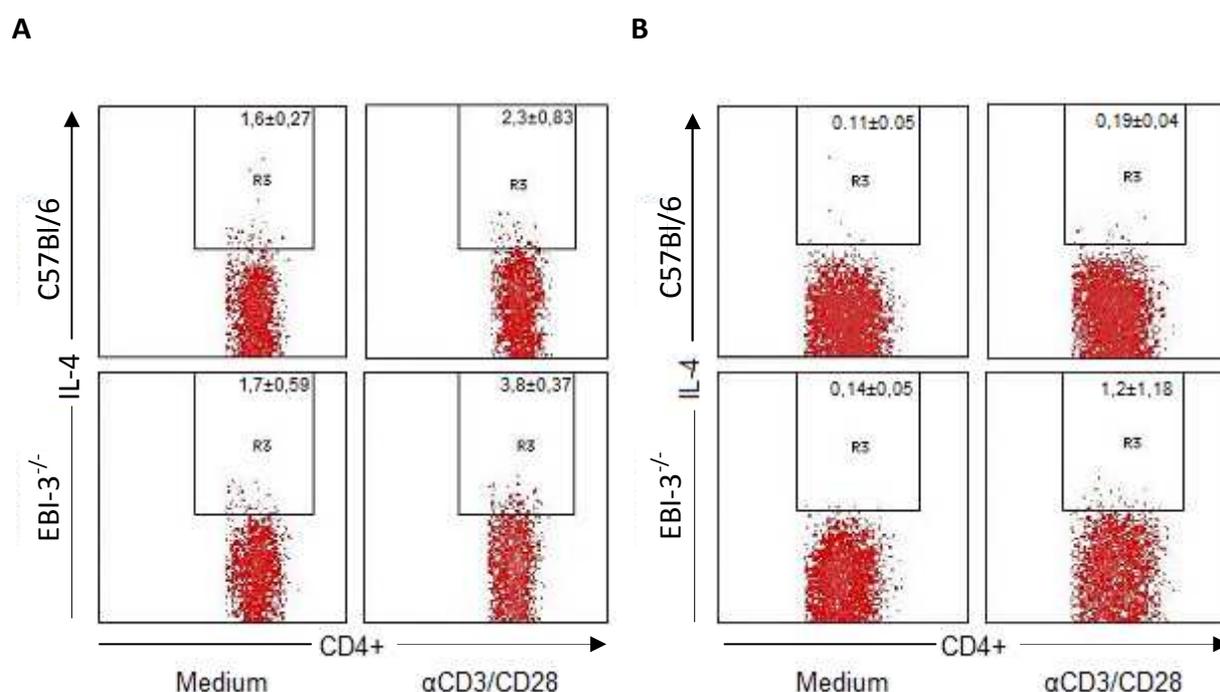
### 3.2.4 Die Auswirkung der Deletion von EBI-3 auf die Th2-Immunantwort

Die Deletion der Untereinheit EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* führte zu einem suszeptiblen Phänotyp, obwohl EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl eine adäquate Th1-Immunantwort mit effektiver

IFN $\gamma$ -induzierter Makrophagenaktivierung als auch eine gesteigerte Produktion von immunoprotektiv wirkendem IL-17A (Kapitel 3.1) aufwiesen. Zur weiteren Abklärung der Ursache für die gesteigerte Suszeptibilität in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde nun die Th2-Immunantwort untersucht, die in der Infektion mit *T. cruzi* bereits einige Male mit einem suszeptiblen Phänotyp in Verbindung gebracht werden konnte (Barbosa et al. 1996; Laucella et al. 1996).

### 3.2.4.1 Gesteigerte IL-4-Produktion in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

Wie bereits beschrieben, wirkt sich die IL27/35-Untereinheit EBI-3 je nach Krankheitsbild sowohl hemmend als auch aktivierend auf die IL-4-Produktion durch Th2- und andere Immunzellen aus (Omata et al. 2001; Nieuwenhuis et al. 2002; Zahn et al. 2005; Hausding et al. 2007).



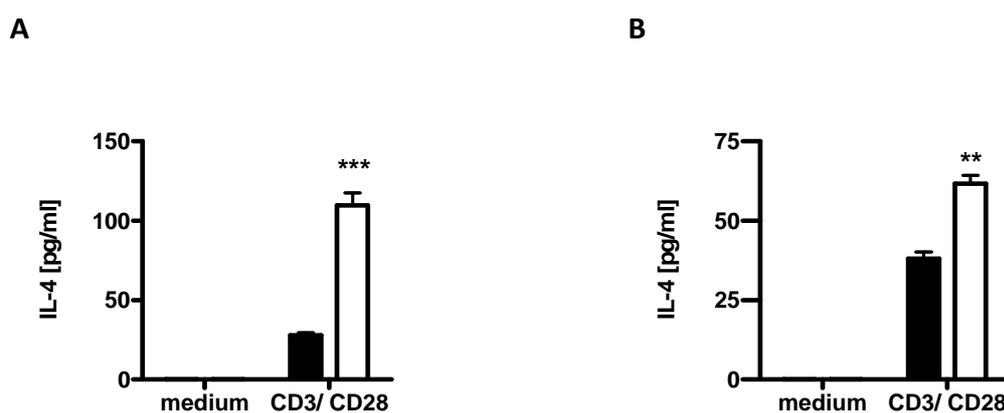
**Abb. 24** Frequenz IL4-produzierender CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in Milz und Leber von *T. cruzi*-infizierten C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen. C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 10<sup>4</sup> *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Nach 14 Tagen erfolgte die Analyse der Frequenz an intrazellulär IL4-produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in der Milz (A) und Leber (B), nach 4-stündiger Stimulierung mit Medium bzw.  $\alpha$ CD3/CD28, mittels Durchflusszytometrie. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Mäusen je Genotyp in % aller CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Um neue Erkenntnisse über die Rolle der IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 in der Immunantwort gegen *T. cruzi* zu gewinnen, wurde die IL-4-Produktion in C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup>

Mäusen nach der Infektion mit *T. cruzi* ermittelt. Die Bestimmung der Frequenz von IL-4-produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in Milzen und Lebern von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgte 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* mittels Durchflusszytometrie. Zuvor wurden die Milzzellsuspensionen für 4 h mit Medium oder  $\alpha$ CD3/CD28 inkubiert und mit intra- und extrazellulären Antikörpern gefärbt.

In vorangehenden Studien induzierte die Infektion mit *T. cruzi* in C57Bl/6 Mäusen gewöhnlich eine typische Th1-vermittelte Immunantwort mit gesteigerter IFN $\gamma$  und kaum feststellbarer IL-4-Produktion (Hoft et al. 1993). Im Einklang mit diesen Studien konnte in C57Bl/6 Mäusen 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* in Milz und Leber nur eine sehr geringe Frequenz von IL-4-produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen detektiert werden. Diese Frequenz wurde auch durch die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 kaum gesteigert. Auch in EBI3<sup>-/-</sup> Mäusen fiel die Frequenz der IL-4-produzierenden CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>-Th-Zellen in beiden Organen relativ gering aus. Allerdings lag sie, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich, deutlich über der Frequenz in C57Bl/6 Mäusen (Abb. 24).

Zur Bestimmung der IL-4-Produktion durch Th2-Zellen wurden 7 und 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* Einzellsuspensionen aus den Milzen von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen hergestellt und für 24 h mit  $\alpha$ CD3/CD28 stimuliert. Die Detektion von IL-4 in den Zellüberständen erfolgte mittels ELISA.



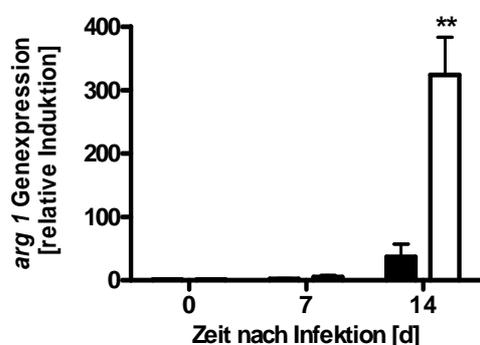
**Abb. 25 IL-4-Sekretion in der Milz von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die IL-4-Sekretion durch Milzzellen wurde nach Restimulation mit den angegebenen Substanzen mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden 7 (A) und 14 (B) Tage nach Infektion Milzen entnommen, Zellen isoliert und 24 h stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 Mäusen je Genotyp. (Signifikanz: \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Student's t-Test)

Hierbei wurden die Milzzellen beider Mausstämmen durch die Stimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 zur IL-4-Produktion angeregt. Im Vergleich zu den Milzen von C57Bl/6 Mäusen war die IL-4-Produktion durch Th2-Zellen in EBI-3<sup>-/-</sup> Milzen jedoch signifikant auf das Vierfache an Tag 7 und etwas weniger als das Doppelte an Tag 14 gesteigert (Abb. 25).

Dementsprechend führte die Deletion der EBI-3-Untereinheit trotz einer unveränderten Frequenz von IL-4-produzierenden Th-Zellen in der Infektion mit *T. cruzi* zu einer gesteigerten IL-4-Produktion.

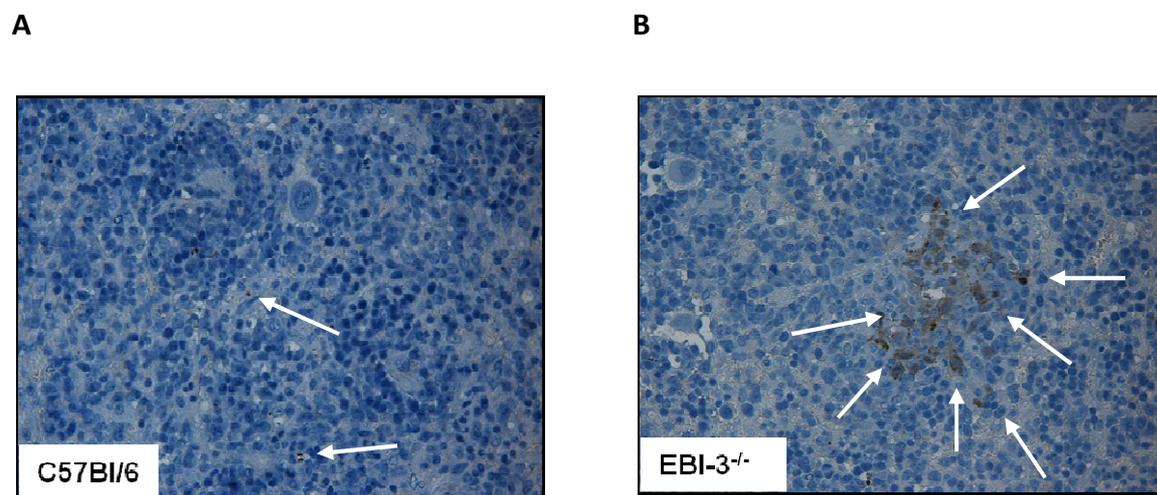
### 3.2.4.2 *T. cruzi* induziert eine alternative Makrophagenaktivierung in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen

Wie bereits erwähnt wird eine gesteigerte IL-4-Produktion häufig mit einer vermehrten Suszeptibilität in der Infektion mit *T. cruzi* in Verbindung gebracht (Giordanengo et al. 2002; Zhang et al. 2010). Die IL-4 bedingte Suszeptibilität wird dabei zum einen auf den hemmenden Effekt von IL-4 auf die IFN $\gamma$ -Produktion (Barbosa Oliveira de et al. 1996; Abrahamsohn et al. 2000; Hiyama et al. 2001) und zum anderen auf die IL-4-vermittelte Induktion der alternativen Makrophagenaktivierung zurückgeführt (Giordanengo et al. 2002; Zhang et al. 2010). Ersteres kam als Grund für die gesteigerte Anfälligkeit von EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen in der Infektion mit *T. cruzi* nicht in Frage, da hier die IFN $\gamma$ -Produktion gesteigert war. Um herauszufinden, inwiefern sich die Deletion von EBI-3 und die damit gesteigerte IL-4-Produktion auf die alternative Makrophagenaktivierung auswirkt, wurde die Expression der *arg-1* in Milzen von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen 7 und 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* mittels *real time* RT-PCR bestimmt.



**Abb. 26 Expression von *arg-1* in der Milz von C57Bl/6 und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*.** C57Bl/6 (●) und EBI-3<sup>-/-</sup> (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die Genexpression von *arg-1* wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in der Milz mittels quantitativer *real time* RT-PCR ermittelt, auf die Expression von *hprt* normalisiert und auf die Expression nicht-infizierter Mäuse bezogen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Signifikanz: \*\*:  $p < 0,01$ ; Student's t-Test)

Sowohl in C57Bl/6 Mäusen als auch in  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen wurde erst 14 Tage nach Infektion eine detektierbare Menge an *arg-1* transkribiert. Im Vergleich zu C57Bl/6 Mäusen war die *arg-1*-Expression in Milzen von  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen an Tag 14 allerdings signifikant um das Zehnfache gesteigert (Abb. 26). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, folgte die immunhistochemische Darstellung der Arg-1 in Milzen von C57Bl/6 und  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen.

