

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. D. Pfeffer

***Toxoplasma gondii* Antigenexport und -präsentation
im Hirn**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Anja Nilges

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Korreferent: PD Dr. med. Roland Meisel

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefassten Ergebnisse wurden von September 2000 bis März 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erarbeitet. Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Originalarbeit:

Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G. and Fischer, H.G. 2002. **Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7.** *Microbes and Infection.* 4: 581-590

Tagungsbeitrag:

Neudeck, A., Stachelhaus, S., Reichmann, G. and Fischer, H.G. 2001. **The *Toxoplasma gondii* secretory protein GRA7 appears at the surface of viable host cells.** 32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology, Dresden. *Immunobiology.* 204: 163

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft über das Graduiertenkolleg 320 „Pathologische Prozesse des Nervensystems - Vom Gen zum Verhalten“

Meinen Eltern
Brunhilde & Jacobus Brings

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	2
	2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	2
	2.1.1 Morphologie.....	2
	2.1.2 Lebenszyklus.....	4
	2.2 Toxoplasmose.....	6
	2.2.1 Diagnostik und Therapie.....	7
	2.3 Infektion von Wirtszellen und intrazelluläre Entwicklung.....	9
	2.3.1 Invasion.....	9
	2.3.2 GRA-Proteine.....	10
	2.3.3 GRA7.....	12
	2.4 Immunantwort gegen <i>T. gondii</i>	13
	2.4.1 Zellvermittelte Immunantwort.....	13
	2.4.2 Funktion von Dendritischen Zellen bei der Toxoplasmenabwehr.....	15
	2.5 Fragestellung.....	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	19
	3.1 Material.....	19
	3.1.1 Plastik- und Einwegartikel.....	19
	3.1.2 Reagenzien.....	19
	3.1.3 Medien und Zusätze.....	21
	3.1.4 Antikörper.....	22
	3.1.4.1 Monoklonale Antikörper (mAk).....	22
	3.1.4.2 <i>T. gondii</i> -spezifische Antikörper.....	22
	3.1.4.3 Sekundärantikörper.....	23
	3.1.5 Zytokine.....	23
	3.1.6 Enzyme.....	23
	3.1.7 Nukleotide.....	23
	3.1.8 Geräte.....	23

3.2 Zellkultur.....	24
3.2.1 Wirtszellen.....	24
3.2.1.1 L929.....	24
3.2.1.2 HS27.....	24
3.2.2 <i>T. gondii</i> -Stämme.....	25
3.2.2.1 Isolat aBK und Transfektanten des Isolats RH.....	25
3.2.2.2 Isolat Dx.....	25
3.2.3 <i>T. gondii</i> -spezifische T-Zellklone.....	26
3.3 Infektion mit <i>T. gondii</i>	26
3.3.1 Infektion von Mäusen.....	26
3.3.2 Puls-Infektion von HS27-Fibroblasten.....	27
3.4 Zellpräparationen.....	27
3.4.1 Gewinnung von Milzzellen.....	27
3.4.2 Präparation intrazerebraler Leukozyten (ICL).....	28
3.4.3 T-Zelldepletion der ICL.....	29
3.5 Aufreinigung von Dendritischen Zellen.....	29
3.5.1 Magnetische Aufreinigung (MACS).....	29
3.5.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung (FACS-sort).....	30
3.6 Antigenpräparationen.....	31
3.6.1 <i>T. gondii</i> -Lysat (TL).....	31
3.6.2 <i>T. gondii</i> -konditioniertes Medium (TgKM).....	31
3.6.3 Immunpräzipitation biotinylierter Zelloberflächenproteine.....	31
3.7 Antigennachweise.....	32
3.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	32
3.7.2 Coomassie-Färbung.....	34
3.7.3 Western Blot.....	34
3.7.4 Durchflusszytometrie (FACS).....	35
3.8 Nachweis intrazellulärer Toxoplasmen.....	37
3.8.1 Diff-Quik-Färbung.....	37
3.8.2 Messung der intrazellulären Proliferation.....	37
3.8.3 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	38

3.9	Antigenpräsentationstests.....	39
3.9.1	Stimulationsansatz.....	39
3.9.2	Messung der T-Zellproliferation.....	39
3.9.3	Messung der IFN•-Sekretion (ELISA).....	39
3.10	Statistik.....	40
4	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Export parasitärer Antigene in infizierten Zellen.....	41
4.1.1	Nachweis von GRA7 an der Oberfläche lebendiger Zellen.....	41
4.1.2	Nachweis infizierter Zellen mittels YFP-transfizierter Toxoplasmen.....	45
4.1.3	Infizierte und uninfizierte Zellen tragen GRA7 an ihrer Oberfläche.....	47
4.1.4	Untersuchung von extrazellulär sezerniertem GRA7 und extrazellulären Toxoplasmen als exogene GRA7 Quelle.....	49
4.1.5	Kein Nachweis von Oberflächen-GRA7 durch Biotinylierung der Zellmembranproteine infizierter Kulturen.....	51
4.2	Spontane Präsentation von <i>T. gondii</i> -Antigen durch Dendritische Zellen aus dem Hirn chronisch infizierter Mäuse.....	53
4.2.1	Hirn-DC stimulieren <i>T. gondii</i> -spezifische CD4 ⁺ T-Zellen zur Proliferation und IFN•-Sekretion.....	53
4.2.2	Die spontane Stimulation <i>T. gondii</i> -spezifischer T-Zellen verläuft MHC-restringiert.....	56
4.2.3	Hirn-DC scheinen nicht infiziert zu sein.....	59
4.2.4	Zysten können als Antigenquelle dienen.....	61
5	DISKUSSION.....	64
5.1	GRA7-Export in <i>Toxoplasma</i> -infizierten Fibroblasten.....	64
5.1.1	Exportweg.....	64
5.1.2	Rolle exportierter Antigene als T-Zellantigene.....	69

5.2 Dendritische Zellen als APC im chronisch mit <i>T. gondii</i> infizierten Hirn.....	70
5.2.1 Stimulatorische Aktivität der Hirn-DC für <i>Toxoplasma</i> - spezifische T-Zellen.....	71
5.2.2 <i>Toxoplasma</i> -Antigenquelle für Hirn-DC.....	73
6 LITERATUR.....	75
7 ABKÜRZUNGEN.....	92
8 DANKSAGUNG.....	95
9 CURRICULUM VITAE.....	96
10 ERKLÄRUNG.....	97

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die während der chronischen Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) im Hirn persistierenden enzystierten Parasiten werden durch parasitenspezifische T-Zellen kontrolliert. Welche Antigene und Mechanismen die Reaktivierung der Parasiten durch kontinuierliche Stimulation der T-Zellen verhindern, ist bislang ungeklärt. GRA (*T. gondii* dense granule) Proteine stellen potente Antigene dar, die eine starke Immunantwort während der Infektion mit *T. gondii* induzieren.

Bisherige Befunde lassen auf einen membrangebundenen Export von GRA7 aus der Wirtszelle heraus schließen, wobei die Wirtszellmembran eine mögliche Station des Exportweges darstellt. GRA7, ein Zielantigen der Immunantwort, das in allen infektiösen Stadien von *T. gondii* exprimiert und möglicherweise auf die Wirtszelloberfläche exportiert wird, wäre ein idealer Kandidat durch Stimulation der Immunantwort das Wirt-Parasit-Gleichgewicht während der chronischen Infektion zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit konnte GRA7 an der Oberfläche von Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Bei der genaueren Charakterisierung der GRA7-positiven Zellen zeigten sich infizierte und uninfizierte Zellen GRA7-positiv. Damit wurde die Frage nach einer Anlagerung des GRA7 von außen aufgeworfen. Im Gegensatz zu extrazellulär sezerniertem GRA7 in TgKM (*T. gondii*-konditioniertes Medium) konnte durch Zugabe extrazellulärer Toxoplasmen in hohen Konzentrationen ein GRA7-Signal auf einem geringen Anteil der Fibroblasten gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte somit eine Anlagerung des GRA7 von außen nicht ausgeschlossen werden und ein Export von GRA7 an die Wirtszelloberfläche nicht bewiesen werden.

Dendritische Zellen (DC) spielen eine bedeutende Rolle bei der Initiierung und Regulation der Immunantwort bei der Infektion mit *T. gondii*. Während die Existenz von DC im entzündlich veränderten Hirn als gesichert gilt, ist ihre Rolle bei zellulären Immunreaktionen vor Ort noch unklar. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen erstmals, dass Hirn-DC aus chronisch mit *T. gondii* infizierten Mäusen *ex vivo* ein im Hirn vorhandenes Parasitenantigen präsentieren und damit *T. gondii*-spezifische T-Zellklone MHC-restringiert stimulieren können. Als Parameter für die T-Zellstimulation konnten Proliferation und IFN γ -Sekretion der T-Zellen gemessen werden. Damit ließ sich zeigen, dass Hirn-DC im Mausmodell der Toxoplasmose als APC aktiv sind.

2 EINLEITUNG

2.1 *Toxoplasma gondii*

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) wurde erstmals 1908 aus dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gundi* isoliert und beschrieben (Nicolle & Manceaux, 1908). Der obligat intrazelluläre Parasit gehört zum Stamm *Apicomplexa*, Klasse *Sporozoa* und Unterklasse *Coccidia*, der ebenfalls *Plasmodium* als Erreger der Malaria und *Cryptosporidium* als Erreger der Kryptosporidiose zugeordnet werden. *Toxoplasma* ist weltweit verbreitet und besitzt ein breites Wirtsspektrum, das sämtliche Warmblüter umfasst. Medizinisch bedeutsam ist der Erreger der Toxoplasmose insbesondere bei Immunsupprimierten und Neugeborenen.

2.1.1 Morphologie

Aufgrund der bogenförmigen Gestalt des Tachyzoitenstadiums wurde der Parasit *Toxoplasma* (*toxon*: Bogen; *plasma*: Form in Griechisch) genannt. Es gibt drei infektiöse Stadien des Parasiten: Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoitien. Tachyzoiten (*tachy*: schnell in Griechisch) sind $2 \times 6 \mu\text{m}$ groß. Ihr Name wurde aufgrund ihrer schnellen asexuellen Vermehrung geprägt (Frenkel, 1973). Sie vermehren sich, vor allem während der akuten Infektion innerhalb der parasitophoren Vakuole in der Wirtszelle, bis diese lysiert. Als Bradyzoiten (*brady*: langsam in Griechisch) werden die langsamer wachsenden Parasitenformen bezeichnet (Frenkel, 1973). Sie sind $1,5 \times 7 \mu\text{m}$ groß und vermehren sich ebenfalls asexuell in intrazellulären Gewebezysten. Diese werden im Durchschnitt $50\text{-}70 \mu\text{m}$ groß und enthalten 1000 bis 2000 Bradyzoiten, während die Wirtszelle intakt bleibt (Weiss & Kim, 2000). Zysten entwickeln sich vorzugsweise im Skelettmuskel und im Hirn. Die Sporozoitien sind $2 \times 6\text{-}8 \mu\text{m}$ groß. Sie entwickeln sich nach sexueller Vermehrung durch Sporulation aus Sporozyten, die paarweise in Oozysten vorliegen. Als DNA-haltige Organellen besitzt *Toxoplasma* den Nukleus, der das aus 8×10^7 Basenpaaren bestehende Genom von *T. gondii* enthält, ein Mitochondrium und den Apikoplast, ein plastidähnliches endosymbiontisches Organell (Abb. 1A). Namensgebend für den Stamm *Apicomplexa* ist der Apikalkomplex, der bei der Invasion der Wirtszelle eine Rolle spielt. Zum Apikalcomplex zählen Apikalringe, Polringe, das Conoid und zwei

apikale, sekretorische Organellen: Mikronemen und Rhoptrien (Abb. 1B). Das Conoid besteht aus einer gegen den Uhrzeigersinn gedrehten Spirale aus 14 Fasern, in denen Tubulin im Gegensatz zu typischen Mikrotubuli in Form eines Kommas aus 9 Protofilamenten arrangiert ist (Hu *et al.*, 2002). Bei der Invasion wird das Conoid aus den Apikalringen hervorgestreckt und wieder in diese zurückgezogen (Übersicht in: Black & Boothroyd, 2000; Morrissette & Sibley, 2002).

Darüber hinaus besitzt *Toxoplasma* noch ein weiteres sekretorisches Organell: die ‚dense granules‘, elektronendichte Granula, die über den Parasit verteilt sind. Während *Toxoplasma* in die Wirtszelle eindringt, werden Rhoptrien, Mikronemen und ‚dense granules‘ sequentiell durch Exozytose entleert (Ngô *et al.*, 2000).

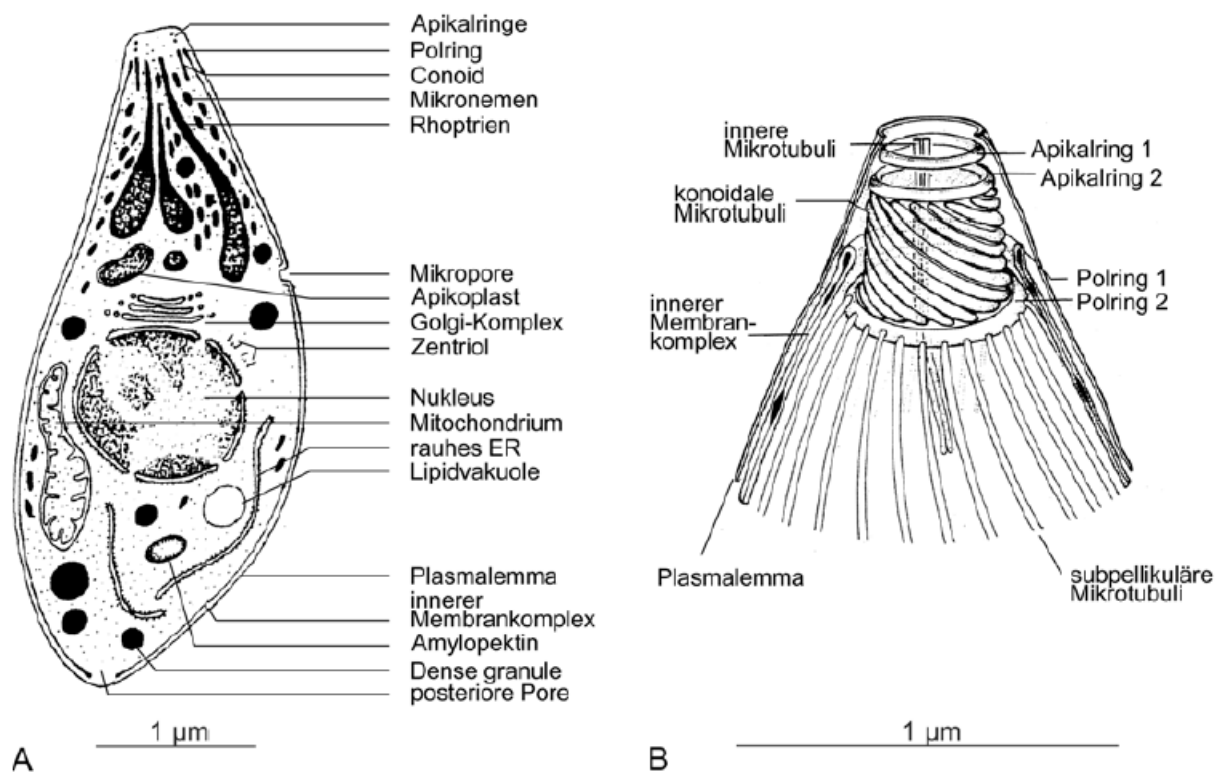


Abb. 1 Ultrastruktur eines *T. gondii* Tachyzoiten (aus Dubey *et al.*, 1998)

A. Schema einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Tachyzoiten

B. Aufbau des Apikalkomplexes

Mikroskopisch ähneln sich die drei infektiösen Stadien von *T. gondii*, es gibt jedoch ultrastrukturelle Unterschiede. So besitzen Tachyzoiten weniger Mikronemen als Sporozoiten und Bradyzoiten. Tachyzoiten und Sporozoiten haben mehr ‚dense granules‘ als Bradyzoiten. Bradyzoiten haben einen posterior lokalisierten Nukleus jedoch keine Lipidvakuolen im Vergleich zu zahlreichen in Sporozoiten und einigen in Tachyzoiten. Bradyzoiten und Sporozoiten besitzen zahlreiche und große Amylopektingranula (Dubey *et al.*, 1998). Bradyzoiten sind widerstandsfähiger gegenüber 0,7%iger Salzsäure als Tachyzoiten. Sie können 1 bis 2 Stunden darin überleben, während Tachyzoiten nach 10 Minuten absterben (Jacobs *et al.*, 1960). Die *T. gondii*-Stadien unterscheiden sich auch in der Expression einiger Antigene. Zum Beispiel finden sich die Oberflächenantigene ‚surface antigen‘ (SAG)1 und SAG3 nur in Tachyzoiten, während SAG4, BSR4/p36 und das Zytosolprotein BAG1 bradyzoitenspezifische Antigene sind (Gross *et al.*, 2004). Die Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Enolase (ENO) existieren in zwei Isoformen, welche stadienspezifisch exprimiert werden: LDH1 und ENO2 kommen in Tachyzoiten vor, während LDH2 und ENO1 in Bradyzoiten exprimiert werden (Yang & Parmley, 1997; Dzierszinski *et al.*, 1999).

2.1.2 Lebenszyklus

Der dreiphasige Entwicklungszyklus von *T. gondii* umfasst die sexuelle Vermehrung im Endwirt, die externe Sporulation der Oozyste und die asexuelle Vermehrung im Zwischenwirt (Abb. 2). Als Endwirt dienen Katzenartige (*Felidae*). Der Mensch und andere Warmblüter werden von *T. gondii* als Zwischenwirte infiziert. Die Infektion erfolgt in der Regel oral über die Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch oder Oozysten z. B. durch fäkal kontaminiertes Wasser. Während der Schwangerschaft kann bei einer Primoinfektion zusätzlich eine diaplazentare Übertragung von der Mutter auf den Fötus stattfinden.

Im Darmepithel des Endwirtes entwickeln sich zunächst fünf ungeschlechtliche Stadien A-E (Sporogonie), bevor während der Gametogonie die sexuellen Stadien von *Toxoplasma* entstehen (Dubey & Frenkel, 1972). Mikro- und Makrogameten verschmelzen zu diploiden Zygoten. Aus den Zygoten entwickeln sich durch Bildung einer Zystenwand Oozysten, die durch Ruptur der infizierten Epithelzellen im Darmlumen frei werden und mit dem Kot ausgeschieden werden. Das geschieht ab dem 3.-14. Tag nach Infektion für die Dauer von etwa 2 Wochen. Im Freien

entwickeln sich in den Oozysten nach 1-5 Tagen jeweils zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten. Durch die Sporulation werden die Oozysten infektiös.

Eine asexuelle extraintestinale Vermehrung findet im Zwischen- und Endwirt statt. Dabei vermehren sich die Parasiten durch Endodyogenie. Es werden zwei Wachstumsphasen während dieses Zyklus unterschieden, abhängig davon ob eine akute oder eine chronische Infektion vorliegt. Noch im Darmepithel findet eine Konversion ins Tachyzoitenstadium statt. Die schnell proliferierenden Tachyzoiten gelangen vom Darm über Blut und Lymphe zu anderen Geweben des Wirtsorganismus. Dort vermehren sie sich durch Infektion von kernhaltigen Wirtszellen. Unter dem zunehmenden Druck der einsetzenden Immunantwort konvertieren die Tachyzoiten in sich langsam vermehrende Bradyzoiten, die in intrazellulären Gewebezysten vorliegen. Während dieser chronischen Phase der Infektion kommt es zur Bildung von Zysten vor allem im Hirn und Muskel, wo *T. gondii* lebenslang im Wirt persistiert. Leber, Niere und Lungen können ebenfalls besiedelt werden (Dubey *et al.*, 1998).