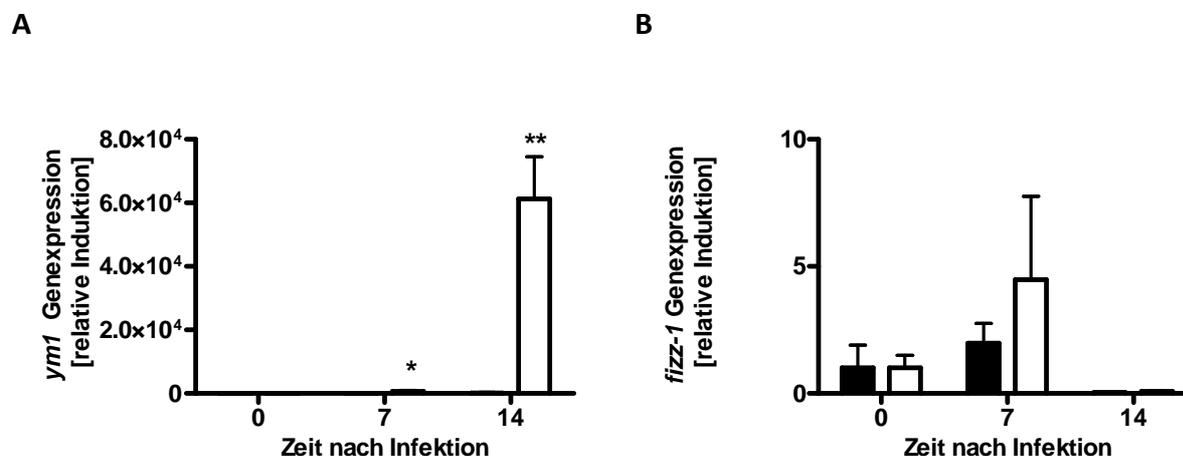


**Abb. 27** Histologische Darstellung Arg-1-enthaltender Zellen in Milzen von C57Bl/6 und  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6 und  $EBI-3^{-/-}$  Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert und nach 14 Tagen die Milzen präpariert. Nach Fixierung in 4% Formalin wurden Paraffinschnitte angefertigt, mit  $\alpha$ Arg-1-Antikörpern inkubiert und mit Hämatoxylin nach Gill gegengefärbt (Originalvergrößerung: 400-fach). Arg-1-enthaltende Zellen zeigen sich braun-schwarz angefärbt. Pfeile: angefärbte, Arg-1-enthaltende Zellen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus einem Experiment mit 4 bis 5 Mäusen je Genotyp.

Hierfür wurden 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* aus den Milzen Paraffinschnitte angefertigt, die mit  $\alpha$ Arg-1-Antikörpern gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet wurden. In den Schnitten von C57Bl/6 Mäusen konnten mikroskopisch nur wenige Arg-1-exprimierende Zellen gefunden werden.  $EBI-3^{-/-}$  Mäuse wiesen demgegenüber wesentlich mehr und großflächigere Ansammlungen von Arg-1-produzierenden Zellen auf (Abb. 27). Demnach führt die Deletion der Untereinheit EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* tatsächlich zu einer gesteigerten Arg-1-Produktion.

Da Arg-1 nicht nur in Makrophagen, sondern auch in vielen anderen Zelltypen vorkommt, wurde im Folgenden zusätzlich die Expression von *ym1* und *fizz1*, zweier exklusiv in alternativ aktivierten Makrophagen exprimierter Gene (Raes et al. 2002; Noël et al. 2004), mittels *real time* RT-PCR abgeschätzt. Sieben und 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi*

wurden hierfür C57Bl/6 und  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen die Milzen entnommen und daraus mRNA gewonnen. Die Quantifizierung bereits transkribierter mRNA erfolgte mittels *real time* RT-PCR.



**Abb. 28** Produktion von *ym1* und *fizz1* in der Milz von C57Bl/6 und  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen nach Infektion mit *T. cruzi*. C57Bl/6(●) und  $EBI-3^{-/-}$  (○) Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$  *T. cruzi*-Blut-Trypomastigoten i.p. infiziert. Die Genexpression von *ym1*(A) und *fizz1* wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in der Milz mittels quantitativer *real time* RT-PCR ermittelt, auf die Expression von *hprt* normalisiert und auf die Expression nicht-infizierter Mäuse bezogen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Mäusen aus einem durchgeführten Experiment. (Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; Student's t-Test)

Das Gen *ym1* wurde in C56Bl/6 Mäusen zu keinem Zeitpunkt der Infektion exprimiert. Im Vergleich führte die Deletion von *EBI-3* bereits an Tag 7 zu einer geringen Expression von *ym1*, die sich bis zum 14. Tag bereits auf das Hundertfache gesteigert hatte. Dementsprechend überragte die *ym1*-Expression in  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen deutlich die Werte der Wildtyp-Kontrollen (Abb. 28A). Für die Expression von *fizz1* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausstämmen festgestellt werden. In beiden kam es zu einem leichten Anstieg der *fizz1*-Expression an Tag 7, 14 Tage nach Infektion war in beiden Genotypen jedoch kaum noch *fizz1* mRNA detektierbar (Abb. 28B). Trotz des fehlenden Unterschiedes in der *fizz1*-Expression spricht die hoch signifikante Steigerung der Expression von *arg-1* und *ym1* durchaus für eine, den suszeptiblen Phänotyp erklärende, alternative Aktivierung von Makrophagen in *T. cruzi*-infizierten  $EBI-3^{-/-}$  Mäusen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss von IL-17A auf den Verlauf einer Infektion mit *T. cruzi*

Für das Zytokin IL-17A konnte in vielen Infektionskrankheiten bereits ein protektives Potential bewiesen werden. Hierbei fiel IL-17A vor allem durch seine stark proinflammatorischen Eigenschaften auf (Curtis und Way 2009; Veerdonk van de et al. 2009). Gerade diese proinflammatorische Aktivität von IL-17A birgt indes auch die Gefahr einer gesteigerten Entzündungsreaktion, die unreguliert starke Gewebeschäden verursacht (Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009; Cruz et al. 2010; Guiton et al. 2010). Ziel der vorliegenden Studie war es, mehr über die Rolle von IL-17A in der Infektion mit dem Protozoon *T. cruzi* zu erfahren. Die Tatsache, dass *T. cruzi*-infizierte Mäuse vermehrt IL-17A produzieren, weist auf eine wichtige Funktion von IL-17A in dieser Infektionskrankheit hin (da Matta Guedes et al. 2010; Miyazaki et al. 2010). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch nicht bekannt, welche Eigenschaften von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* überwiegen. Da *T. cruzi*-infizierte Mäuse häufig starke Organschäden aufweisen (Palhares et al. 1988; Bonney und Engman 2008; Carrera-Silva et al. 2008), wäre für IL-17A, abgesehen von einer protektiven Wirkung, auch eine entzündungsfördernde, destruiierende Wirkung denkbar.

#### 4.1.1 Die Bedeutung von IL-17A für die Immunabwehr in der Infektion mit *T. cruzi*

Die bisherigen Studien zur Rolle von IL-17A in der Infektion mit intrazellulären Erregern lassen noch keine einheitliche Aussage über den Einfluss von IL-17A auf eine schützende Immunfunktion zu. Selbst Studien zu ein und demselben Erreger lieferten in dieser Hinsicht unterschiedliche, zum Teil sogar gegensätzliche Ergebnisse (Kelly et al. 2005; Chackerian et al. 2006; Umemura et al. 2007; Guiton et al. 2010; Okamoto Yoshida et al. 2010). Im Gegensatz hierzu bildeten die im Verlauf der vorliegenden Arbeit publizierten Studien zu der Rolle von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* ein relativ einheitliches Bild, das auf eine protektive Wirkung von IL-17A hinweist. Die Behandlung von suszeptiblen BALB/c Mäusen mit  $\alpha$ IL-17A-Antikörpern hatte zwar keinen Einfluss auf den Verlauf der Parasitämie, sie wirkte sich jedoch durchaus negativ auf das Überleben der behandelten Mäuse aus (da

---

Matta Guedes et al. 2010). IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse auf einem genetischem C57Bl/6 Hintergrund entwickelten demgegenüber im Vergleich zu IL-17A-exprimierenden Kontrollmäusen eine stark erhöhte Parasitämie, die mit einer verminderten Überlebensrate einherging (Miyazaki et al. 2010). Diese von Miyazaki *et al.* erzielten Ergebnisse konnten durch die vorliegende Studie bestätigt werden. Nachdem die aktuelle Studienlage für eine antiparasitäre Wirkung von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* spricht, stellt sich nun die Frage nach dem Mechanismus, über den sich IL-17A an der Eliminierung der Parasiten beteiligt.

#### 4.1.2 Der Einfluss von IL-17A auf die IFN $\gamma$ -Produktion während einer *T. cruzi*-Infektion

Miyazaki *et al.* führten die gesteigerte Suszeptibilität von IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber der Infektion mit *T. cruzi* auf eine verminderte Konzentration von IFN $\gamma$  in den Lebern und Milzen dieser Mäuse zurück (Miyazaki et al. 2010). Für diese Hypothese sprechen Studien, die eine stimulierende Wirkung von IL-17A auf die Aktivität von IFN $\gamma$ -produzierenden-Zellen belegen (Khader et al. 2007; O'Connor et al. 2008; Bai et al. 2009; Damsker et al. 2010). IL-17A und IFN $\gamma$  galten lange Zeit als antagonistische Zytokine. Mittlerweile geht man dagegen von einer wesentlich komplexeren Interaktion dieser beiden Zytokine aus (Dardalhon et al. 2008; Damsker et al. 2010). Es ist bereits bekannt, dass sich IL-17A-produzierende Zellen unter bestimmten Umständen in IFN $\gamma$ -produzierende Zellen umwandeln können (Shi et al. 2008; Bending et al. 2009; Lee et al. 2009). Zudem ist IL-17A dazu in der Lage, IFN $\gamma$ -produzierende CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu rekrutieren. Dieser Prozess trägt in der Infektion mit *M. tb.* in immunisierten Mäusen über die frühzeitige Rekrutierung von antimykobakteriellen, IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen zu einer effektiven Bekämpfung von *M. tb.* bei (Khader et al. 2007). Auch in der Infektion mit *T. cruzi* wäre ein ähnlicher Einfluss von IL-17A auf die Aktivität IFN $\gamma$ -produzierender Zellen denkbar. Im Gegensatz zu der Studie von Miyazaki *et al.* sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und weiterer Arbeiten unserer Forschungsgruppe dennoch gegen einen Einfluss von IL-17A auf die IFN $\gamma$ -Produktion in der Infektion mit *T. cruzi*. So hatte die Abwesenheit von IL-17A weder in IL-17A<sup>-/-</sup> noch in IL-23-p19<sup>-/-</sup> Mäusen einen Einfluss auf die systemische oder lokale IFN $\gamma$ -Produktion. Da IL-17A<sup>-/-</sup> und IL-23-p19<sup>-/-</sup> Mäuse trotz der unveränderten IFN $\gamma$ -Werte nicht in der Lage waren, die Parasiten adäquat zu eliminieren (C. Hölscher, persönliche Mitteilung), kann die protektive Wirkung von IL-17A in den zuletzt beschriebenen Studien nicht auf einen IFN $\gamma$ -vermittelten Prozess

zurückgeführt werden. Vielmehr müssen andere IFN $\gamma$ -unabhängige Mechanismen existieren, über die IL-17A die Verteidigung gegen *T. cruzi* positiv beeinflusst.

#### **4.1.3 IL-17A und Neutrophile Granulozyten in der Infektion mit *T. cruzi***

In vielen Infektionskrankheiten agieren Neutrophile Granulozyten als wichtige Effektorzellen der IL-17A-vermittelten Verteidigung gegen die eingedrungenen Erreger (Curtis und Way 2009; Veerdonk van de et al. 2009; Onishi und Gaffen 2010). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Neutrophile Granulozyten auch zur IL-17A-vermittelten Immunität gegen *T. cruzi* beitragen. Weshalb in der vorliegenden Studie trotzdem auf die Untersuchung von Neutrophilen Granulozyten verzichtet wurde, soll im Folgenden erläutert werden.

Neutrophile Granulozyten sind häufig die ersten phagozytierenden Zellen am Ort der Infektion (Mayer-Scholl et al. 2004; Soehnlein 2009). Durch die große Zahl von antimikrobiellen Substanzen, die in Granula gespeichert vorliegen, sind sie dazu in der Lage, eine Vielzahl der phagozytierten Krankheitserreger direkt abzutöten (Mayer-Scholl et al. 2004; Soehnlein 2009). Aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne wurden Neutrophile Granulozyten lange Zeit ausschließlich mit akuten, durch extrazelluläre Erreger verursachten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (Ye et al. 2001b; Huang et al. 2004; Appelberg 2007). Mittlerweile weisen allerdings einige Studien darauf hin, dass diese Zellen auch in der Infektion mit intrazellulären Keimen, wie *M. tb.* und *L. major* und *T. gondii*, eine wichtige Rolle spielen (Pedrosa et al. 2000; Appelberg 2007; Charmoy et al. 2010). Auch die Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten in chronisch infizierten Geweben spricht für eine Beteiligung dieser Zellen an der Immunantwort gegen chronisch persistierende Erreger (Pedrosa et al. 2000; Appelberg 2007). Trotz der steigenden Evidenz für eine protektive Rolle von Neutrophilen Granulozyten in Infektionen mit einigen intrazellulären Erregern sprechen bisherige Studien gegen eine Beteiligung dieser Zellen an der Immunantwort gegen *T. cruzi*. So spielten Neutrophile Granulozyten in C57Bl/6 Mäusen keine Rolle in der Verteidigung gegen *T. cruzi* (Chen et al. 2001). Abgesehen davon bewirkte die Abwesenheit von IL-17A weder in IL23-p19<sup>-/-</sup> Mäusen noch in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen eine Veränderung in der Zahl der rekrutierten Neutrophilen Granulozyten in infiziertem Gewebe (Miyazaki et al. 2010; C. Hölscher, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser Studienlage wurde in der vorliegenden

Arbeit das Hauptaugenmerk nicht auf Neutrophile Granulozyten, sondern auf den Einfluss von IL-17A auf wichtige Makrophageneffektorenzyme gerichtet.