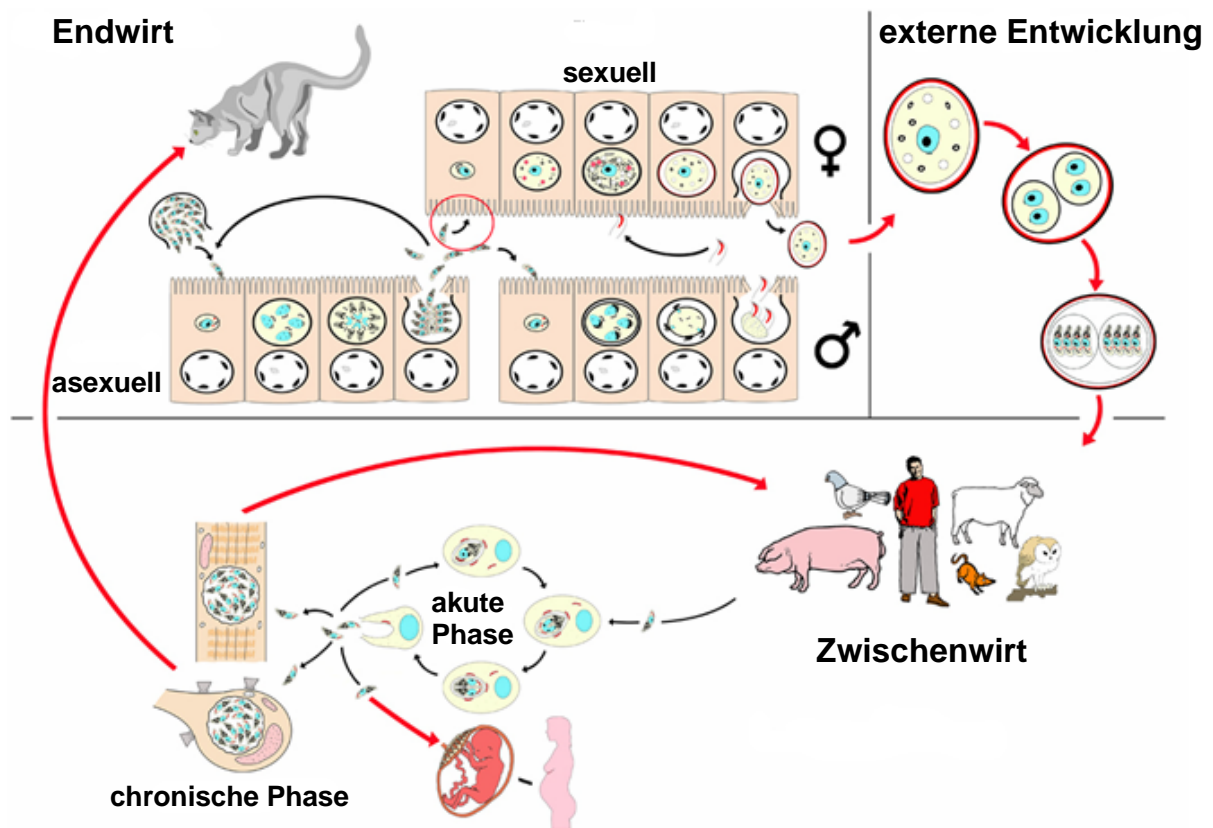


Abb. 2 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

T. gondii vermehrt sich in seinem Endwirt, der Katze, geschlechtlich. Dann folgt die Sporulation der mit den Faeces ausgeschiedenen Oozysten. Die Infektion der Zwischenwirte erfolgt über die orale Aufnahme der sporulierten Oozysten. Im Zwischenwirt bilden sich Gewebezysten, über deren Aufnahme sich End- und Zwischenwirt ebenfalls infizieren können (aus Coppin *et al.*, 2003).

2.2 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii ist einer der weltweit am weitesten verbreiteten Parasiten. Die Durchseuchung der Bevölkerung schwankt regional. In Kontinentaleuropa wurden Seroprävalenzraten von 50-80%, in den USA und Großbritannien von 16-40% gefunden (Dubey, 1998). Deutschlandweit ließen sich Antikörper gegen *Toxoplasma* bei 60% der Erwachsenen nachweisen (Lucius & Loos-Frank, 1997). Die Prävalenz steigt pro Lebensjahr um etwa 1%.

In der Regel verläuft eine Infektion mit *T. gondii* symptomlos und dadurch unbemerkt. Nach einer Inkubationszeit von 1-3 Wochen können unspezifische Symptome wie Kopfschmerz, Fieber und Mattigkeit auftreten. Es kann zur Schwellung von zervikalen Lymphknoten kommen. Lebensbedrohlich wird eine Infektion, wenn das

Immunsystem noch nicht ausgereift oder geschwächt ist. Deshalb hat *T. gondii* vor allem während der Schwangerschaft und beim immunkompromittierten Patienten im Rahmen von AIDS oder einer Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten eine Bedeutung als Krankheitserreger.

Während der Schwangerschaft kann nur die erstmalige Infektion mit *Toxoplasma* zum Abort oder Schädigungen des Kindes führen. Das Risiko einer Übertragung der Infektion von der Mutter auf das Ungeborene nimmt mit Dauer der Schwangerschaft zu. Das Ausmaß der Schädigung verhält sich dazu gegenläufig. Vor der 20. Schwangerschaftswoche kann eine transplazentare Infektion zum Abort wie auch zu schwerwiegenden kindlichen Fehlbildungen führen. Infektionen zu späteren Zeitpunkten verlaufen etwas milder. Die Gefahr bleibender Schäden ist im 1. Trimenon am größten. Zu den Fetopathien der konnatalen Toxoplasmose zählen Enzephalitis mit der Trias: Chorioretinitis, Hydrozephalus internus und periventrikuläre Verkalkungen. Bei generalisierter Infektion kommt es zu Hepatosplenomegalie, Ikterus, Myokarditis und Pneumonie. Bei den meisten Neugeborenen manifestiert sich die Infektion erst nach der Geburt (Übersicht in: Remington *et al.*, 2001).

Immunkompromittierte Patienten sind durch eine Neuinfektion aber auch durch Reaktivierung einer chronisch-inapparenten Infektion gefährdet. Die Toxoplasmose ist eine der bedeutendsten AIDS-definierenden opportunistischen Infektionen. Das klinische Bild ist durch Enzephalitis in allen Ausprägungen, Pneumonie, Myokarditis und seltener durch eine disseminierte Infektion geprägt. Organtransplantierte Patienten sind in dreifacher Weise gefährdet schwerwiegend an Toxoplasmose zu erkranken: Infektion über das Organ, Neuinfektion oder Reaktivierung einer chronischen Infektion aufgrund der immunsupprimierenden Medikation. Das trifft ebenfalls für Empfänger von allogenen Stammzellen oder Knochenmark zu (Übersicht in: Barsoum, 2004). Eine Rolle von *T. gondii* bei der Entstehung der Schizophrenie wird diskutiert (Übersicht in: Torrey & Yolken, 2003).

2.2.1 Diagnostik und Therapie

Toxoplasmose wird aus der Zusammenschau von klinischer Symptomatik, laborchemischen Untersuchungen, radiologischer Bildgebung und Therapieerfolg diagnostiziert. Die Labordiagnostik stützt sich hauptsächlich auf den Nachweis von *Toxoplasma*-spezifischen Antikörpern. Dazu stehen der Sabin-Feldman-Test (Sabin

& Feldman, 1948), der in der Laborroutine jedoch heute keine Rolle mehr spielt, die indirekte Immunfluoreszenz, die Komplementbindungsreaktion, Enzymimmunoassays, der Agglutinationstest, verschiedene Varianten des ELISA und der Aviditätstest zur Verfügung (Übersicht in: Lappalainen & Hedman, 2004). Ferner wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgreich zum Nachweis von *T. gondii*-DNA in Patientenmaterial eingesetzt, insbesondere in Kammerwasser bei der Diagnostik der okularen Toxoplasmose und in Fruchtwasser bei der intrauterinen *T. gondii*-Infektion. Seltener wird die Erregerisolation aus Liquor, Blut, Fruchtwasser oder Biopsien durch Zellkultur oder im Tierversuch notwendig, die nur in Referenzlaboratorien durchgeführt wird (Übersicht in: Montoya, 2002).

Indikationen zur antibiotischen Behandlung sind symptomatische Infektionen, Erstinfektionen während der Schwangerschaft, konnatale Toxoplasmosen und Infektionen immunsupprimierter Patienten. Mittel der 1. Wahl ist eine kombinierte Therapie mit Pyrimethamin und einem Sulfonamid (z. B. Sulfadiazin) unter Gabe von Folsäure. Im ersten Trimenon ist diese Therapie kontraindiziert. In diesen Fällen eignet sich Spiramycin. Bei Immunsupprimierten mit positiver Serologie und niedrigen T-Helferzellen oder bereits überstandener Infektion hat sich eine prophylaktische Gabe von Cotrimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol) bzw. Medikamenten der vorausgegangenen Therapie bewährt (Übersicht in: Joynton & Wreghitt, 2001). Atovaquon wird in den letzten Jahren erfolgreich zur Therapie der *Toxoplasma*-Enzephalitis eingesetzt (Simon & Stille, 2000). In der Therapie von Schwangeren und Neugeborenen mit konnataler Toxoplasmose wurde es noch nicht erprobt aber erscheint vielversprechend (Übersicht in: Petersen, 2007).