#### **4.1.4 Der Einfluss von IL-17A auf Makrophageneffektorfunktionen**

Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten konnte den Makrophageneffektormolekülen NOS2 und LRG47 bereits eine wichtige Rolle in der Eliminierung von *T. cruzi* zugesprochen werden (Muñoz-Fernández et al. 1992; Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998; Santiago et al. 2005). Daher wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob und in welcher Hinsicht IL-17A die Expression dieser beiden Enzyme in der Infektion mit *T. cruzi* beeinflusst.

##### **LRG47**

Die GTPase LRG47 gilt bereits als wichtiger Mediator in der Eliminierung intrazellulärer Pathogene, darunter auch *T. cruzi* (Santiago et al. 2005; Taylor 2007; Hunn und Howard 2010). Gleichwohl konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, über welche Prozesse genau sich LRG47 an der Verteidigung gegen *T. cruzi* beteiligt. Abgesehen davon, dass LRG47 in Makrophagen die Abtötung des Parasiten vorantreibt, wirkt sich LRG47 in der Infektion mit *T. cruzi* auch positiv auf die gesamte Hämatopoese aus. Dank letzterem trägt LRG47 zu der Bildung protektiver Immunzellen bei (Santiago et al. 2005). Die gesteigerte Funktionalität von Makrophagen konnte in Studien mit anderen intrazellulären Erregern auf einen positiven Einfluss von LRG47 auf die Motilität und Adhäsion der Makrophagen zurückgeführt werden (Henry et al. 2007; Henry et al. 2010; Hunn und Howard 2010;). Zusätzlich trägt LRG47 über die Förderung der Phagosomenreifung und über die Bildung von Autophagosomen zu einer effektiven Destruktion der Erreger bei (MacMicking et al. 2003; Singh et al. 2006; Hunn und Howard 2010). Sowohl der lokale als auch der systemische Einfluss von LRG47 könnte somit für die effiziente Verteidigung gegen *T. cruzi* verantwortlich sein. Ob und auf welche Weise sich IL-17A auf die Expression und Aktivität von LRG47 auswirkt, konnte bisher nur vermutet werden. In einer Studie mit immunisierten *M. tb.*-infizierten Mäusen hatte die Deletion von IL-23p19, und damit einhergehend die verminderte IL-17A-Produktion, keinen Einfluss auf die Expression von LRG47 (Khader et al. 2005). Dieses Studienergebnis reicht jedoch für eine definitive Aussage zum Einfluss von IL-17A auf LRG47 nicht aus. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals der direkte Einfluss von IL-17A auf die Expression von LRG47 in der Infektion mit *T. cruzi* untersucht.

Hierbei konnte ein fördernder Einfluss von IL-17A auf die Expression von LRG47 festgestellt werden. Über eine IL-17A-induzierte gesteigerte Aktivität von LRG47 ließe sich auch die protektive Wirkung von IL-17A in der Infektion mit *T. cruzi* erklären. Hierzu könnte in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, ob sich die gesteigerte Expression der LRG47-RNA auch in einer gesteigerten Aktivität des LRG47-Proteins widerspiegelt. Zusätzlich wäre zu klären, über welche Prozesse das IL-17A induzierte LRG47 zur Eradikation von *T. cruzi* beiträgt. Hierbei könnte man im Zuge von *in vitro*-Studien den Einfluss von IL-17A auf die Phagosomenfunktion und das Adhäsions- und Bewegungsverhalten von Makrophagen genauer untersuchen. Um LRG47-vermittelte Prozesse von anderen IL-17A-bedingten Veränderungen zu unterscheiden, könnte man hierbei LRG47-exprimierende und LRG47-defiziente Makrophagen miteinander vergleichen. In internen Studien unserer Forschungsgruppe konnten bereits Hinweise darauf gefunden werden, dass IL-17A in Makrophagen die frühzeitige Fusion von Lysosomen mit Phagosomen unterstützt (unveröffentlicht). *In vivo*-Studien könnten über die Verwendung von IL-17A<sup>-/-</sup>, LRG47<sup>-/-</sup> und IL-17A/LRG47 Doppelknockout Mäusen den Einfluss der IL-17A/LRG47-Achse auf Makrophageneffektormechanismen näher beleuchten.

## **NOS2**

Genau wie LRG47 ist auch NOS2 ein Enzym, das in der Destruktion von *T. cruzi* eine entscheidende Rolle spielt. Dies geschieht vor allem über die Bildung RNI (Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998). Da NOS2 vorwiegend durch IFN $\gamma$  induziert wird (Silva et al. 1995; Hölscher et al. 1998), scheint es vorerst verwunderlich, dass in der vorliegende Studie die Deletion von IL-17A, trotz der unveränderten IFN $\gamma$ -Werte, mit einer verminderten Expression von NOS2 einherging. Tatsächlich existieren mittlerweile jedoch mehrere Studien, die in verschiedenen Zellarten eine IFN $\gamma$ -unabhängige, IL-17A-vermittelte Transkription von NOS2 belegen (Mühl et al. 2011). Diese erfolgt, wie auch die IFN $\gamma$ -induzierte NOS2-Expression, über die Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) und *nuclear-factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), einem wichtigen NOS2-Transkriptionsfaktor (Shalom-Barak et al. 1998; Martel-Pelletier et al. 1999; Miljkovic et al. 2003; Miljkovic et al. 2005). Trotz der großen Ähnlichkeit unterscheiden sich die IFN $\gamma$ - und IL-17A-ausgelösten Signalkaskaden voneinander, so dass IL-17A unabhängig von IFN $\gamma$ -gesteuerten Prozessen die Expression von NOS2 auslöst (Martel-Pelletier et al. 1999; Miljkovic et al. 2005; Bergeron und Olivier 2006). Trotzdem

wirken IL-17A und IFN $\gamma$  häufig synergistisch positiv auf NOS2-exprimierende Zellen ein (Trajkovic et al. 2001; Miljkovic et al. 2005). Demnach ist eine IFN $\gamma$ -unabhängige Stimulierung der NOS2-Expression durch IL-17A auch in der vorliegenden Arbeit durchaus plausibel. Gleichwohl gibt die gesteigerte Expression von NOS2 in der vorliegenden Studie noch keinen Aufschluss über den Einfluss von IL-17A auf die Aktivität von NOS2. Daher kann auch ein positiver Einfluss von IL-17A auf die NOS2-vermittelte Destruktion von *T. cruzi* bisher nur vermutet werden. Diese Vermutungen sollten im Rahmen nachfolgender Studien überprüft werden. Des Weiteren gilt zu klären, ob IL-17A die Expression von NOS2 direkt steuert. Da IL-17A auch die Produktion der NOS2-Induktoren TNF und IL-1 $\beta$  positiv beeinflusst (Jovanovic et al. 1998; Shalom-Barak et al. 1998; Trajkovic et al. 2001), wäre auch eine indirekte Wirkung von IL-17A auf die NOS2-Expression über eines dieser beiden Zytokine denkbar. Dennoch kommt in der vorliegenden Studie zumindest TNF nicht als Mediator der IL-17A-vermittelten NOS2-Expression in Frage. Trotz unveränderter TNF-Werte wurde in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen wesentlich weniger NOS2 transkribiert als in Wildtypkontrollen. Aufgrund dieses Ergebnisses könnte ein direkter Einfluss von IL-17A auf die NOS2-Expression vermutet werden. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten Studien dienen, die sich z.B. über die Neutralisation anderer NOS2-induzierender Zytokine, *in vitro* mit dem direkten Einfluss von IL-17A auf *T. cruzi*-infizierte, NOS2-exprimierende Zellen beschäftigen. Bevor man der Frage nach dem genauen Weg der IL-17A gesteuerten NOS2-Expression nachgehen kann, sollte allerdings geklärt werden, welche Zellarten genau durch IL-17A zur Expression von NOS2 angeregt werden. Makrophagen zählen sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort gegen *T. cruzi* zu den Haupteffektorzellen, die vor allem durch eine ausgeprägte NOS2-Aktivität zur Destruktion von *T. cruzi* beitragen (Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998; Gutierrez et al. 2009). Daher ist es naheliegend zu vermuten, dass auch IL-17A, genau wie IFN $\gamma$ , in Makrophagen eine gesteigerte Expression von NOS2 herbeiführt. Dennoch spricht die aktuelle Studienlage gegen diese Vermutung. Immerhin konnte bisher in mehreren *in vitro*- Studien kein Einfluss von IL-17A auf die NOS2-Expression in Makrophagen festgestellt werden (Jovanovic et al. 1998; Trajkovic et al. 2001; Miyazaki et al. 2010). Im Gegensatz hierzu ließen sich viele Gewebezellen, u.a. auch Leberzellen, durch IL-17A zu der Expression von NOS2 anregen (Freeswick et al. 1994). Dagegen spricht die vorliegende Studie, in der eine IL-17A- induzierte NOS2-Expression in der Milz festgestellt wurde, nicht

für Gewebezellen, sondern vielmehr für Immunzellen als NOS2-exprimierende Zellen. Da bisher ausschließlich Peritoneal und Blutmakrophagen auf den Einfluss von IL-17A getestet wurden (Jovanovic et al. 1998; Trajkovic et al. 2001; Miyazaki et al. 2010), sollten Milzmakrophagen bei der Suche nach den durch IL-17A aktivierten, NOS2-exprimierenden Zellen noch nicht endgültig ausgeschlossen werden. Zusätzlich zu Makrophagen kämen auch Dendritische Zellen oder NK-Zellen in Frage. Beide Zellarten sind in der Lage, NOS2 zu exprimieren, wobei die NOS2-Expression in beiden Fällen bisher ausschließlich durch Stimulation mit IFN $\gamma$ , TNF oder IL-12 herbeigeführt werden konnte (Lu et al. 1996; Salvucci et al. 1998; Bogdan 2001; Trez de et al. 2009). In wieweit IL-17A in der Lage ist, diese Zellen in der Infektion mit *T. cruzi* zur Expression von NOS2 anzuregen, wäre eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien. Auch B- oder T-Lymphozyten sind prinzipiell zur Expression von NOS2 in der Lage. Da NOS2 dabei vor allem in entarteten Lymphozyten gefunden wurde, ist eine IL-17A-vermittelte Steigerung der NOS2-Expression in *T. cruzi*-infizierten B- oder T-Zellen eher unwahrscheinlich (Bogdan 2001). Auch wenn noch nicht abschließend geklärt ist, über welche Zellen sich IL-17A an der Expression von NOS2 beteiligt, so ist anzunehmen, dass die protektive Wirkung von IL-17A zumindest teilweise auf einer gesteigerten Aktivität der Enzyme LRG47 und NOS2 basiert. Zusätzlich sind LRG47 und NOS2 auch ursächlich an der Entstehung schwerer Entzündungsreaktionen beteiligt, die in einigen Fällen starke Organschäden mit sich bringen (Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009; Gutierrez et al. 2009; Bombeiro et al. 2010; Cruz et al. 2010). Daher war in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss von IL-17A auf die Leberpathologie in *T. cruzi*-infizierten Mäusen von Interesse.

#### **4.1.5 Die Rolle von IL-17A in der Entstehung der Leberpathologie**

In einigen Infektionsmodellen mit intrazellulären Keimen konnte bereits eine proinflammatorische, gewebedestruierende Rolle von IL-17A festgestellt werden. Hierbei war IL-17A sowohl in der Infektion mit *M. tb.* als auch in Infektionen mit intrazellulären Protozoen wie *L. major* oder *T. gondii* maßgeblich an der Entstehung starker Entzündungsreaktionen beteiligt (Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009; Cruz et al. 2010; Guiton et al. 2010). Daher war nicht verwunderlich, dass der Leberzellschaden in der vorliegenden Arbeit in *T. cruzi*-infizierten IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen wesentlich geringer ausfiel als in IL-17A-exprimierenden Kontrollmäusen. Dieser Effekt konnte durch weitere Studien unserer

Forschungsgruppe bestätigt werden, in denen die verminderte IL-17A-Produktion in IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer geringeren Leberzelldestruktion einherging (Hölscher, persönliche Mitteilung). Umso erstaunlicher war das Ergebnis von Miyazaki *et al.*: Trotz nahezu identischen Studiendesigns in ihrer und der hier vorliegenden Arbeit, führte die Deletion von IL-17A bei Miyazaki *et al.* zu einer verstärkten Leberpathologie (Miyazaki *et al.* 2010). Ein Grund für die Diskrepanz beider Studienergebnisse könnte in den unterschiedlichen Zeitpunkten liegen, zu denen die Leberpathologie untersucht wurde. Vergleicht man die Ergebnisse miteinander, so fördert IL-17A in der vorliegenden Studie 14 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* die Destruktion von Lebergewebe. Dieser zellschädigende Effekt von IL-17A ist 21 Tage nach Infektion in der Studie von Miyazaki *et al.* vollständig aufgehoben. IL-17A wirkte am 21. Tag sogar dem Untergang von Lebergewebe entgegen. Zusätzlich fiel die Parasitenzahl in den Lebern IL-17A-kompetenter Mäuse 21 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* wesentlich geringer aus als in IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen (Miyazaki *et al.* 2010). Mit einem solchen Vergleich lässt sich keine definitive Aussage treffen. Trotzdem weist er auf ein interessantes Phänomen bezüglich des Einflusses von IL-17A auf die Entwicklung der Pathologie und ggf. auch auf die Parasitenzahl in *T. cruzi*-infizierten Lebern hin. Noch interessanter wird es, wenn man zusätzlich Studien zu IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Mäusen in der Infektion mit *T. cruzi* vergleicht. Diese liefern in Bezug auf die Leberpathologie ähnlich diskrepante Ergebnisse. Hierbei war die Leberpathologie 10 und 13 Tage nach der Infektion mit *T. cruzi* in IFN $\gamma$ R-kompetenten Kontrollmäusen im Vergleich zu IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich erhöht (Hamano *et al.* 2003). Im Gegensatz hierzu fiel der Leberzellschaden 17 Tage nach Infektion in Kontrollmäusen wesentlich geringer aus als in IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Mäusen. Zusätzlich war in IFN $\gamma$ R-kompetenten Kontrollmäusen an Tag 17 auch die Parasitenlast der Lebern deutlich vermindert (Hölscher *et al.* 1998). Die starke Ähnlichkeit im Einfluss von IL-17A und IFN $\gamma$  auf den Verlauf der Leberzelldestruktion begründet die Notwendigkeit von Studien, die sich über einen längeren Zeitraum hinweg mit dem Einfluss beider Zytokine auf die Entwicklung von Pathologie und Parasitenlast in Lebern von *T. cruzi*-infizierten Mäusen beschäftigen. Als Erklärung dieses Phänomens wäre denkbar, dass zu Beginn der Infektion sehr hohe Mengen der proinflammatorischen Zytokine IL-17A und IFN $\gamma$  zugelassen werden, um eine effiziente Kontrolle von *T. cruzi* zu gewährleisten. Hierfür würde in den ersten 2 Wochen ein Kollateralschaden in der Leber in Kauf genommen. Nach einer erfolgreichen Kontrolle der

Parasiten kämen dann in der 3. Woche entzündungshemmende Mediatoren zum Einsatz, die einer weiteren Organdestruktion durch IL-17A entgegenwirken. Im Gegensatz hierzu würde die destruierende Wirkung dieser Zytokine in IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>- oder IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen wegfallen. Dies würde sich in einer geringen Leberpathologie an Tag 14 auswirken. Allerdings wären die defizienten Mäuse nicht in der Lage, das Wachstum von *T. cruzi* adäquat einzudämmen, wodurch die Parasitenlast in der 3. Woche stark ansteigen und selbst eine Zerstörung des Lebergewebes verursachen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte man in *T. cruzi*-infizierten Mäusen den zeitlichen Verlauf von Pathologie und Parasitenzahl in der Leber mit dem Verlauf der Konzentration von IL-17A, IFN $\gamma$  und regulierenden Zytokinen korrelieren. Zu den möglicherweise beteiligten regulatorischen Zytokinen gehört u.a. IL-27, da dieses in verschiedenen Infektionsmodellen in der Lage ist, sowohl die Produktion von IL-17A als auch die IFN $\gamma$ -Produktion zu hemmen (Villarino et al. 2003; Hölscher et al. 2005; Stumhofer et al. 2006; Diveu et al. 2009). Auch IL-35 käme als regulierendes Zytokin in Frage, zumal es zumindest *in vitro* die Bildung beider Zytokine hemmt (Niedbala et al. 2007; Kochetkova et al. 2010). In wieweit die gemeinsame IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 die Produktion von IL-17A und IFN $\gamma$  in der Infektion mit *T. cruzi* beeinflusst und wie sich die Deletion von EBI-3 auf Leberpathologie und Infektionsverlauf auswirkt, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit eruiert.

#### **4.2 Der Einfluss von EBI-3 auf den Verlauf einer Infektion mit *T. cruzi***

Die IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 ist Bestandteil zweier, als regulatorisch eingestufte, Zytokine (Hölscher 2004; Collison und Vignali 2008). Besonders in der Infektion mit stark pathogenen, intrazellulären Erregern wie *T. gondii* oder *T. cruzi* sind regulatorische Zytokine von großer Wichtigkeit, da sie die proinflammatorische Immunantwort drosseln und damit einer Gewebedestruktion entgegenwirken (Hölscher 2004; Collison und Vignali 2008). In der Familie der IL-12-Zytokine konnte bisher vor allem dem Zytokin IL-27 und dessen Rezeptoruntereinheit IL-27R $\alpha$  eine antiinflammatorische Funktion zugesprochen werden. Diese erfolgte in Infektionsmodellen mit stark pathogenen Keimen, unter anderem durch die Hemmung der IL-17A- und IFN $\gamma$ -Produktion (Villarino et al. 2003; Hölscher et al. 2005; Rosas et al. 2006; Stumhofer et al. 2006; Anderson et al. 2009). Auch durch IL-35 ließ sich die Produktion dieser beiden Zytokine, zumindest *in vitro*, inhibieren (Collison et al. 2007; Niedbala et al. 2007; Kochetkova et al. 2010). Wie sich IL-35 in der Infektion mit

intrazellulären Pathogenen verhält, ist bisher noch unbekannt. Da beide Zytokine, IL-27 und IL-35, zumindest teilweise bereits antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen, ist entsprechend für deren gemeinsame Untereinheit EBI-3 ebenfalls eine entzündungshemmende Funktion wahrscheinlich. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Funktion von EBI-3 in der Immunantwort gegen ein stark pathogenes, intrazelluläres Protozoon, *T. cruzi*, untersucht. Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist zu beachten, dass EBI-3 hier als eigenständiger Mediator der Immunantwort gegen *T. cruzi* betrachtet wird. Eine Aussage über die Funktion von IL-27 oder IL-35 ist anhand der vorliegenden Studienergebnisse allein nicht möglich. Nachfolgende Studien könnten sich daher mit der Frage beschäftigen, in welcher Form EBI-3 die in der vorliegenden Studie beobachteten Eigenschaften ausführt. Hierbei sollte auch eine mögliche Funktion von EBI-3 in Form einer homodimeren Verbindung oder als eigenständiges Monomer nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.2.1 Der Einfluss von EBI-3 auf die Th1- und Th17-Immunantwort nach der Infektion mit *T. cruzi***

In der vorliegenden Arbeit konnte die bereits vermutete immunoregulatorische Funktion von EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* bestätigt werden. Hierbei zeigten EBI-3-kompetente Mäuse im Vergleich zu EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen eine deutlich verminderte Produktion von IL-17A und IFN $\gamma$ . Auch in der Infektion mit *L. monozytogenes* konnte für EBI-3 bereits ein hemmender Effekt auf die IL-17A-Produktion festgestellt werden (Yang et al. 2008). Dagegen wurden in anderen Infektionsmodellen für EBI-3 proinflammatorische Effekte und die Förderung der Produktion von IFN $\gamma$  nachgewiesen (Zahn et al. 2005; Siebler et al. 2008). Die in der vorliegenden Studie erstmals beobachtete EBI-3-vermittelte Hemmung der IFN $\gamma$ -Produktion war trotz allem nicht unerwartet. Schließlich weist EBI-3 hiermit eine Ähnlichkeit zu IL-27 auf, dessen Wirkung auf IFN $\gamma$  von der Pathogenität des Erregers abhängt (Hölscher 2000; Hölscher 2004; Collison und Vignali 2008). Abgesehen von den beiden proinflammatorischen Zytokinen hatte EBI-3 in der vorliegenden Studie auch einen hemmenden Einfluss auf die Expression von LRG47 und NOS2. Da sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-17 die Expression dieser beiden Enzyme steigern (Abb. 12), (Silva et al. 1995; Sorace et al. 1995; Hölscher et al. 1998), kann der hemmende Einfluss von EBI-3 auf diese Makrophageneffektormoleküle höchstwahrscheinlich indirekt auf die verminderte Produktion dieser Zytokine zurückgeführt werden.

#### 4.2.2 Die Regulation der infektionsassoziierten Leberpathologie durch EBI-3

Eine überschießende Produktion von IL-17A, IFN $\gamma$  und NOS2 führt in einigen Infektionsmodellen zu starken gewebedestruierenden Entzündungsreaktionen (Hölscher et al. 2000; Stumhofer et al. 2006; Dutra und Gollob 2008; Anderson et al. 2009; Bombeiro et al. 2010; Guiton et al. 2010). Aus diesem Grund könnte EBI-3 nach der Infektion mit *T. cruzi* durch die Hemmung von proinflammatorischen Mediatoren der Entstehung einer entzündlichen Leberpathologie entgegenwirken. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von histologischen Untersuchungen von mit *T. cruzi* infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> und EBI-3-kompetenten Mäusen bestätigt werden. Da *T. cruzi*-infizierte IL-17A<sup>-/-</sup> Mäuse histologisch eine reduzierte Leberpathologie aufweisen (Abb. 7), wäre es daher von Interesse, in diesem Rahmen herauszufinden, ob EBI-3 der Leberpathologie über eine Inhibierung der IL-17A-Produktion entgegenwirkt. Zur Beantwortung dieser Frage könnten EBI-3-kompetente und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse nach der Infektion mit *T. cruzi* mit  $\alpha$ IL-17A behandelt, und die Leberpathologien in behandelten und nicht behandelten Tieren verglichen werden.

#### 4.2.3 Der Einfluss von EBI-3 auf die Th2-Immunantwort und die Förderung des Parasitenwachstums in alternativ aktivierten Makrophagen

IL-17A und IFN $\gamma$  (Hölscher et al. 1998; Miljkovic et al. 2003; Miljkovic et al. 2005; die vorliegende Arbeit) gehören gemeinsam mit den makrophagen-induzierten Effektorenzymen NOS2 (Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998) und LRG47 (Santiago et al. 2005) zu den wichtigsten Mediatoren einer effizienten Immunantwort gegen *T. cruzi*. Dementsprechend unerwartet war das vorliegende Ergebnis, in dem EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse, trotz der hohen Konzentration von IL-17A und IFN $\gamma$ , nicht in der Lage waren, *T. cruzi* adäquat zu eliminieren.

Auf der Suche nach einer möglichen Ursache wurde der Einfluss von EBI-3 IL-4-produzierende Th2-Zellen untersucht. IL-4 wird mit einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber *T. cruzi* in Verbindung gebracht. So ist schon seit langem bekannt, dass mit *T. cruzi*-infizierte susceptible BALB/c Mäuse im Vergleich zu resistenten C57Bl/6 Mäusen vermehrt IL-4 produzieren (Hoft et al. 1993; Zum Meyer Büschenfelde et al. 1998). Hierbei konnten IL-4<sup>-/-</sup> oder mit  $\alpha$ -IL-4-Antikörpern therapierte Mäuse den Parasiten wesentlich effizienter eliminieren als die jeweiligen Kontrollmäuse (Petray et al. 1993; Hiyama et al. 2001; Michailowsky et al. 2001). Dagegen führte eine gesteigerte IL-4-Produktion in sonst

resistenten C57Bl/6 Mäusen zu einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *T. cruzi* (Barbosa Oliveira et al. 1996; Silva et al. 2005). Auch in *T. cruzi*-infizierten IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen wurde die gesteigerte Parasitämie maßgeblich durch eine verstärkte IL-4-Produktion hervorgerufen (Hamano et al. 2003). Im Einklang hiermit war auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten EBI-3 $^{-/-}$  Mäusen die Produktion von IL-4 nach der Infektion mit *T. cruzi* erhöht. Aufgrund der bisherigen Studienlage wäre daher auch in diesen Mäusen ein kausaler Zusammenhang zwischen vermehrter IL-4-Produktion und erhöhten Suszeptibilität durchaus denkbar. In IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen konnte ein solcher Zusammenhang mit Hilfe von  $\alpha$ -IL-4-Antikörpern bereits für die Infektion mit *L. major* und *T. cruzi* erwiesen werden (Hamano et al. 2003; Artis et al. 2004a). In beiden Studien wurde durch die Behandlung mit  $\alpha$ -IL-4-Antikörpern die Parasitämie in IL-27R $\alpha^{-/-}$  Mäusen auf das Niveau von Wildtypmäusen gesenkt. Auch in weiterführenden Studien mit EBI-3 $^{-/-}$  Mäusen könnte eine Therapie mit  $\alpha$ -IL-4-Antikörpern oder der Vergleich mit IL-4 $^{-/-}$ /EBI-3 $^{-/-}$  Mäusen dabei helfen, die oben genannte Vermutung zu überprüfen.