Es existiert bisher keine Impfung für den Menschen, die vor Toxoplasmose schützt. Hygienische Maßnahmen wie ausreichendes Erhitzen von Fleisch oder beim Kontakt insbesondere von Schwangeren mit Katzen sind nach wie vor unverzichtbar. Außerdem sind serologische Kontrollen der Risikogruppen wie Schwangere und Immunsupprimierte sinnvoll. Bisher gibt es bei Schwangeren kein vorgeschriebenes Screening für Toxoplasmose.

2.3 Infektion von Wirtszellen und intrazelluläre Entwicklung

2.3.1 Invasion

Ein entscheidender Prozess im Lebenszyklus eines intrazellulären Parasiten ist die Infektion der Wirtszelle. *T. gondii* dringt aktiv in die Wirtszelle ein, wobei sich der Invasionsprozess in drei Phasen gliedern lässt: die Anheftung an die Wirtszelle, die Induktion der parasitophoren Vakuole (PV) sowie die Translokation des Parasiten in die Vakuole (Morrissette & Sibley, 2002). Am primären Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle sind Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine der *T. gondii* - ‚surface antigen‘ (SAG)-Familie 1 und 2 beteiligt. Die Expression verschiedener SAGs könnte für das breite Wirtsspektrum von *T. gondii* verantwortlich sein (Lekutis *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind SAGs wichtige Zielantigene des Immunsystems. Es wird vermutet, dass ihre stadienspezifische Expression und die damit einhergehende variierende Antigenkomposition von *T. gondii* ein immunevasiver Mechanismus ist, der eine optimale Parasitenpersistenz im Zwischenwirt erleichtert (Kim & Boothroyd, 2005).

Hat der Parasit apikal Kontakt zur Wirtszelle bekommen, werden zuerst die Mikronemen sezerniert. Die darin enthaltenen Proteine, die als MIC bezeichnet werden, sind Adhäsine. Sie ermöglichen die Anheftung des Parasiten an die Wirtszelle. Während der Parasit in die Wirtszelle eindringt, folgt die Ausschüttung der Rhoptrien in die entstehende Vakuole. Die Rhoptrienproteine (ROP) erleichtern die Penetration der Wirtszelle und sind wahrscheinlich an der Bildung der PV beteiligt. Sie werden sezerniert bis der Parasit nach 30-40 s vollständig in die Wirtszelle eingedrungen ist.

Erst wenn die Invasion abgeschlossen ist, also die PV mit dem darin enthaltenen *Toxoplasma* vollständig von der Wirtszellplasmamembran getrennt ist, setzt die Sekretion der ‚dense granules‘ am apikalen Pol ein. Sie erreicht 20 min später ihr Maximum, was auf eine regulierte Freisetzung hinweist (Carruthers & Sibley, 1997). Im Unterschied zu den anderen Organellen werden die ‚dense granules‘ kontinuierlich während der intrazellulären Persistenz des Parasiten ausgeschüttet (Dubremetz *et al.*, 1998). Diese Sekretion erfolgt Calcium-unabhängig (Chaturvedi *et al.*, 1999) und kann durch parasitäre GTP-bindende Proteine wie den ADP-Ribosylierungs-Faktor 1 gesteigert werden (Liendo *et al.*, 2001).

Die Proteine der ‚dense granules‘ werden als GRA-Proteine bezeichnet und tragen zu strukturellen Modifikationen der PV bei. Dazu sezernieren die Toxoplasmen an der posterioren Pore Membranen in Form von Tubuli und multi-lamellösen Vesikeln in die PV. Aus diesen bildet sich ein tubulomembranöses Netzwerk, das die Parasitenmembran mit der Vakuolenmembran (PVM) verbindet (Sibley *et al.*, 1995). Die sezernierten GRA-Proteine assoziieren mit diesem Netzwerk und/oder der PVM. Die von Bradyzoiten sezernierten GRA-Proteine GRA1, 2, 3, 5, 6 und 7 sind mit der Zystenwand und/oder der Zystenmatrix assoziiert (Torpier *et al.*, 1993; Mercier *et al.*, 2005).

2.3.2 GRA-Proteine

Es wurden bisher 15 GRA-Proteine auf DNA-Ebene beschrieben (Übersicht in: Nam, 2009; Mercier *et al.*, 2005). Außerdem wurden zwei Isoformen der Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase-I und NTPase-II) (Asai *et al.*, 1983), zwei Serinprotease-Inhibitoren (TgPIs) (Pszenny *et al.*, 2000, 2002; Morris *et al.*, 2002; Morris & Carruthers, 2003), Cyclophilin18 (High *et al.*, 1994) und ein Osteopontin-ähnliches Protein (Cortez *et al.*, 2008) als ‚dense granule‘ Proteine identifiziert. Des Weiteren wurde eine saure Phosphatase, die in ‚dense granules‘ und Rhoptrien vorkommt, beschrieben (Metsis *et al.*, 1995). Die genaue Funktion der GRA-Proteine ist bis auf die Enzymaktivitäten der NTPasen, der TgPIs und der Phosphatase und die Cyclosporinbindung des Cyclophilins weiterhin unklar. Kürzlich wurde beschrieben, dass GRA1 die Apoptose von Monozyten stimulieren kann (D’ Angelillo *et al.*, 2011). GRA15, das neueste Mitglied in der GRA-Familie, aktiviert den Transkriptionsfaktor NF•B in Lymphozyten, der die Transkription von für die Immunantwort gegen *T. gondii* relevanten Genen initiiert (Rosowski *et al.*, 2011). GRA-Proteine besitzen kaum Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen, die Hinweise auf eine Funktion liefern.

Innerhalb der ‚dense granules‘ liegen GRA3, 4, 5 und 6 löslich, GRA7 membrangebunden und GRA9 in beiden Formen vor. Nach Sekretion in die PV sind die GRA-Proteine entweder ausschließlich membrangebunden (GRA5, 6, 7), komplett löslich (TgPIs) oder bleiben anteilig in Lösung (GRA1, 2, 4, 9, NTPasen).

Innerhalb der Vakuole sind die GRA-Proteine auch unterschiedlich lokalisiert. GRA1 ist ein Calcium-bindendes Protein mit instabiler Assoziation zum Netzwerk der PV,

das in der Vakuole größtenteils löslich bleibt (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989, Sibley *et al.*, 1995). GRA2 (Mercier *et al.*, 1993), GRA4 (Mévelec *et al.*, 1992) und GRA6 (Lecordier *et al.*, 1995) bilden einen Komplex im tubulären Netzwerk der PV, der an Nährstoff- oder Proteintransporten zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt sein könnte (Labruyere *et al.*, 1999). Dabei ist GRA2 über zwei amphipathische Alpha-Helices stabil in die Netzwerkmembran eingebunden (Mercier *et al.*, 1998), während GRA4 über starke Protein-Proteininteraktionen und GRA6 über hydrophobe Interaktionen mit der Netzwerkmembran assoziieren (Labruyere *et al.*, 1999). GRA9 ist ebenfalls mit dem tubulären Netzwerk assoziiert, möglicherweise über seine amphipathische Alpha-Helix (Adjogble *et al.*, 2004). Das in jüngster Zeit identifizierte GRA12 findet sich ebenfalls nach der Sekretion im tubulären Netzwerk (Michelin *et al.*, 2009).

Mit dem tubulovesikulären Netzwerk und der PVM sowie deren Ausläufern ins Wirtszellzytoplasma sind GRA3, GRA7 und GRA14 assoziiert. Während man lange davon ausging, dass GRA3 in oligomerer Form durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der PVM interagiert (Dubremetz *et al.*, 1993, Ossorio *et al.*, 1994), konnte, basierend auf einer korrigierten Sequenz, eine Transmembrandomäne für das korrekte GRA3 nachgewiesen werden (Henriquez *et al.*, 2005). Das kürzlich identifizierte GRA14 zeigt eine unerwartete Topologie in der PVM, da es anders als GRA5 mit seinem C-Terminus ins Wirtszellzytoplasma und mit seinem N-Terminus ins Vakuolenlumen ausgerichtet ist (Rome *et al.*, 2008). Es konnten GRA14-positive PVM-Ausläufer, die Nachbarvakuolen verbinden, identifiziert werden.

Ausschließlich mit der PVM assoziiert sind das Osteopontin-ähnliche Protein (Cortez *et al.*, 2008), GRA5 (Lecordier *et al.*, 1993), GRA8 (Carey *et al.*, 2000) und GRA10 (Ahn *et al.*, 2005). GRA5 besitzt eine putative Transmembrandomäne und ist als Transmembranprotein so in die PVM eingebunden, dass es mit seinem N-Terminus ins Zytoplasma und seinem C-Terminus ins Vakuolenlumen reicht (Lecordier *et al.*, 1999). GRA8 ist prolinreich und postsekretorisch an der PVM und in der Peripherie der Vakuole lokalisiert (Carey *et al.*, 2000). GRA10 besitzt zwei Transmembrandomänen (Ahn *et al.*, 2005).

2.3.3 GRA7

GRA7 hat ein Molekulargewicht von 29 kDa und weist zwei hydrophobe Domänen auf (Fischer *et al.*, 1998). Die N-terminale Domäne (AS 5-24) ist Teil einer putativen Signalsequenz (AS 1-26). Die zweite hydrophobe Domäne (AS 181-202) ist die putative Transmembrandomäne (Stachelhaus, 2001). Biochemisch konnte gezeigt werden (Neudeck *et al.*, 2002), dass GRA7 ein integrales Membranprotein ist, das sowohl in isolierten Toxoplasmen als auch in infizierten Wirtszellen kontinuierlich membranassoziiert ist. GRA7 konnte in allen infektiösen Formen von *T. gondii* nachgewiesen werden (Ferguson *et al.*, 1999). Des Weiteren lässt die verringerte Synthese von GRA7 bei attenuierten Toxoplasmen eine Virulenz-Assoziation vermuten (Nischik *et al.*, 2001).