Sollte tatsächlich IL-4 für die gesteigerte Suszeptibilität in *T. cruzi*-infizierten EBI-3 $^{-/-}$  Mäusen verantwortlich sein, so muss die anfälligkeitsfördernde Wirkung von IL-4 geklärt werden. Hierbei scheidet ein hemmender Einfluss von IL-4 auf die Parameter einer protektiven Th1-Antwort als Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse bereits aus. Ein zweiter Weg, über den IL-4 in vielen Infektionsmodellen zu der Entstehung eines suszeptiblen Phänotyps beiträgt, ist die Induktion von Arg-1 in sogenannten alternativ aktivierten Makrophagen (Corraliza et al. 1995; Munder et al. 1998; Louis et al. 1999; Mori 2007).

### **Die Rolle von Arg-1 in der Infektion mit *T. cruzi***

Im Gegensatz zu IFN $\gamma$ , welches in Makrophagen u.a. die Expression von NOS2 und LRG47 steigert und diese somit klassisch zur Eliminierung intrazellulärer Pathogene aktiviert, steigert IL-4 in Makrophagen die Expression von Arg-1. Diese Art der Makrophagenaktivierung wird alternative Aktivierung genannt (Munder et al. 1998; Noël et al. 2004; Stempin et al. 2010). Alternativ aktivierte Makrophagen sind nicht mehr in der Lage, intrazelluläre Pathogene wie *L. major* oder *M. tb.* adäquat zu eliminieren (Iniesta et al. 2001; Noël et al. 2004; Kropf et al. 2005; Hölscher et al. 2006; Kahnert et al. 2006; Rook 2007; Schreiber et al. 2009). Auch in der Infektion mit *T. cruzi* konnte bereits ein positiver

Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Arg-Aktivität in Makrophagen und einem vermehrten Parasitenwachstum beobachtet werden (Stempin et al. 2002, Cuervo et al. 2008; Stempin et al. 2010; Dulgerian et al. 2011). Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen von Makrophagen, die mit Leishmanien oder *T. brucei* infiziert wurden, sprechen für eine direkte Steigerung des Parasitenwachstums durch Arg-1. In diesen Studien konnte die Zahl der jeweiligen Parasiten durch die Zugabe mit N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA), einem potenten Arg-Inhibitor, deutlich gesenkt werden (Tenu et al. 1999; Iniesta et al. 2002; Duleu et al. 2004; Noël et al. 2004; Das et al. 2010). Ein wachstumsfördernder Einfluss von Arg-1 auf die Parasiten wurde auch in der Infektion mit *T. cruzi* nachgewiesen (Stempin et al. 2004). Arg ist ein Enzym des Harnstoffzyklus, das in 2 Isoformen vorliegt (Löffler et al. 1998a; Kropf et al. 2005; Das et al. 2010). Hierbei ist Arg-2 in den Mitochondrien einer Vielzahl eukaryoter Zellen zu finden, wohingegen Arg-1 vor allem im Zytoplasma von Leberzellen und Makrophagen vorkommt (Kropf et al. 2005; Mori 2007; Cuervo et al. 2008; Das et al. 2010). Da Makrophagen in der Immunantwort gegen *T. cruzi* eine wichtige Rolle spielen (Muñoz-Fernández et al. 1992; Vespa et al. 1994; Hölscher et al. 1998) und die Induktion der Arg-1 in alternativ aktivierten Makrophagen entscheidend diesen Effektorfunktionen entgegenwirkt, wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von EBI-3 auf die Expression von Arg-1 überprüft. In diesem Zuge konnte erstmals ein hemmender Einfluss von EBI-3 auf die Expression dieses Enzyms gezeigt werden. Anhand des vorliegenden Ergebnisses lässt sich jedoch nicht abschließend beurteilen, ob EBI-3 direkt oder indirekt über eine verminderte IL-4-Produktion auf die Expression von Arg-1 einwirkt. Auch hier wäre das Ausschalten von IL-4 über die Behandlung mit α-IL-4-Antikörpern hilfreich, um zu überprüfen, inwiefern die Arg-1-Expression in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen von IL-4 abhängt. Des Weiteren bleibt zu klären, inwiefern die vermehrt alternativ aktivierten Makrophagen in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen an der Entstehung des suszeptiblen Phänotyps beteiligt sind. In diesem Zusammenhang würde die Blockade der Arg-1-Expression in *T. cruzi*-infizierten EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen Rückschluss auf die Bedeutung dieses Enzyms in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen geben.

Es kann jedoch schon jetzt in der Infektion mit *T. cruzi* von einer Förderung des Parasitenwachstums durch Arg-1 ausgegangen werden. Hierfür spricht die Tatsache, dass einige Antigene von *T. cruzi* in der Lage sind, die Aktivität von Arg-1 in Wirtszellen direkt zu steigern und damit ihr eigenes Wachstum zu favorisieren (Giordanengo et al. 2002; Aoki et

al. 2004; Stempin et al. 2004). Die vorliegenden Ergebnisse reichen noch nicht aus, um einen solchen positiven Einfluss von Arg-1 auf die gesteigerte Parasitämie in EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen endgültig zu beweisen. Trotzdem geben die bisherigen Studienergebnisse Anlass dazu, sich etwas näher mit den Mechanismen zu beschäftigen, über die Arg-1 zu einem wachstumsfördernden Milieu für *T. cruzi* beitragen könnte.

### **Die Arg-1 abhängige Synthese von Polyaminen**

Das Arg-Produkt Ornithin ist nicht nur ein wichtiges Substrat im Harnstoffzyklus, sondern auch Ausgangsstoff für die Synthese der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin. Diese sind als essentielle Bestandteile fast aller eukaryoten Zellen, vor allem an Differenzierungs- und Proliferationsprozessen beteiligt (Bacchi und Yarlett 2002; Kaiser et al. 2003; Gerner und Meyskens 2004). Auch die Reproduktionsfähigkeit von *T. cruzi* und anderen Kinetoplastiden wird maßgeblich über die Anwesenheit dieser Polyamine bestimmt (González et al. 2001; Giordanengo et al. 2002; Roberts et al. 2004; Kropf et al. 2005). Hierbei konnte vor allem Spermidin eine außerordentliche Funktion zugesprochen werden (González et al. 2001; Kaiser et al. 2003). Dieses wird, im Unterschied zu anderen Zellarten in Kinetoplastiden, nicht in Spermin, sondern größtenteils in ein spezifisches Protein namens Trypanothion umgewandelt (Bacchi und Yarlett 2002; Kaiser et al. 2003; Müller et al. 2003). Als Detoxifikanz spielt Trypanothion vor allem in der Bewältigung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle (Fairlamb und Cerami 1992; Müller et al. 2003; Krauth-Siegel und Comini 2008). Da Kinetoplastiden im Wirtsorganismus fortlaufend mit dieser Art von Stress konfrontiert sind, ist Trypanothion essentiell für das Überleben dieser Protozoen. Im Gegensatz zu anderen Kinetoplastiden, die über eine eigene Arg verfügen, ist *T. cruzi* nicht in der Lage, Polyamine eigenständig herzustellen (Bacchi und Yarlett 2002; Carrillo et al. 2007). Demnach hängt das Überleben und die Proliferation von *T. cruzi* in hohem Maße von der Polyaminproduktion der Wirtszellen ab. Dies erklärt auch den starken Einfluss von *T. cruzi*-Antigenen auf die Aktivität von Arg-1 (Giordanengo et al. 2002; Aoki et al. 2004; Stempin et al. 2004). Auf der Basis dieser Erkenntnisse könnten sich weiterführende Studien mit dem Einfluss von EBI-3 auf die Produktion von Polyaminen beschäftigen. Im Zuge dessen könnte über die Hemmung wichtiger Enzyme der Polyaminsynthese auch der Einfluss dieser Substanzen auf den Infektionsverlauf von EIB-3-kompetenten und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden.

Unabhängig vom Ausgang einer solchen doch sehr speziellen Studie steht im allgemeinen bereits fest, dass Arg-1 über die Bereitstellung von Polyaminen ideale Bedingungen für sich replizierende *T. cruzi* schafft. Dies ist jedoch nicht der einzige Weg, über den Arg-1 das Wachstum der Parasiten fördert.

### **Der Einfluss von Arg-1 auf NOS2**

Die gesteigerte Aktivität von Arg-1 geht häufig mit einer verminderten Produktion von RNI einher (Wu und Morris 1998; Boucher et al. 1999; Duleu et al. 2004). Mit Hilfe Arg-1-inhibierender Substanzen konnte dieses Phänomen auf eine direkte Hemmung von NOS2 durch Arg-1 zurückgeführt werden (Tenu et al. 1999; Gobert et al. 2000; Duleu et al. 2004; Fabrino et al. 2004). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt bietet die Tatsache, dass beide Enzyme das selbe Substrat benutzen. NOS2 bildet aus L-Arginin Citrullin und trypanozidal wirkende RNI (Löffler et al. 1998b). Ist die Aktivität von Arg-1 gesteigert, so wird L-Arginin vermehrt in Harnstoff und parasitenfreundliches Ornithin gespalten (Löffler et al. 1998a; Kropf et al. 2005; Das et al. 2010). Auf diese Weise entsteht für NOS2 ein Substratmangel, der sich negativ auf die Produktion von RNI auswirkt (Wu und Morris 1998; Tenu et al. 1999; Boucher et al. 1999). Für diese kompetitive Hemmung der NOS2-Aktivität durch Arg-1 spricht die Tatsache, dass der inhibierende Einfluss von Arg-1 auf die Produktion von RNI durch die Gabe von L-Arginin komplett aufgehoben wurde (Duleu et al. 2004). Zusätzlich hierzu sind auch Polyamine in der Lage, die Aktivität von NOS2 zu inhibieren (Szabó et al. 1994; Blachier et al. 1997; Mössner et al. 2001; Bussi re et al. 2005; Chaturvedi et al. 2010). Dies geschieht sowohl direkt als auch indirekt über einen hemmenden Einfluss der Polyamine auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12p40, TNF und IFN  (Zhang et al. 1997; Hasko et al. 2000).

Diese Ergebnisse lassen auch in der Infektion mit *T. cruzi* eine wachstumsfördernde Wirkung von Arg-1 durch die Inhibierung der NOS2-Aktivität vermuten. Tatsächlich sprechen einige Studien, in denen eine aktive Arg-1 in der Infektion mit *T. cruzi* häufig mit einer verminderten Produktion von RNI einherging, bereits für diese Annahme (Stempin et al. 2002; Fabrino et al. 2004; Stempin et al. 2008; Dulgerian et al. 2011). Dementsprechend überraschend war das vorliegende Ergebnis, in dem *T. cruzi*-infizierte EBI-3<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl Arg-1 als auch NOS2 vermehrt exprimierten. Tatsächlich steht dieses Ergebnis jedoch im

Einklang mit anderen Studien, in denen selbst durch eine stark aktivierte Arg-1 keine Veränderung der Produktion von RNI erzielt wurde (Fligger et al. 1999; Kepka-Lenhart et al. 2000). Auch in der Infektion mit *L. major* oder *T. cruzi* war ein solcher Effekt zu beobachten. Hierbei steigerte die Immunisierung mit dem *T. cruzi*-Antigen Cruzipain in den Makrophagen der immunisierten BALB/c Mäuse die Aktivität von Arg-1, ohne die Produktion von RNI zu beeinflussen (Kropf et al. 2005). Anhand der spärlichen Studienlage kann momentan noch keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob und unter welchen Umständen NOS2 in der Infektion mit *T. cruzi* über eine gesteigerte Arg-Aktivität gehemmt wird. Auch in dieser Hinsicht wären Studien sinnvoll, die sich eingehender mit dem direkten Einfluss von Arg-1 auf die NOS2-Aktivität und die Parasitenlast in *T. cruzi*-infizierten EBI-3-kompetenten und EBI-3<sup>-/-</sup> Mäusen beschäftigen. Da in der vorliegenden Arbeit nur die Expression von NOS2 bestimmt wurde, sollte im Zuge dessen unbedingt auch die Konzentration und Aktivität von NOS2 überprüft werden. Dass die Menge an NOS2-RNA allein keine zuverlässige Aussage über die Aktivität des NOS2-Proteins zulässt, zeigen Studien, in denen sich Arg-1 und das Polyamin Spermin zwar negativ auf die Aktivität von NOS2 auswirkten, die Expression der NOS2-RNA jedoch nicht beeinflussen (El-Gayar et al. 2003; Bussi re et al. 2005). Im Rahmen nachfolgender Untersuchungen könnte ein möglicher direkter Einfluss der Arg-Aktivität auf die Produktion von RNI u.a.  ber die Hemmung von Arg-1 durch nor-NOHA überprüft werden. Je nach Ausgang dieser Studie wäre zusätzlich von Interesse, über welchen Weg Arg-1 vornehmlich auf NOS2 einwirkt. Hierbei könnte über die Substitution von L-Arginin die Wichtigkeit einer kompetitiven Hemmung abgeschätzt werden, wohingegen die Rolle von Polyaminen über ein Ausschalten wichtiger Enzyme der Polyaminsynthese beurteilt werden könnte.

Ein hemmender Einfluss auf NOS2 konnte in bisherigen Studien vor allem für das Polyamin Spermin erwiesen werden (Szab  et al. 1994 ; Blachier et al. 1997; Zhang et al. 1997; Hask  et al. 2000; M ssner et al. 2001; Chaturvedi et al. 2010). Die Polyamine Sperimidin und Putreszin zeigten dagegen nur einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die NOS2-Aktivität (Szab  et al. 1994; Blachier et al. 1997; Hask  et al. 2000). In den meisten Organismen wird aus Putreszin Spermidin und aus Spermidin Spermin gebildet (Bacchi und Yarlett 2002; Kaiser et al. 2003; Gerner und Meyskens 2004). Im Gegensatz hierzu bilden Kinetoplastiden aus Spermidin vermehrt das kinetoplastidenspezifische Trypanothion (Bacchi und Yarlett 2002;

Kaiser et al. 2003; Müller et al. 2003). Somit wäre es denkbar, dass *T. cruzi* über diesen Effekt in Wirtszellen einen Mangel an Spermidin erzeugt. In diesem Fall wäre Arg-1 nur noch über den Mangel von L-Arginin dazu in der Lage, NOS2 zu inhibieren. Unter diesen Gesichtspunkten könnten die gegensätzlichen Studienergebnisse zum Einfluss von Arg-1 auf die Produktion von RNI in der Infektion mit *T. cruzi* eventuell über einen Unterschied in der Verfügbarkeit von L-Arginin erklärt werden. Zukünftige Studien werden klären, ob sich diese Überlegungen auf die Realität übertragen lassen. Auf Grund des komplexen Zusammenhangs von NOS2 und Arg-1 werden noch viele Untersuchungen nötig sein, um Klarheit über die einzelnen Enzym-Interaktionen und deren Relevanz in der Immunantwort gegen diverse Pathogene zu gewinnen. Allerdings kann bereits jetzt davon ausgegangen werden, dass Arg-1 in der Infektion mit *T. cruzi* maßgeblich zu der Entstehung eines parasitenfreundlichen Milieus beiträgt.

### **4.3 Mögliche therapeutische Ansatzpunkte**

IL-17A ist für eine potente Immunantwort gegen *T. cruzi* unabdingbar. Eine Steigerung der Konzentration bzw. Produktion dieses Zytokins könnte demnach die Basis neuer Therapiekonzepte bilden. Allerdings hat IL-17A ebenso wie IFN $\gamma$  und andere proinflammatorische Mediatoren auch destruktive Eigenschaften, die einen alleinigen therapeutischen Gebrauch dieser Substanzen deutlich erschweren und ggf. sogar unmöglich machen. Eine medikamentöse Steigerung von IL-17A wäre daher ausschließlich in Kombination mit einer regulierenden, gewebesetzenden Substanz denkbar.

Ein weiterer Therapieansatz bestünde in der Hemmung von Substanzen wie Arg-1 oder IL-4, die die Entstehung eines suszeptiblen Phänotyps fördern. Allerdings führt auch das alleinige Ausschalten dieser regulatorischen Substanzen zu einer gesteigerten, unkontrollierten proinflammatorischen Immunantwort, die wiederum kaum vermeidbare Organschäden mit sich bringt.

In der vorliegenden Studie konnte belegt werden, dass EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* die Expression von Arg-1 hemmt und damit indirekt über die Drosselung von IL-4 einem unkontrollierten Parasitenwachstum entgegenwirkt. Zusätzlich hemmt EBI-3 die Produktion von IFN $\gamma$  und IL-17A und verhindert hierdurch eine überschießende, gewebedestruierende

Entzündungsreaktion. Somit ist EBI-3 in der Lage, die proinflammatorischen Zytokine zu regulieren ohne dadurch eine gesteigerte Parasitenproliferation zu riskieren.

In der vorliegenden Studie wird EBI-3 damit eine außerordentlich wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *T. cruzi* bescheinigt, die eine vielversprechende Basis für die Erforschung neuer Therapieansätze bildet.

## 5 Zusammenfassung

Die Immunantwort gegen stark pathogene Keime ist sehr vielfältig und in ihrer Komplexität noch lange nicht vollständig erforscht. Bereits jetzt ist jedoch klar, dass eine erfolgreiche Immunantwort maßgeblich von dem Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und regulierenden Mediatoren abhängt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle zweier Komponenten der Immunantwort, IL-17A und EBI-3, in der Infektion mit *T. cruzi* untersucht.

1.) Das proinflammatorische Zytokin IL-17A wurde primär mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht. Mittlerweile sprechen allerdings einige Studien für eine zusätzlich protektive Eigenschaft von IL-17A in der Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger. In der vorliegenden Arbeit konnte nun für die Infektion mit *T. cruzi* festgestellt werden, dass:

- IL-17A eine protektive Funktion einnimmt, indem es sich positiv auf den Infektionsverlauf und das Überleben *T. cruzi*-infizierter Mäuse auswirkt.
- IL-17A an der Entstehung einer *T. cruzi*-bedingten Leberpathologie beteiligt ist.
- IL-17A die Expression der Makrophageneffektorenzyme NOS2 und LRG47 steigert, ohne die Produktion von IFN $\gamma$  oder TNF zu beeinflussen.

2.) Der IL-27/IL-35-Untereinheit EBI-3 konnte bisher vor allem eine regulierende Eigenschaft zugeschrieben werden. Allerdings variierten die Zielzellen der EBI-3-gesteuerten Regulation in den unterschiedlichen Infektionsmodellen stark. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals festgestellt werden, dass:

- EBI-3 in der Infektion mit *T. cruzi* sowohl die Mediatoren der Th1- und Th17-Antwort als auch die der Th2-Antwort hemmt.
- EBI-3 sich in der Infektion mit *T. cruzi* positiv auf Parasiteneliminierung und Überleben auswirkt und einer Leberzelldestruktion entgegenwirkt.
- EBI-3 die alternative Aktivierung von Makrophagen durch die Hemmung der IL-4-vermittelten Arg-1-Expression unterbindet.

## Literaturverzeichnis

- Abrahamsohn IA, da Silva AP, Coffman RL: Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 68(4), 1975–1979 (2000).
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS: interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64(6), 1961–1967 (1996).
- Anderson CE, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D: IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. *J Immunol* 183(7), 4619–4627 (2009).
- Aoki MP, Guiñazú NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S: Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes *arginase-2* expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(2), C206-12 (2004).
- Appelberg R: Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 15(2), 87–92 (2007).
- Artis D, Johnson LM, Joyce K, Saris C, Villarino A, Hunter CA, Scott P: Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172(8), 4672–4675 (2004a).
- Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S, Summer S, Covey TM, Huang E, Yoshida H, Koretzky G, Goldschmidt M, Wu GD, Sauvage F de, Miller HR, Saris CJ, Scott P, Hunter CA: The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 173(9), 5626–5634 (2004b).
- Bacchi CJ, Yarlett N: Polyamine metabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. *Mini Rev Med Chem* 2(6), 553–563 (2002).
- Bai H, Cheng J, Gao X, Joyee AG, Fan Y, Wang S, Jiao L, Yao Z, Yang X: IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J Immunol* 183(9), 5886–5895 (2009).
- Bancroft AJ, Humphreys NE, Worthington JJ, Yoshida H, Grencis RK: WSX-1: a key role in induction of chronic intestinal nematode infection. *J Immunol* 172(12), 7635–7641 (2004).
- Barbosa Oliveira LC de, Curotto Lafaille MA de, Collet Araujo Lima GM de, Almeida Abrahamsohn I de: Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 170(1), 41–53 (1996).
- Basso AS, Cheroutre H, Mucida D: More stories on Th17 cells. *Cell Res* 19(4), 399–411 (2009).
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, Sauvage FJ de, Ghilardi N: Interleukin-27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin-17-producing T cells. *Nat Immunol* 7(9), 929–936 (2006).
- Bending D, La Peña H de, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A: Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* (2009).

- Bergeron M, Olivier M: *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J Immunol* 177(9), 6271–6280 (2006).
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090), 235–238 (2006).
- Blachier F, Mignon A, Soubrane O: Polyamines inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in rat liver cytosol. *Nitric Oxide* 1(3), 268–272 (1997).
- Bogdan C: Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2(10), 907–916 (2001).
- Bombeiro AL, D'Império Lima MR, Chadi G, Alvarez JM: Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN-gamma and S100beta protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Neuroimmunomodulation* 17(2), 67–78 (2010).
- Bonney KM, Engman DM: Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* 8(6), 510–518 (2008).
- Boucher JL, Moali C, Tenu JP: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 55(8-9), 1015–1028 (1999).
- Brahmachari S, Pahan K: Suppression of regulatory T cells by IL-12p40 homodimer via nitric oxide. *J Immunol* 183(3), 2045–2058 (2009).
- Buscaglia CA, Di Noia JM: *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* 5(5), 419–427 (2003).
- Bussière FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Wilson KT: Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem* 280(4), 2409–2412 (2005).
- Campos MA, Gazzinelli RT: *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm* 13(3), 139–143 (2004).
- Carl JW, Bai X: IL27: its roles in the induction and inhibition of inflammation. *Int J Clin Exp Pathol* 1(2), 117–123 (2008).
- Carrera-Silva EA, Carolina CR, Natalia G, Pilar AM, Andrea P, Gea S: TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol Immunol* 45(13), 3580–3588 (2008).
- Carrillo C, González NS, Algranati ID: *Trypanosoma cruzi* as a model system to study the expression of exogenous genes coding for polyamine biosynthetic enzymes. Induction of DFMO resistance in transgenic parasites. *Biochim Biophys Acta* 1770(12), 1605–1611 (2007).
- Chackerian AA, Chen S, Brodie SJ, Mattson JD, McClanahan TK, Kastelein RA, Bowman EP: Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun* 74(11), 6092–6099 (2006).
- Chagas C: Nova tripanozomiaze humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1(2), 159–218 (1909).

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospíšil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G: Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173(4), 869–879 (1991).

Chang SH, Dong C: A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 17(5), 435–440 (2007).

Chaplin DD: Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125(2), 3-23 (2010).

Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F: The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 719361 (2010).

Chaturvedi R, Asim M, Hoge S, Lewis ND, Singh K, Barry DP, Sablet T de, Piazuolo MB, Sarvaria AR, Cheng Y, Closs EI, Casero RA, Gobert AP, Wilson KT: Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. *Gastroenterology* 139(5), 1686-98 (2010).

Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F: Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur J Immunol* 31(1), 265–275 (2001).

Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, Sauvage FJ de: Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407(6806), 916–920 (2000).

Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA: Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182(10), 6121–6128 (2009).

Collison LW, Vignali DA: Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev* 226, 248–262 (2008).

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450(7169), 566–569 (2007).

Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M: Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206(2), 667–673 (1995).

Coura JR: Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(4), 549–554 (2009).

Coura JR, Borges-Pereira J: Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115(1-2), 5–13 (2010).

Croft M: Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* 6(3), 431–437 (1994).

Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Torrado E, Saraiva M, Pereira DR, Randall TD, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG: Pathological role of interleukin-17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 207(8), 1609–1616 (2010).

Cuervo H, Pineda MA, Aoki MP, Gea S, Fresno M, Gironès N: Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. *J Infect Dis* 197(12), 1772–1782 (2008).

Curtis MM, Way SS: Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126(2), 177–185 (2009).

da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS: IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 4(2), e604 (2010).

Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR: Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann NY Acad Sci* 1183, 211–221 (2010).

Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC: Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 31(3), 252–256 (2008).

Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D: Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 6(6), e1000899 (2010).

Dermine J, Desjardins M: Survival of intracellular pathogens within macrophages. *Protoplasma* 210, 11–24 (1999).

Devergne O, Birkenbach M, Kieff E: Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin-12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22), 12041–12046 (1997).

Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M: A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 70(2), 1143–1153 (1996).

Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, Waal Malefyt R de, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA: IL-27 blocks ROR $\gamma$ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182(9), 5748–5756 (2009).

Dong C: Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev* 226, 80–86 (2008).

Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouède S, Boucher J, Wilson KT, Veyret B, Gobert AP: Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol* 172(10), 6298–6303 (2004).

Dulgerian LR, Garrido VV, Stempin CC, Cerbán FM: Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology* 133(1), 29–40 (2011).

Dutra WO, Gollob KJ: Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 21(3), 287–292 (2008).

El-Gayar S, Thüning-Nahler H, Pfeilschifter J, Röllinghoff M, Bogdan C: Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol* 171(9), 4561–4568 (2003).

Fabrino DL, Leon LL, Parreira GG, Genestra M, Almeida PE, Melo RC: Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide* 11(2), 166–174 (2004).

Fairlamb AH, Cerami A: Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46, 695–729 (1992).

Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A: IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170(4), 2106–2112 (2003).

Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang G, Rostami A: Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179(5), 3268–3275 (2007).

Fligger J, Blum J, Jungi TW: Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro. *Immunobiology* 200(2), 169–186 (1999).

Fossiez F, Djossou O, Chomarot P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S: T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183(6), 2593–2603 (1996).

Freeswick PD, Wan Y, Geller DA, Nussler AK, Billiar TR: Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis. *J Surg Res* 57(1), 205–209 (1994).

Frosch S, Kraus S, Fleischer B: *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. *Med Microbiol Immunol* 185(3), 189–193 (1996).

Frucht DM: IL-23: a cytokine that acts on memory T cells. *Sci STKE* 114, pe1 (2002).