Mittels Immunelektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass GRA7 in mit Tachyzoiten infizierten Wirtszellen mit den ‚dense granules‘ der intrazellulären Parasiten, der PVM und dem tubulomembranösen Netzwerk assoziiert (Fischer *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde GRA7 an filamentösen, von der PV ins Wirtszellzytoplasma ziehenden Strukturen nachgewiesen (Jacobs *et al.*, 1998) sowie auf der Wirtszellmembran (Bonhomme *et al.*, 1998). Weiterhin wurde in zystenhaltigen Wirtszellen eine GRA7-spezifische Markierung der Zystenwand und filamentöser Strukturen im Zytoplasma der Wirtszelle gefunden (Fischer *et al.*, 1998). Im Überstand infizierter Hirnzellen wurde GRA7 mittels ELISA detektiert, während andere *T. gondii* Antigene darin nicht nachweisbar waren (Fischer *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Befunde wurde ein membrangebundener Export von GRA7 postuliert.

2.4 Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii*

Eine Infektion mit *T. gondii* löst eine rasche, aufeinander abgestimmte Antwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems aus. Sofortreaktionen des angeborenen Immunsystems, wie die frühe Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren, sind die ersten Abwehrmaßnahmen während der akuten Phase der Infektion. Gleichzeitig wird die spezifische Antwort des adaptiven Immunsystems aufgebaut, die einen dauerhaften Schutz liefert (Übersicht in: Lieberman & Hunter, 2002).

2.4.1 Zellvermittelte Immunantwort

Die protektive Immunantwort gegen *T. gondii* ist vor allem zellvermittelt (Übersicht in: Yap & Sher, 1999), während antikörperabhängige Mechanismen eine untergeordnete Rolle spielen. In der Frühphase der Infektion wird nach Kontakt mit *Toxoplasma* von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen (Gazzinelli *et al.*, 1994), Dendritischen Zellen (DC) (Reis e Sousa *et al.*, 1997) und neutrophilen Granulozyten (Bliss *et al.*, 1999) IL12 produziert. Als Schlüsselzytokin der zellulären Immunantwort stimuliert IL12 die Produktion von IFN \bullet in NK-Zellen und vermittelt damit die angeborene Resistenz gegen den Parasiten (Gazzinelli *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1994). IL12-defiziente Mäuse besitzen keinen Schutz vor einer Infektion mit *T. gondii* (Scharton-Kersten *et al.*, 1997; Yap *et al.*, 2000). Darüber hinaus induziert IL12 die Entwicklung einer adaptiven Typ1-Antwort (Heufler *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 2000), die von CD4⁺ T-Helferzellen vom Typ1 (T_H1) getragen wird. Das von ihnen produzierte IL-2 unterstützt die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen (Übersicht in: Filisetti & Candolfi, 2004; Gazzinelli *et al.*, 1992).

Ähnlich wie NK-Zellen vermitteln auch T-Lymphozyten ihre protektive Aktivität über IFN \bullet , den zentralen Mediator der Resistenz gegen *T. gondii*. Dagegen spielt die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen eine untergeordnete Rolle. Perforindefiziente Mäuse zeigen keine verminderte Resistenz während der akuten Infektion (Denkers *et al.*, 1997), während IFN \bullet -defiziente Mäuse keinen Schutz gegen *Toxoplasma* aufbauen (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). In chronisch infizierten Tieren wird durch Gabe von anti-IFN \bullet -Antikörpern eine Reaktivierung der Infektion ausgelöst, die zum Tod der Tiere führt (Suzuki *et al.*, 1988).

IFN• induziert verschiedene antiparasitäre Effektormechanismen. Dazu zählt in der Maus die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Ding *et al.*, 1988), das die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* hemmt. Daneben sind weitere IFN•-induzierte Abwehrmechanismen wirksam, da iNOS-defiziente Tiere die akute Phase der Infektion überleben und erst während der chronischen Infektion sterben (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). So wurde kürzlich eine Familie IFN•-induzierter 47 kDa GTPasen identifiziert, die an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt sind (Übersicht in: Taylor *et al.*, 2004). Eine antiparasitäre Aktivität gegen *T. gondii* wurde für drei der Mitglieder, IGTP, LRG-47 und IRG-47, gezeigt. IGTP- und LRG-47-defiziente Mäuse sterben schnell während der akuten *Toxoplasma*-Infektion mit ähnlicher Kinetik wie IFN•-defiziente Mäuse, während bei IRG-47-defizienten Mäusen erst die chronische Infektion zum Tode führt (Taylor *et al.*, 2000; Collazo *et al.*, 2001). Die Mechanismen, die der antitoxoplasmatischen Aktivität dieser Proteine unterliegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich führt die Assoziation der p47 GTPasen an die PV in IFN•-stimulierten Zellen zur Zerstörung der Vakuole und letztens des Parasiten (Martens *et al.*, 2005). Beim Mensch ist ein anderer Effektormechanismus entscheidend für die Kontrolle von *T. gondii*. In verschiedenen Zellen wird durch IFN• die Expression des Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert, welches Tryptophan abbaut. Die Reduktion der intrazellulären Tryptophankonzentration führt zur Kontrolle des Parasitenwachstums (Pfefferkorn, 1984).

Im Hirn spielen ebenfalls zellvermittelte Immunmechanismen eine Hauptrolle bei der Abwehr von *T. gondii* (Übersicht in: Suzuki, 2002). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen infiltrieren das Gehirn während einer *Toxoplasma*-Infektion (Schlüter *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1997). Die Depletion dieser Zellen in chronisch infizierten Mäusen führt zu einer tödlich verlaufenden Reaktivierung der Infektion im Hirn (Gazzinelli *et al.*, 1992). Dieser Befund zeigt die Wichtigkeit der T-Zellabwehr auch im latent infizierten Wirt sowie die Notwendigkeit, T-Lymphozyten im Hirn zu aktivieren. Noch ist unklar, welche Antigen-präsentierenden Zellen (APC) dies leisten. Neben den bislang im Hirn beschriebenen APC: Mikroglia, perivaskuläre Makrophagen und Astrozyten, (Aloisi *et al.*, 2000) können Dendritische Zellen (DC) im Hirn diese Funktion übernehmen. Während DC im normalen Hirn nicht vorkommen, sind sie im *Toxoplasma*-infizierten Hirn nachweisbar (Fischer *et al.*, 2000). Sie sezernieren zudem IL12 (Fischer *et al.*, 2000), das eine zentrale Rolle bei der Typ1-Antwort spielt und die Aufrechterhaltung der T-Zell-vermittelten IFN•-Produktion während der

chronischen Infektion fördert (Yap *et al.*, 2000). Damit könnten Hirn-DC eine wichtige Funktion für eine protektive T-Zellantwort im Hirn spielen. Eine Funktion der Hirn-DC als APC im inflammatorischen Hirn während einer *T. gondii* Infektion wurde bisher nicht nachgewiesen.

2.4.2 Funktion von Dendritischen Zellen bei der Toxoplasmenabwehr

Dendritische Zellen (DC) wurden erstmals 1973 in der Milz von Mäusen entdeckt (Steinman & Cohn, 1973). Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer verzweigten, zytoplasmatischen Fortsätze (*dendros*: Baum in Griechisch). DC sind Zellen, die antigenspezifische Immunantworten initiieren und prägen. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei Abwehrreaktionen gegen Fremdartigen sowie bei der Erzeugung von Toleranz und eines immunologischen Gedächtnisses (Banchereau & Steinman, 1998).

DC entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Es existieren mehrere DC-Subtypen (lymphoide, myeloide und plasmazytoide DC), die sich phänotypisch und funktionell unterscheiden. In der Maus exprimieren alle DC-Subpopulationen den Oberflächenmarker CD11c. Zur Differenzierung der Subpopulationen dient CD11b, das nur auf myeloiden DC exprimiert wird, CD8 α , das von lymphoiden und plasmazytoiden DC gebildet wird, sowie das mPDCA-1 Antigen, das ausschließlich auf plasmazytoiden DC vorkommt (Shortman & Liu, 2002; Colonna *et al.*, 2004). Plasmazytoide DC zeichnen sich durch die Produktion von IFN α aus (Colonna *et al.*, 2004). Lymphoide DC induzieren hauptsächlich die Bildung von T_H1-Zytokinen wie IFN γ und IL2. Myeloide DC induzieren die Synthese großer Mengen von T_H2-Zytokinen wie IL4 und IL10 zusätzlich zu IFN α und IL2 (Pulendran *et al.*, 1999). Die Entwicklung der lymphoiden DC erfolgt unabhängig von Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) unter dem Einfluss von IL3 (Saunders *et al.*, 1996). Myeloide DC entwickeln sich *in vitro* unter GM-CSF Zugabe aus Knochenmarkzellen oder Blutmonozyten (Inaba *et al.*, 1992). Flt3-Ligand (Flt3L) ist neben GM-CSF das Hauptzytokin für die Entwicklung von plasmazytoiden DC (Gilliet *et al.*, 2002).

DC haben eine Wächterfunktion und können als Infektionssensoren betrachtet werden. Sie wandern als unreife DC vom Knochenmark in periphere Gewebe ein, um dort während einer Infektion Fremdartigene aufzunehmen. Sie zeichnen sich durch

eine hohe phagozytische, aber nur eine geringe T-Zell-stimulatorische Aktivität aus. Über Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose sind sie in der Lage picobis nanomolare Konzentrationen von Antigenen zu prozessieren. Andere APC benötigen größere Mengen (Sallusto *et al.*, 1995). Sie sind durch eine geringe Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen charakterisiert (Banchereau & Steinman, 1998).