Fujita H, Teng A, Nozawa R, Takamoto-Matsui Y, Katagiri-Matsumura H, Ikezawa Z, Ishii Y: Production of both IL-27 and IFN-gamma after the treatment with a ligand for invariant NK T cells is responsible for the suppression of Th2 response and allergic inflammation in a mouse experimental asthma model. *J Immunol* 183(1), 254–260 (2009).

Gaffen SL: Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9(8), 556–567 (2009a).

Gaffen SL: The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11(5), 365–370 (2009b).

Gately MK, Warriar RR, Honasoge S, Carvajal DM, Faherty DA, Connaughton SE, Anderson TD, Sarmiento U, Hubbard BR, Murphy M: Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. *Int Immunol* 6(1), 157–167 (1994).

Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A: The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8(1), 40–52 (2009).

Gerhardt S, Abbott WM, Hargreaves D, Pauptit RA, Davies RA, Needham MR, Langham C, Barker W, Aziz A, Snow MJ, Dawson S, Welsh F, Wilkinson T, Vaugan T, Beste G, Bishop S, Popovic B, Rees G, Sleeman M, Tuske SJ, Coales SJ, Hamuro Y, Russell C: Structure of IL-17A

in complex with a potent, fully human neutralizing antibody. *J Mol Biol* 394(5), 905–921 (2009).

Germann T, Gately MK, Schoenhaut DS, Lohoff M, Mattner F, Fischer S, Jin SC, Schmitt E, Rüde E: Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* 23(8), 1762–1770 (1993).

Gerner EW, Meyskens FL: Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4(10), 781–792 (2004).

Giordanengo L, Guiñazú N, Stempin C, Fretes R, Cerbán F, Gea S: Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol* 32(4), 1003–1011 (2002).

Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P: L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* 68(8), 4653–4657 (2000).

González NS, Huber A, Algranati ID: Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. *FEBS Lett* 508(3), 323–326 (2001).

Graefe SE, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C, Fleischer B: Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbes Infect* 5(10), 833–839 (2003).

Guiñazú N, Pellegrini A, Giordanengo L, Aoki MP, Rivarola HW, Cano R, Rodrigues MM, Gea S: Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect* 6(14), 1250–1258 (2004).

Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, Ryffel B, Dimier-Poisson I: Interleukin-17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis* 202(3), 427–435 (2010).

Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS: The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(1), 236–245 (2009).

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H: WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19(5), 657–667 (2003).

Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK: Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202(6), 761–769 (2005).

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT: Interleukin-17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11), 1123–1132 (2005).

Haskó G, Kuhel DG, Marton A, Nemeth ZH, Deitch EA, Szabó C: Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma. *Shock* 14(2), 144–149 (2000).

Hausding M, Karwot R, Scholtes P, Lehr HA, Wegmann M, Renz H, Galle PR, Birkenbach M, Neurath MF, Blumberg RS, Finotto S: Lung CD11c+ cells from mice deficient in Epstein-Barr

virus-induced gene 3 (EBI-3) prevent airway hyper-responsiveness in experimental asthma. *Eur J Immunol* 37(6), 1663–1677 (2007).

Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM: In vivo production and function of IL-12p40 homodimers. *J Immunol* 158(9), 4381–4388 (1997).

Henry SC, Daniell X, Indaram M, Whitesides JF, Sempowski GD, Howell D, Oliver T, Taylor GA: Impaired macrophage function underscores susceptibility to Salmonella in mice lacking Irgm1 (LRG-47). *J Immunol* 179(10), 6963–6972 (2007).

Henry SC, Traver M, Daniell X, Indaram M, Oliver T, Taylor GA: Regulation of macrophage motility by Irgm1. *J Leukoc Biol* 87(2), 333–343 (2010).

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH: TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177(11), 7980–7989 (2006).

Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I: IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 87(4), 269–274 (2001).

Ho AW, Gaffen SL: IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond. *Semin Immunopathol* 32(1), 33–42 (2010).

Hoft DE, Lynch RG, Kirchhoff LV: Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 151(12), 7038–7047 (1993).

Hoft DE, Eickhoff CS: Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect Immun* 73(8), 4934–4940 (2005).

Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myhurgh E, Brombacher F: Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 176(2), 1115–1121 (2006).

Hölscher C, Hölscher A, Rückerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, Saris C, Ehlers S: The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol* 174(6), 3534–3544 (2005).

Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F: Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66(3), 1208–1215 (1998).

Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F: Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 68(7), 4075–4083 (2000).

Hölscher C: Targeting IL-23 in autoimmunity. *Curr Opin Investig Drugs* 6(5), 489–495 (2005).

Hölscher C: The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol* 193(1), 1–17 (2004).

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L: Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357(10), 1018–1027 (2007).

- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P: Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190(3), 624–631 (2004).
- Hunn JP, Howard JC: The mouse resistance protein Irgm1 (LRG-47): a regulator or an effector of pathogen defense? *PLoS Pathog* 6(7), e1001008 (2010).
- Hunter CA, Slifer T, Araujo F: Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun* 64(7), 2381–2386 (1996).
- Hyland KV, Engman DM: Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. author reply 103. *Trends Parasitol* 22(3), 101-102 (2006).
- Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, Vos AM, Starovasnik MA: IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 20(19), 5332–5341 (2001).
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T: Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165(11), 6107–6115 (2000).
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I: The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193(6), 777–784 (2001).
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I: Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24(3), 113–118 (2002).
- Jankowski M, Kopiński P, Goc A: Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application. *Arch immunol ther exp* 58(6), 417-425 (2010).
- Jannin J, Villa L: An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(1), 95–97 (2007).
- Jha R, Srivastava P, Salhan S, Finckh A, Gabay C, Mittal A, Bas S: Spontaneous secretion of interleukin-17 and -22 by human cervical cells in *Chlamydia trachomatis* infection. *Microbes Infect* 13(2), 167–178 (2011).
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP: IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160(7), 3513–3521 (1998).
- Kahnert A, Seiler P, Stein M, Bandermann S, Hahnke K, Mollenkopf H, Kaufmann SH: Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 36(3), 631–647 (2006).
- Kaiser AE, Gottwald AM, Wiersch CS, Maier WA, Seitz HM: Spermidine metabolism in parasitic protozoa- a comparison to the situation in prokaryotes, viruses, plants and fungi. *Folia Parasitol* 50(1), 3–18 (2003).
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S: IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 114(6), 1265-1273 (2004).

Kayama H, Takeda K: The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 12(7), 511–517 (2010).

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA: Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 73(1), 617–621 (2005).

Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Wu G, Morris SM: Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(6), R2237-R2242 (2000).

Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM: IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8(4), 369–377 (2007).

Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM, Ghilardi N, deSavage F, Cooper AM: IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN- $\gamma$  responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175(2), 788–795 (2005).

Khan D, Dai R, Karpuzoglu E, Ahmed SA: Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN- $\gamma$  decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice. *Eur J Immunol* 40(9), 2549–2556 (2010).

Kierszenbaum F: Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21(11), 513–516 (2005).

Kimura A, Kishimoto T: IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40(7), 1830–1835 (2010).

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86(4), 1243–1254 (1995).

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170(3), 827–845 (1989).

Kochetkova I, Golden S, Holderness K, Callis G, Pascual DW: IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol* 184(12), 7144–7153 (2010).

Kolls JK, Lindén A: Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21(4), 467–476 (2004).

Krauth-Siegel RL, Comini MA: Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1780(11), 1236–1248 (2008).

Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Müller I: Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* 19(8), 1000–1002 (2005).

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, Waal Malefyt R de, Kastelein RA, Cua DJ: IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202, 96–105 (2004).

---

- Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH: Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Argent Microbiol* 28(2), 99-109 (1996).
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT: Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30(1), 92–107 (2009).
- Li X, Yuan F, Lu W, Zhao Y, Li C, Li J, Xu R: The role of interleukin-17 in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 397(2), 131–135 (2010).
- Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T: NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun* 72(12), 6817-6825 (2004).
- Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P: Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 65(2), 457–465 (1997).
- Lindén A, Laan M, Anderson GP: Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 25(1), 159–172 (2005).
- Liu J, Guan X, Ma X: Regulation of IL-27p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med* 204(1), 141–152 (2007).
- Löffler G, Petrides PE, Löffler-Petrides: Kapitel 19 Stoffwechsel der Aminosäuren. In: Biochemie und Pathobiochemie; 6. korr. Aufl, *Springer*, Berlin, 534-541 (1998a).
- Löffler G, Petrides PE, Löffler-Petrides: Kapitel 27 Endokrine Gewebe 1. In: Biochemie und Pathobiochemie; 6. korr. Aufl., *Springer*, Berlin, 782-783 (1998b).
- Löffler G, Petrides PE, Löffler-Petrides: Kapitel 37 Immunsystem. In: Biochemie und Pathobiochemie; 6. korr. Aufl., *Springer*, Berlin, 782-783 (1998c).
- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Stebut E v.: IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182(5), 3039–3046 (2009).
- Louis CA, Mody V, Henry WL, Reichner JS, Albina JE: Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 276, R237-R242 (1999).
- Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkins SC, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW: Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 157(8), 3577–3586 (1996).
- Lucas S, Ghilardi N, Li J, Sauvage FJ de: IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25), 15047–15052 (2003).
- Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, Fulcher DA, Tangye SG, Cook MC: Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med* 205(7), 1551–1557 (2008).
- Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP de, Mauad MA, Colturato VR: Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of

the literature and experience of a Brazilian HSCT center. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51(6), 309–324 (2009).

MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD: Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302(5645), 654–659 (2003).

Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP: Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 42(11), 2399–2409 (1999).

Martens S, Sabel K, Lange R, Uthaiyah R, Wolf E, Howard JC: Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis. *J Immunol* 173(4), 2594–2606 (2004).

Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A: How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 7(1), 62–66 (2004).

McCabe RE, Meagher SG, Mullins BT: Endogenous interferon-gamma, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 163(4), 912–915 (1991).

McGeachy MJ, Cua DJ: Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28(4), 445–453 (2008).

Mehlhorn H, Armstrong PM: Encyclopedic reference of parasitology - Biology, Structure, Function; 2. Aufl., *Springer*, Berlin, 324-326 und 650-654 (2001).

Mesquita Jr D, Cruvinel WM, Câmara NO, Kállas EG, Andrade LE: Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res* 42(6), 476–486 (2009).

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT: Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159(5), 1723–1733 (2001).

Miljkovic D, Cvetkovic I, Momcilovic M, Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V: Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase-dependent toxicity in mouse beta cells. *Cell Mol Life Sci* 62(22), 2658–2668 (2005).

Miljkovic D, Cvetkovic I, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V: The role of interleukin-17 in inducible nitric oxide synthase-mediated nitric oxide production in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 60(3), 518–525 (2003).

Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC: Impaired TH 17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452(7188), 773–776 (2008).

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H: IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 185(2), 1150–1157 (2010).

Miyazaki Y, Inoue H, Matsumura M, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, Hamano S, Yoshimura A, Yoshida H: Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice. *J Immunol* 175(4), 2401–2407 (2005).

Molle C, Nguyen M, Flamand V, Renneson J, Trottein F, Wit D de, Willems F, Goldman M, Goriely S: IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J Immunol* 178(12), 7607–7615 (2007).

Moncayo A: Chagas disease. In: Murry C, Lopez A, Mathers C: WHO- The global epidemiology of infectious diseases. Global burden of disease and injury; 4. Aufl. (2004); [http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241592303\\_chap11.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241592303_chap11.pdf) (zuletzt geprüft am 06.11.2011).

Monteiro AC, Schmitz V, Morrot A, Arruda LB de, Nagajyothi F, Granato A, Pesquero JB, Müller-Esterl W, Tanowitz HB, Scharfstein J: Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog* 3(11), e185 (2007).

Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC, Todorov A, Arruda LB de, Torrecilhas AC, Pesquero JB, Morrot A, Bouskela E, Bonomo A, Lima A, Paula CA, Müller-Esterl W, Scharfstein J: Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 177(9), 6325–6335 (2006).

Mori M: Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 137(6), 1616S-1620S (2007).

Mössner J, Hammermann R, Racké K: Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther* 14(4), 297–305 (2001).

Mühl H, Bachmann M, Pfeilschifter J: Inducible NO synthase and antibacterial host defence in times of Th17/Th22/T22 immunity. *Cell Microbiol* 13(3), 340–348 (2011).

Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL: Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol* 19(7), 320–328 (2003).

Munder M, Eichmann K, Modolell M: Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160(11), 5347–5354 (1998).

Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M: Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 22(2), 301–307 (1992).

Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M: Kapitel 2 Die Angeborene Immunität. In: Janeway- Immunologie; 7. Aufl., *Spektrum Akad Verl*, Heidelberg, 58-133 (2009a).

Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M: Kapitel 8 Die T-Zell-vermittelte Immunität. In: Janeway- Immunologie; 7. Aufl., *Spektrum Akad Verl*, Heidelberg, 317-342 (2009b).

Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y: Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17(3), 375–387 (2002).

Niedbala W, Wei X, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, Liew FY: IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 37(11), 3021–3029 (2007).

Nieuwenhuis EE, Neurath MF, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, Glickman J, Bailey D, Yoshida M, Galle PR, Kronenberg M, Birkenbach M, Blumberg RS: Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26), 16951–16956 (2002).

Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, Baetselier P de, Beschin A: Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* 20(3), 126–133 (2004).

O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM: Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181(6), 3750–3754 (2008).

Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G: Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 184(8), 4414–4422 (2010).

Omata F, Birkenbach M, Matsuzaki S, Christ AD, Blumberg RS: The expression of IL-12p40 and its homologue, Epstein-Barr virus-induced gene 3 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 7(3), 215–220 (2001).

Onishi RM, Gaffen SL: Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129(3), 311–321 (2010).

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, Waal-Malefyt R de, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13(5), 715–725 (2000).

Ostensen ME, Thiele DL, Lipsky PE: Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol* 138(12), 4185–4191 (1987).

Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T: A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol* 175(4), 2191–2200 (2005).

Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA: T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 39(5), 626–639 (2009).

Paiva CN, Pyrrho AS, Lannes-Vieira J, Vacchio M, Soares MB, Gattass CR: *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant SEB-induced shock: overrelease of inflammatory cytokines and independence of Chagas' disease or TCR V $\beta$ -usage. *Shock* 19(2), 163–168 (2003).

Palhares PE, Fontana Júnior P, Schaffer GM, Marcondes NS, Vergara M: Tissue damage markers in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 21(5), 957–959 (1988).

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D,

Rennick DM, Kastelein RA, Waal R de, Moore KW: A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168(11), 5699–5708 (2002).

Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA: IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 184(4), 1776–1783 (2010).

Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM: Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 68(2), 577–583 (2000).

Petray PB, Rottenberg ME, Bertot G, Corral RS, Diaz A, Orn A, Grinstein S: Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett* 35(1), 77–80 (1993).

Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, Waal Malefyt R de, Kastelein RA: WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172(4), 2225–2231 (2004).

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, Waal Malefyt R de, Rennick D, Kastelein RA: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16(6), 779–790 (2002).

Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, el Kheir M, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A: IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 119(8), 2379–2387 (2009).

Planelles L, Thomas M, Pulgar M, Marañón C, Grabbe S, López MC: *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80(3), 241–247 (2002).

Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, Luger D, Nussenblatt RB, Caspi RR: Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma t and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 180(8), 5167–5171 (2008).

Raes G, Baetselier P de, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G: Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71(4), 597–602 (2002).

Ramachandra L, Simmons D, Harding CV: MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* 21(1), 98–104 (2009).

Rassi A, Marin-Neto JA: Chagas disease. *Lancet* 375(9723), 1388–1402 (2010).

Revelli S, Gómez L, Wietzerbin J, Bottasso O, Basombrio MA: Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4, 6 and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 85(2), 147–150 (1999).

Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B: Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem* 279(22), 23668–23678 (2004).

Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB: CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett* 73(1), 43–50 (2000).

Rook GA: Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med* 7(3), 327–337 (2007).

Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C, Sauvage FJ de, Satoskar AR: Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to *Leishmania donovani* infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 168(1), 158–169 (2006).

Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P: CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 150(12), 5445–5456 (1993).

Rückerl D, Hessmann M, Yoshimoto T, Ehlers S, Hölscher C: Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor alpha chain WSX-1. *Immunobiology* 211(6-8), 427–436 (2006).

Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE: Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 75(6), 3055–3061 (2007).

Salvucci O, Kolb JP, Dugas B, Dugas N, Chouaib S: The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. *Blood* 92(6), 2093–2102 (1998).

Santiago HC, Feng CG, Bafica A, Roffe E, Arantes RM, Cheever A, Taylor G, Vieira LQ, Vierira LQ, Aliberti J, Gazzinelli RT, Sher A: Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J Immunol* 175(12), 8165–8172 (2005).

Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM: Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74(4), 2031–2042 (2006).

Schmunis GA: Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1), 93–101 (1999).

Schmunis GA: Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(1), 75–85 (2007).

Schreiber T, Ehlers S, Heitmann L, Rausch A, Mages J, Murray PJ, Lang R, Hölscher C: Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol* 183(2), 1301–1312 (2009).

Schulz SM, Köhler G, Hölscher C, Iwakura Y, Alber G: IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica*

serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 20(9), 1129–1138 (2008).

Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M: Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273(42), 27467–27473 (1998).

Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I: Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* 181(10), 7205–7213 (2008).

Siebler J, Wirtz S, Frenzel C, Schuchmann M, Lohse AW, Galle PR, Neurath MF: Cutting edge: a key pathogenic role of IL-27 in T cell-mediated hepatitis. *J Immunol* 180(1), 30–33 (2008).

Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, Meis J de, Pereira RM, Wu Z, Calegari-Silva TC, Seabra SH, Lopes UG, Siegel RM, DosReis GA, Lopes MF: Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 174(10), 6314–6321 (2005).

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ: Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63(12), 4862–4867 (1995).

Silveira da JF, Umezawa ES, Luquetti AO: Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17(6), 286–291 (2001).

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V: Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313(5792), 1438–1441 (2006).

Soehnlein O: Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med* 87(12), 1157–1164 (2009).

Sorace JM, Johnson RJ, Howard DL, Drysdale BE: Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J Leukoc Biol* 58(4), 477–484 (1995).

Sprecher CA, Grant FJ, Baumgartner JW, Presnell SR, Schrader SK, Yamagiwa T, Whitmore TE, O'Hara PJ, Foster DF: Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 246(1), 82–90 (1998).

Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM: Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol*, 683485 (2010).

Stempin CC, Garrido VV, Dulgerian LR, Cerbán FM: Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop* 106(2), 119–127 (2008).

Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerbán F: Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol* 72(4), 727–734 (2002).

Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerbán FM: Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* 34(1), 200–209 (2004).

- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen LE, Hunter CA: Interleukin-27 negatively regulates the development of interleukin-17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7(9), 937–945 (2006).
- Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH: Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gamma delta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31(2), 331–341 (2009).
- Szabó C, Southan GJ, Thiemermann C, Vane JR: The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 133(3), 757–766 (1994).
- Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H: Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170(10), 4886–4890 (2003).
- Tanowitz H, Wittner M, Werner C, Weiss L, Cyrus B: Trypanosomes. In: Lederberg, J: Encyclopedia of microbiology; 2. Aufl., *Acad Press San Diego, Calif*, 725-734 (2000).
- Tarleton RL: Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19(4), 430–434 (2007).
- Taylor GA: IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 9(5), 1099–1107 (2007).
- Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL: Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. *Nitric Oxide* 3(6), 427–438 (1999).
- Tjelle TE, Lovdal T, Berg T: Phagosome dynamics and function. *Bioessays* 22(3), 255–263 (2000).
- Tong H, Miyazaki Y, Yamazaki M, Hara H, Waldmann H, Hori S, Yoshida H: Exacerbation of delayed-type hypersensitivity responses in EBV-induced gene-3 (EBI-3)-deficient mice. *Immunol Lett* 128(2), 108–115 (2010).
- Torrice E, Heremans H, Rivera MT, van Marck E, Billiau A, Carlier Y: Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146(10), 3626–3632 (1991).
- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J: Cutting edge: interleukin-17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 177(1), 36–39 (2006).
- Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T, Markovic M, Miljkovic D, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M: Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol* 119(2), 183–191 (2001).
- Trez C de, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E: iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog* 5(6), e1000494 (2009).
- Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G: IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune

response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178(6), 3786–3796 (2007).

Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA, Orn A: Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 121(3), 499–505 (2000).

Une C, Andersson J, Orn A: Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 134(2), 195–201 (2003).

Veerdonk van de FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG: Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42(12), 776–787 (2009).

Veerdonk van de FL, Teirlinck AC, Kleinnijenhuis J, Kullberg BJ, van Crevel R, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG: *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. *J Leukoc Biol* 88(2), 227–232 (2010).

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS: Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* 62(11), 5177–5182 (1994).

Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA: The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19(5), 645–655 (2003).

Villarino A, Hunter CA: Biology of recently discovered cytokines: discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* 6(5), 225–233 (2004).

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S: Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331(6013), 44–49 (2011).

Wan YY, Flavell RA: How diverse-CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1(1), 20–36 (2009).

Wang Y, Liu Y: The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* 20(6), 697–702 (2008).

WHO/TDR: Reporte sobre la enfermedad de Chagas; herausgegeben von Guhl F, Lazdins-Helds J. K. (2007); <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas> (zuletzt geprüft am 06.11.2011).

Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild H, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF: EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* 174(5), 2814–2824 (2005).

Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146(9), 3074–3081 (1991).

World Health Organization: Control of Chagas Disease. WHO technical report series 905; Herausgegeben von Cua D, Dias J, Frasch A, Guhl T, Lazzari J, Lorca M, Monroy Escobar C, Ponce C, Silveira A, Velazquez G, Zingales B (2002);

[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf) (zuletzt geprüft am 06.11.2011).

Wright JE, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM: Identification of an interleukin-17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 282(18), 13447–13455 (2007).

Wu G, Morris SM: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336, 1–17 (1998).

Yang J, Yang M, Htut TM, Ouyang X, Hanidu A, Li X, Sellati R, Jiang H, Zhang S, Li H, Zhao J, Ting AT, Mayer L, Unkeless JC, Labadia ME, Hodge M, Li J, Xiong H: Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t. *Eur J Immunol* 38(5), 1204–1214 (2008).

Yao Z, Timour M, Painter S, Fanslow W, Spriggs M: Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene. *Gene* 168(2), 223–225 (1996).

Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE, Kolls JK: Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(3), 335–340 (2001a).

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK: Requirement of interleukin-17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194(4), 519–527 (2001b).

Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K: IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 179(7), 4415–4423 (2007).

Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H: Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 177(8), 5377–5385 (2006).

Zahn S, Wirtz S, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF, Stebut E v.: Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 35(4), 1106–1112 (2005).

Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ: Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 185(10), 1759–1768 (1997).

Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P: Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3), e648 (2010).

Zhang X, Gao L, Lei L, Zhong Y, Dube P, Berton MT, Arulanandam B, Zhang J, Zhong G: A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum*. *J Immunol* 183(2), 1291–1300 (2009).

Zheng W, Flavell RA: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89(4), 587–596 (1997).

Zhou X, Chen Q, Moore J, Kolls JK, Halperin S, Wang J: Critical role of the interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in regulating host susceptibility to respiratory infection with *Chlamydia* species. *Infect Immun* 77(11), 5059–5070 (2009).

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR: Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1), 159–164 (1999).

Zum Meyer Büschenfelde C, Cramer S, Fleischer B, Frosch S: Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice does not necessarily correlate with production of interferon-gamma in vivo. *Med Microbiol Immunol* 187(2), 107–113 (1998).

## Danksagung

Diese Seite möchte ich dazu nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die mich auf dem langen Weg dieser Promotion unterstützt und diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle danke ich hierbei Prof. Dr. Christoph Hölscher für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die freundliche und geduldige Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Prof. Dr. Stefan Ehlers danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dr. Thomas Jakobs danke ich für die wissenschaftlichen Anregungen, für die unkomplizierte Zusammenarbeit, für die Möglichkeit, Teile meiner Experimente in seinem Labor am BNI durchzuführen und für die Bereitstellung von Käfigplätzen.

Frau Alexandra Hölscher danke ich für das geduldige Einführen in die diversen experimentellen Arbeitstechniken, für ihre uneingeschränkte Verfügbarkeit und den freundschaftlichen Umgang.

Frau Christiane Steeg danke ich für die Betreuung der Mäuse am BNI in Hamburg und für die Unterstützung während meiner dortigen Arbeitsschritte.

Des Weiteren will ich mich bei allen Mitgliedern des Bereiches Molekulare Entzündungsmedizin bedanken, für die anregenden Diskussionen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und den fachlichen sowie privaten Rückhalt. Hierunter sind u.a. Dominik, Manu, JC, Daggi, Christine, Janni und Kolja zu nennen.

Ein weiteres Dankeschön gilt meiner lieben WG, die mich in der gesamten Phase der Niederschrift ertragen musste und mich hervorragend unterstützt hat.

Abschließend danke ich aus tiefstem Herzen meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mich in meinem bisherigen schulischen und beruflichen Werdegang immer uneingeschränkt unterstützt haben und ohne deren Motivation und Ansporn ich nie so weit gekommen wäre.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne Zuhilfenahme weiterer als der in der Arbeit angegebenen personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Arbeit wurde weder zu einem früheren Zeitpunkt noch wird sie gleichzeitig an einer anderen Hochschule als der Universität zu Lübeck zur Begutachtung eingereicht. Ein Antrag zur Zulassung an einer anderen Universität wurde nicht gestellt. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass die durchgeführten Tierversuche meinem Betreuer Prof. Dr. C. Hölscher und Dr. T. Jacobs, dem Leiter des Versuchsvorhabens am BNI, vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien Hansestadt Hamburg am 23.05.2007 unter dem Aktenzeichen 27/07 genehmigt wurden.

Lübeck, Mai 2012

## Aufstellung der aus dieser Arbeit resultierenden Veröffentlichungen

### Poster

Erdmann H, Rossnagel C, Ghilardi N, Iwakura Y, Renauld J-C, Jacobs T, Hölscher C: IL-23-dependent IL-17A and IL-22 production is required for protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection.

Boehme J, Rossnagel C, Jacobs T, Hölscher C, Erdmann H: The Epstein-Barr virus-induced gene (EBI3) regulates inflammatory immune responses during infection with *Trypanosoma cruzi*.

### Publikationen

Erdmann H, Rossnagel C, Böhme J, Iwakura Y, Jacobs T, Schaible U, Hölscher C: IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. *Immunobiology* S0171-2985(12), 00515-3 (2012)