Beim Kontakt mit Pathogenen wird eine Reifung der DC induziert. Dazu tragen vor allem mikrobielle Stimuli (Übersicht in: Rescigno *et al.*, 1999) wie Lipopolysaccharid (LPS), Lipoproteine, bakterielle DNA oder virale Nukleinsäuren bei, die über ‚Toll-like‘ Rezeptoren (TLR) erkannt werden (Poltorak *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000; Alexopoulou *et al.*, 2001). Auch inflammatorische Zytokine wie IL1, GM-CSF und TNF• sowie der Kontakt mit aktivierten T-Zellen über die CD40-CD40 Ligand (CD145) Interaktion stimulieren unreife DC (Reis e Sousa *et al.*, 1999). IL10 dagegen blockiert die DC-Reifung (Buelens *et al.*, 1997). Während der DC-Reifung nimmt die Fähigkeit zur Antigenaufnahme ab und die Ausbildung dendritischer Fortsätze zu (Banchereau *et al.*, 2000). Gleichzeitig erwerben reife DC T-Zell-stimulatorische Aktivität. Sie zeigen auf ihrer Oberfläche eine hohe Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86. Darüber hinaus werden sie durch die Expression von Chemokinrezeptor (CCR) 7 zu den Lymphknoten dirigiert. In den Lymphknoten treffen reife DC auf T-Lymphozyten, denen sie das zuvor aufgenommene und prozessierte Antigen präsentieren. Dadurch wird eine pathogen-spezifische adaptive Immunantwort induziert.

Bei der Immunabwehr gegen *T. gondii* können DC als die wichtigsten IL12-Produzenten *in vivo* betrachtet werden: Wenige Stunden nach intravenöser Injektion von *Toxoplasma*-Lysat nimmt die Zahl IL12-produzierender DC in der Milz zu. Gleichzeitig wandern diese DC in die T-Zell-Gebiete der Milz ein (Reis e Sousa *et al.*, 1997). Durch selektive Depletion von DC vor einer Infektion mit *T. gondii*, wird die Produktion von IL12 komplett unterbunden, und die behandelten Tiere sterben wenige Tage später (Liu *et al.*, 2006). Bislang wurden zwei *Toxoplasma*-Proteine identifiziert, welche die IL12-Produktion induzieren. Zum einen stimuliert parasitäres Cyclophilin18, als Zytokin-Mimikry, über den Chemokinrezeptor CCR5 die Synthese von IL12 (Aliberti *et al.*, 2000; Aliberti *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird die IL12-Produktion der DC durch *Toxoplasma*-Profilin über TLR11 induziert (Yarovinsky *et al.*, 2005). Für diesen Signalweg ist das Adaptormolekül ‚myeloid differentiation

factor 88' (MyD88) notwendig. MyD88- und TLR11-defiziente Mäuse sind suszeptibel für *Toxoplasma* (Scanga *et al.*, 2002; Yarovinsky *et al.*, 2005).

DC lassen sich in vielen peripheren Geweben wie Haut, Schleimhaut, Lymphknoten und Organen wie Leber, Niere, Herz und Pankreas lokalisieren (Streptoe & Thomson *et al.*, 1999). Eine Ausnahme bildet das normale zentrale Nervensystem (ZNS). Dort kommen DC nicht vor, was vermutlich zum immunpriviligierten Status des ZNS beiträgt. Dagegen wurden im enzephalitischen Hirn DC nachgewiesen: so bei autoimmuner Enzephalitis (Suter *et al.*, 2000; Serafini *et al.*, 2000; Plumb *et al.*, 2003), im ischämisch geschädigten Hirn (Kostulas *et al.*, 2002; Reichmann *et al.*, 2002) sowie bei infektiöser Enzephalitis durch *T. gondii* (Fischer *et al.*, 2000).

Im Hirn wurden bisher nur phänotypisch dem myeloiden DC-Subtyp entsprechende Zellen nachgewiesen. Diese unterscheiden sich morphologisch und funktionell von der normalen intrazerebralen Makrophagen/Mikroglia-Population (Fischer & Reichmann, 2001). So produzieren Hirn-DC deutlich mehr IL12 und weniger TNF• und NO als die lokale Makrophagen/Mikroglia Population. IL10 und IL1• werden von beiden Zelltypen in vergleichbaren Mengen produziert. Darüber hinaus können Hirn-DC naive, allogene T-Zellen besser zur Proliferation stimulieren als Mikroglia/Makrophagen (Fischer & Reichmann, 2001). Welche Funktion die Hirn-DC im inflammatorischen Hirn während einer *Toxoplasma*-Infektion haben, wurde bislang nicht untersucht.

2.5 Fragestellung der Arbeit

Das *Toxoplasma*-Protein GRA7 ist in den parasitären ‚dense granules‘ lokalisiert und nach Sekretion in die PV an den membranösen Tubuli sowie der Vakuolenmembran nachweisbar. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Assoziation von GRA7 mit filamentösen Strukturen im Wirtszellzytoplasma sowie der Wirtszellmembran. Des Weiteren fand sich GRA7 im Überstand zystentragender Wirtszellen. Diese Ergebnisse deuten auf einen Transport von GRA7 von der parasitophoren Vakuole durchs Zytoplasma der Wirtszelle hin. Ein solcher Protein-Export ist für *T. gondii* bislang nicht bekannt. Da GRA7 kontinuierlich membranassoziiert vorliegt, ist die Plasmamembran infizierter Zellen eine mögliche Station des GRA7-Exportes. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob GRA7 mit der Membran lebender Wirtszellen assoziiert. Dabei sollte die Lokalisation von GRA7 an der Wirtszelloberfläche mit dem Infektionsstatus der Zellen korreliert und die Herkunft des oberflächenassoziierten GRA7 geklärt werden.

Während die Existenz Dendritischer Zellen im entzündlich veränderten Hirn als gesichert gilt, ist die Rolle, die sie bei zellulären Immunreaktionen vor Ort spielen, ungeklärt. Deshalb sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob DC im *Toxoplasma*-infizierten Hirn als antigenpräsentierende Zellen aktiv sind. Dazu sollte eine spontane Antigenpräsentation akut isolierter Hirn-DC gegenüber parasitspezifischen CD4⁺ T-Zellklone analysiert und die Herkunft des präsentierten Antigens bestimmt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Plastik- und Einwegartikel

Sämtliche Artikel wurden steril von den Firmen bezogen oder bei Bedarf 50 min bei 1 bar autoklaviert.

Bottle Top Filter 0,22 • m	BD Falcon, Heidelberg
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Maidstone, GB
FACS-Röhrchen 75 mm x 12 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Filter Cards	Shandon, Pittsburgh, USA
Glasfaserfilter Preprint Filtermat	LKB Wallac, FIN
Kanülen 18, 20 und 22 gauge	Becton Dickinson, Heidelberg
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten 96 und 96 A/2 well	Costar, Cambridge, USA
Objektträger Cytoträger 76 x 26 x 1 mm	Shandon, Pittsburgh, USA
Objektträger Lab-Tek II	Nalge Nunc, Naperville, USA
Chamber Slide System	
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Siebgewebe aus Polyamid 40 • m	neoLab, Heidelberg
96 well Immunoplate Maxisorp F96	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen 25 und 75 cm ²	Costar, Cambridge, USA
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb 40 und 70 • m	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

3.1.2 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (St. Louis, USA) bzw. Roche (Mannheim) in *pro analysis*

Qualität geliefert. Zur Herstellung von Lösungen wurde hochreines Wasser aus einer Millipore Wasseranlage verwendet, nachfolgend als *aqua* bezeichnet.

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
CD11c (N418) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Chemolumineszenz-Substrat	Pierce, Rockford, USA
SuperSignal West Pico	
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Cytofix	BD PharMingen, Heidelberg
Diff-Quik	Dade Behring, Düdingen, CH
Ficoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fluoromount G	SBA, Birmingham, USA
Low-Tox-M rabbit complement	Cedarlane, Hornby, CDN
Metofane	Janssen-Cilag, Neuss
Milchpulver	Oxoid, Basingstoke, GB
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7,3	Serag Wiessner, Naila
10x PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail Complete	Roche, Mannheim
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptavidin-Peroxidase	BD PharMingen, Heidelberg
Streptavidin-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg
Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar) 200/10 mg pro ml	Roche, Mannheim
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Szintillationsflüssigkeit Betaplate Scint	LKB Wallac, FIN
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	ICN Biomedicals, Eschwege
Trypsin/EDTA 0,05/0,02% (w/v)	Biochrom, Berlin
Vecta Mount	Vector Lab. Inc., Burlingame, USA
Ziegenserum (normal)	DAKO, Glostrup, DK
• MACS Streptavidin Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3.1.3 Medien und Zusätze

Chloramphenicol	Roche, Mannheim
Cytotoxicity Medium	Cedarlane, Hornby, CDN
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Cytogen, Sinn
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	BioWhittaker Europe, Verviers, B
mit 25 mM Hepes, ohne Glutamin	
L-Glutamin 200 mM	BioWhittaker Europe, Verviers, B
• -Mercaptoethanol 50 mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 5000 U/5000 µg/ml	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Hirnzellmedium

DMEM
10% (v/v) FCS
2 mM L-Glutamin
50 µM • -Mercaptoethanol
50 U/50 µg/ ml
Penicillin/Streptomycin

Zellmedium

IMDM
5% (v/v) FCS
2 mM L-Glutamin
50 µM • -Mercaptoethanol

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Monoklonale Antikörper (mAk)

Antigen	Klon	Isotyp	Bezug
CD3•, murin	145-2C11	Hamster IgG _{2b}	BD PharMingen, Heidelberg
CD11b, murin	M1-70	Ratte IgG _{2b} -FITC	BD PharMingen, Heidelberg
CD11c, murin	N418	Hamster IgG	Endogen, Bonn
CD16/CD32, murin	2.4G2	Ratte IgG _{2b}	BD PharMingen, Heidelberg
CD90.2, murin	30-H12	Ratte IgG _{2b}	BD PharMingen, Heidelberg
I-A. ^{k, r, f, s} , murin	10-2.16	Maus IgG _{2b}	Oi <i>et al.</i> , 1978
IFN•, murin	R4-6A2	Ratte IgG ₁	BD PharMingen, Heidelberg
	XMG1.2	Ratte-IgG ₁ , biotinyliert	BD PharMingen, Heidelberg
Vimentin, human	V9	Maus IgG ₁	Santa Cruz, Heidelberg

3.1.4.2 *T. gondii*-spezifische mAk

Antigen	Klon	Isotyp	Bezug
Bradyzoiten	4F8	Maus IgG _{2a}	Bohne <i>et al.</i> , 1993
GRA7	BATO214	Maus IgG _{2a}	Jacobs <i>et al.</i> , 1998
	5-241-178	Maus IgG _{2a}	Bonhomme <i>et al.</i> , 1998
SAG1	GII-9	Maus IgG ₁	Gonzales, 1988

Die GRA7-spezifischen Antikörper 5-241-178 und BATO214 wurden uns freundlicher Weise von R. Ziemann (Abbott, Abbott Park, USA) und D. Jacobs (Innogenetics, Gent, B) zur Verfügung gestellt. Von BioGenex (San Ramon, USA) wurde der Antikörper GII-9 bezogen. Den Bradyzoiten-spezifischen Antikörper 4F8 erhielten wir von U. Gross (Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Göttingen).

3.1.4.3 Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Konjugation	Bezug
IgG, murin	Ziege	–PE	Dianova, Hamburg
IgG+IgM, murin	Ziege	–FITC	Dianova, Hamburg
IgG+IgM, murin	Ziege	–Peroxidase	Dianova, Hamburg
IgG+IgM, murin	Ziege	–TRITC	Dianova, Hamburg

3.1.5 Zytokine

Interleukin-2, rekombinant

Karasuyama & Melchers, 1988

Maus IFN•, rekombinant

BD PharMingen, Heidelberg

3.1.6 Enzyme

Collagenase/Dispase

Roche, Mannheim

DNase I

Roche, Mannheim

3.1.7 Nukleotide

[Methyl-³H]-Thymidin

Amersham Pharmacia, Freiburg

[5,6-³H]-Uracil

Amersham Pharmacia, Freiburg

3.1.8 Geräte

Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite

MDS Nordion, Ontario, CDN

Brutschrank B5060 EK/CO₂

Heraeus, Hanau

Durchflusszytometer FACScalibur

BD, Heidelberg

Durchflusszytometrischer Zellsortierer FACS Star plus

BD, Heidelberg

ELISA-Photometer Rainbow

Tecan, Crailsheim

Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 200

Nikon, Düsseldorf

Mikroskop Axiovert 100

Zeiss, Jena

Mikroskop Standard 18

Zeiss, Jena

Semi Dry Blot CarboGlas

Schleicher & Schüll, Dassel

Szintillationszähler 1205 Betaplate	LKB Wallac, FIN
Steril-Werkbank Steril-VBH	Biohit, Rosbach
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zellerntegerät Basic 96 Harvester	Skatron, Frankfurt
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Pittsburgh, USA

3.2 Zellkultur

Alle Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Das Arbeiten mit Zellen erfolgte an der Steril-Werkbank.

3.2.1 Wirtszellen

3.2.1.1 L929

Die schnellwachsende murine Fibroblastenlinie L929 (Sanford *et al.*, 1948) diente zur *in vitro*-Kultur von *T. gondii* Tachyzoiten. Sie wurde in Zellmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Pro Flasche wurden 3 x 10⁶ Zellen ausgesät. Nach durchschnittlich drei Tagen war der Monolayer dicht und die Fibroblasten wurden mechanisch mit dem Zellschaber abgeerntet. Die so gewonnenen Zellen wurden 10 min bei 6°C mit 300 x g zentrifugiert, anschließend in frischem Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt.

3.2.1.2 HS27

Die stark adhärente humane Fibroblastenlinie (Suss-Toby *et al.*, 1996) diente als Wirtszelle für *T. gondii* Bradyzoiten sowie für die durchflusszytometrischen Untersuchungen. Der Zellmonolayer wurde mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Flaschen mit Zellmedium ausgespült und die Zellen bei 300 x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Zur Weiterkultur wurden die geernteten Fibroblasten 1:3 verdünnt und neu ausgesät. Durchschnittlich wurden bis zu 1,5 x 10⁶ Zellen pro 75 cm² Kulturflasche geerntet.

3.2.2 *T. gondii*-Stämme

3.2.2.1 Isolat aBK und Transfektanten des Isolats RH

Es wurde mit attenuierten Toxoplasmen des Isolats BK (aBK; Nischik *et al.*, 2001; Nischik, 2003) gearbeitet. Diese Parasiten haben durch längere Zellpassage an Virulenz verloren. Außerdem wurden Yellow Fluorescent Protein (YFP) exprimierende Toxoplasmen der Linie RH (YFP-RH) verwendet. Sie exprimieren unter dem Tubulin-Promoter ein YFP-Tandem sowie das Gen für Chloramphenicoltransferase und sind deshalb resistent gegen Chloramphenicol (Gubbels *et al.*, 2003). Sie wurden unter Zugabe von 2 mM Chloramphenicol zum Zellmedium selektioniert und kultiviert. Die transfizierten Toxoplasmen wurden von B. Striepen (University of Georgia, Athens, USA) zur Verfügung gestellt. Toxoplasmen der Linien aBK und YFP-RH wurden in L929-Fibroblasten vermehrt. Dazu wurden L929-Zellen ausgesät und einige Stunden später mit der 10fachen Menge an Tachyzoiten inokuliert. Die Fibroblasten waren 3 Tage später lysiert, freie Toxoplasmen wurden aus dem Zellüberstand geerntet. Durch differentielles Zentrifugieren konnten extrazelluläre Toxoplasmen von Zelldebris weitgehend befreit werden. Dazu wurden sie zunächst 5 min mit 50 x g bei Raumtemperatur (RT) und anschließend 15 min mit 600 x g bei RT pelletiert. Nach Auszählung dienten sie zur Infektion neuer Wirtszellen. Es wurden etwa zehnmal so viele Tachyzoiten geerntet wie zur Infektion verwendet worden waren.

3.2.2.2 Isolat Dx

Das Maus-avirulente Isolat Dx (Schlüter *et al.*, 1991) wurde sowohl in BALB/c Mäusen als auch in HS27-Fibroblasten passagiert. HS27-Kulturen wurden mit 0,1 bis 1 Bradyzoit pro Zelle infiziert. Nach 2-3 Wochen ohne Mediumwechsel bildeten sich intrazelluläre Zysten aus. Die zystenhaltigen Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und zentrifugiert (5 min, 50 x g, RT). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und mit Trypsin/EDTA bei RT unter mikroskopischer Kontrolle lysiert. Durch Zugabe von FCS wurde die Lyse gestoppt. Anschließend wurden die Toxoplasmen in Zellmedium gewaschen (15 min, 1500 x g, RT). Pro Zyste wurden 500 bis 1000 Bradyzoiten gewonnen.

3.2.3 *T. gondii*-spezifische T-Zellklone

Die verwendeten T-Zellklone 3Tx15 und 3TxS wurden in der Arbeitsgruppe aus (B10xC3H)_F₁-Mäusen nach Immunisierung mit Toxoplasmenlysate isoliert und charakterisiert (Fischer *et al.*, 1996). Beide gehören zum T_H1-Subtyp und besitzen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 (Mosmann *et al.*, 1986). Der T-Zellklon 3Tx15 erkennt LDH1 (p40) von *T. gondii* auf I-E^k MHC-Klasse II-Molekülen. Dieses Protein wird nur im Tachyzoitenstadium exprimiert (Reichmann *et al.*, 2001). 3TxS ist spezifisch für ein 26 kDa *T. gondii* Protein, das in Tachyzoiten und in Bradyzoiten vorkommt. Dieser T-Zellklon erkennt sein Antigen I-A.^bA.^k-restringiert. Alle 3-4 Wochen wurden je 5×10^5 T-Zellen mit 3×10^6 Milzzellen als antigenpräsentierende Zellen (APC) und $3 \cdot \text{g/ml}$ *T. gondii*-Lysat (TL) (3.6.1) in Zellmedium ohne IL-2 stimuliert. Ab dem darauf folgenden Tag wurde den Kulturen 1,5-2% IL-2 zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte täglich und je nach stattgefundener T-Zellproliferation wurden die Kulturen dabei gesplittet. Mit Nachlassen des T-Zell-Wachstums wurde die zugesetzte IL-2-Menge sukzessiv auf 1% reduziert. Bei ruhenden T-Zellen wurde das Kulturmedium nur noch alle 3 Tage gewechselt.

3.3 Infektion mit *T. gondii*

3.3.1 Infektion von Mäusen

Für die *in vivo* Passage von Dx Toxoplasmen wurden BALB/c, für Infektionsversuche (B10xC3H)_F₁ Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter SPF-Bedingungen gezüchtet. Die zur Infektion benötigten Zysten wurden aus chronisch infizierten BALB/c Mäusen gewonnen.

Nach dem Töten der Mäuse durch CO₂ wurde das Hirn präpariert, mehrfach mit PBS gespült, mit einer Schere grob zerkleinert und in 5 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde das Gehirn mehrmals durch sukzessiv kleiner werdende Kanülen (18, 20, 22 gauge) gesaugt und einmal in PBS gewaschen (5 min, 800 x g, 6°C). Nach Resuspension des Pellets in 15 ml PBS wurde die Suspension mit 10 ml Ficoll unterschichtet und für 25 min mit 1000 x g bei RT ohne Bremse zentrifugiert.

Die Zysten aus dem Pellet wurden danach noch zweimal in PBS gewaschen und anschließend gezählt.

Pro Maus wurden 3-5 *T. gondii*-Zysten intraperitoneal injiziert. 4-6 Wochen *post infectionem* (*p.i.*) wurden aus den Mäusen entweder *T. gondii*-Zysten oder intrazerebrale Leukozyten (3.4.2) isoliert.

3.3.2 Puls-Infektion von HS27-Fibroblasten

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden konfluente HS27-Kulturen in 75 cm² Kulturflaschen im Verhältnis von 30-60 Parasiten/Wirtszelle infiziert. Zur Infektion dienten die Isolate aBK und YFP-RH. Das alte Zellmedium wurde abgesaugt und die Toxoplasmen in 5 ml frischem Medium in die Kulturflaschen gegeben. Nach 1-2 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank unter mikroskopischer Kontrolle des Infektionsfortschrittes wurden die Monolayer mehrfach mit PBS abgespült und anschließend 15 ml Zellmedium dazugegeben. Mikroskopisch wurde sichergestellt, dass keine extrazellulären Toxoplasmen mehr vorhanden waren. Die Kulturen wurden bis zur Ernte der Zellen für die Durchflusszytometrie bzw. Biotinylierung von Oberflächenproteinen im Brutschrank inkubiert.

3.4 Zellpräparationen

Hirn- und Milzzellen stammten aus 3-6 Monate alten (B10xC3H)F₁ Hybridmäusen.

3.4.1 Gewinnung von Milzzellen

Nach dem Töten der Maus mit CO₂ wurde sie mit 70% Ethanol desinfiziert und auf der linken Seite die Bauchhöhle eröffnet. Die Milz wurde frei präpariert und in Zellmedium aufgenommen. In einer Petrischale wurde die gewonnene Milz in 3-4 Teile zerschnitten und zwischen den mattgeschliffenen Seiten zweier Objektträger zerrieben. Anschließend wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 5-10 min auf Eis inkubiert, um Bindegewebsreste zu sedimentieren. Die Zellen im Überstand wurden 10 min mit 300 x g bei 4°C pelletiert. Zur Erythrozytenlyse wurden sie in 2 ml 0,83% Ammoniumchlorid resuspendiert und für 2 min bei RT

inkubiert. Die Suspension wurde nach 2 x Waschen in Zellmedium aufgenommen und gezählt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 12×10^7 Zellen pro Milz.

3.4.2 Präparation intrazerebraler Leukozyten (ICL)

Zur Gewinnung von intrazerebralen Leukozyten wurden die Hirne von chronisch infizierten Mäusen (3.3.1) und uninfizierten Mäusen isoliert. Dazu wurden die Mäuse 3 min in Metofane anästhesiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach Öffnung des Brustkorbs wurde die rechte Herzkammer eröffnet und 25-50 ml eiskaltes PBS in die linke Kammer injiziert. Die Perfusion war ausreichend, wenn sich die Leber weiß verfärbte. Die Maus wurde dekapitiert. Nach Eröffnung des Schädels wurde das Hirn in eine Petrischale überführt und mit der Iris-Schere zerkleinert. Nach Zugabe von 4,5 ml Hirnzellmedium wurde die Suspension mehrmals durch eine 18 gauge Kanüle gezogen. Das Hirngewebe von infizierten Mäusen wurde mit 300 \bullet l und das von uninfizierten mit 1,5 ml Collagenase/Dispase (10 mg/ml) 45 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden 100 \bullet l DNase I (10 mg/ml) für weitere 45 min bei 37 °C dazugegeben. Die Zellsuspension wurde in 40 ml Hirnzellmedium gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C) und das in 10 ml Medium resuspendierte Pellet durch ein Zellsieb (70 \bullet m) gespült und erneut zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Die Hirnzellen wurden in 60% Percoll aufgenommen und vorsichtig mit 30% Percoll überschichtet. Nach der Zentrifugation des Gradienten (25 min, 1000 x g, RT, ohne Bremse) wurde die oben aufliegende Myelinschicht abgesaugt. Die Interphase, welche die mononukleären Hirnzellen enthält, wurde vorsichtig gesammelt und 2 x mit 40 ml Hirnzellmedium gewaschen (15 min, 600 x g, 4°C und 10 min, 400 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 1-2 ml Medium suspendiert und gezählt. Aus uninfizierten Mäusen wurden 3×10^6 und aus infizierten 4-6 Wochen nach Infektion 25×10^6 intrazerebrale Leukozyten gewonnen.

Percoll: 100% Percoll: Percoll in 10 x PBS (9:1)
30% Percoll in PBS
60% Percoll in Hirnzellmedium

3.4.3 T-Zelldepletion der ICL

Vor der Verwendung als antigenpräsentierende Zellen wurden die ICL (3.4.2) aus infizierten Mäusen T-Zelldepletiert, um ausschließlich die Proliferation und IFN \bullet -Sekretion der im Test zugesetzten T-Zellklone zu messen. Dazu wurden die ICL in ‚Cytotoxicity Medium‘ in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Nach Zugabe von $10 \mu\text{g}$ Ratte anti-Maus CD90.2 (Thy-1.2) pro ml wurde die Suspension 1 h unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert und anschließend mit ‚Cytotoxicity Medium‘ gewaschen (10 min, $300 \times g$, 4°C). Zur Lyse der nun mit Ak-markierten T-Zellen wurde das Pellet mit Komplement in ‚Cytotoxicity Medium‘ (1:20, steril filtriert) resuspendiert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen in ‚Cytotoxicity Medium‘ wurden die Zellen in Puffer aufgenommen und gezählt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug ungefähr 35% der Ausgangspopulation.

3.5 Aufreinigung von Dendritischen Zellen (DC)

3.5.1 Magnetische Aufreinigung (MACS)

Zur Anreicherung und Aufreinigung Dendritischer Zellen aus dem Hirn und der Milz wurde das ‚magnetic cell sorting‘ (MACS) angewendet. Dabei wurden CD11c⁺ Zellen mit CD11c-spezifischen super-paramagnetischen ‚MicroBeads‘ markiert und anschließend über eine MACS-Säule in einem Magnetfeld selektioniert. Milzzellen bzw. T-Zelldepletierte ICL wurden in MACS-Puffer aufgenommen und durch ein Zellsieb ($40 \mu\text{m}$) gespült. Nach Waschen (10 min, $300 \times g$, 4°C) wurden die Zellen in einem Gemisch von ‚MicroBeads‘ und MACS-Puffer (1:4) für 15 min bei 4°C inkubiert. Bei den Milzzellen wurden $10 \mu\text{l}$ ‚MicroBeads‘ und bei den Hirnzellen $20 \mu\text{l}$ ‚MicroBeads‘ pro 10^7 Gesamtzellen eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen im 20fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen (10 min, $300 \times g$, 4°C). Bis zu 10^8 Zellen wurden in $500 \mu\text{l}$ Puffer aufgenommen und auf die mit $2 \times 500 \mu\text{l}$ Puffer gewaschene MACS-Säule im Magnetfeld gegeben. Nach der Passage der Suspension wurde mit $3 \times 500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gespült. Der bis dahin gewonnene Durchlauf enthielt die CD11c⁻ Zellen. Außerhalb des Magnetfeldes wurden abschließend 2 ml Puffer durch die Säule gestempelt und mit dem Eluat die CD11c⁺

3.6 Antigenpräparation

3.6.1 *T. gondii*-Lysat (TL)

Zur Präparation von Toxoplasmenlysat wurden BK Tachyzoiten verwendet. Nach der Ernte wurden sie einmal in PBS gewaschen, abzentrifugiert (15 min, 600 x g, 4°C) und als Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die gesammelten Pellets in *aqua* mit einer Konzentration von 10⁹ Toxoplasmen/ml gepoolt. Diese Suspension wurde 10 Einfrier/Auftau-Zyklen in flüssigem Stickstoff bzw. 37°C warmen Wasserbad unterzogen. Durch zweimaliges Zentrifugieren (15 min, 1000 x g, 4 °C und 15 min, 10.000 x g, 4°C) wurden die Membranbestandteile pelletiert und TL als Überstand gewonnen. Der Proteingehalt des Lysates wurde mit dem BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt und das Lysat anschließend bei -70°C gelagert.

3.6.2 *T. gondii*-konditioniertes Medium (TgKM)

Zur Herstellung von *T. gondii*-konditioniertem Medium wurden BK Toxoplasmen nach der Ernte in PBS mit 1% FCS und 0,1 % EDTA aufgenommen und dabei eine Konzentration von 10⁹ Toxoplasmen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde 4 h im Brutschrank inkubiert. Durch zweimaliges Zentrifugieren (15 min, 400 x g, 22°C und 15 min, 1200 x g, 22°C) wurden die Toxoplasmen pelletiert und *T. gondii*-konditioniertes Medium als Überstand gewonnen.

3.6.3 Immunpräzipitation biotinylierter Zelloberflächenproteine

Wie unter 3.3.2 beschrieben wurden HS27-Kulturen mit BK Toxoplasmen für 1-2 h puls-infiziert, gewaschen und anschließend für 20 h im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Vor der Biotinylierung wurden die Monolayer dreimal mit PBS (pH 8) gespült. Mikroskopisch wurde das Vorhandensein von extrazellulären Toxoplasmen ausgeschlossen. Anschließend wurden 5 ml Sulfo-NHS-Biotin (50 • g/ml) in PBS (pH 8) pro Kulturflasche dazugegeben. Eine infizierte HS27-Kultur wurde als Negativkontrolle mit 5 ml PBS (pH 8) ohne Biotin inkubiert. Anschließend wurden die Monolayer dreimal mit eiskaltem PBS (pH 8) abgespült und

nach Zugabe von 1 ml Lysepuffer mit dem Zellschaber geerntet. Die Suspension wurde für 10-30 min auf Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt. Durch Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4°C für 10 min wurde Zelldebris sedimentiert. Zu je 500 •l Überstand wurden 100 •l Streptavidin ‚MicroBeads‘ (Miltenyi Biotec) gegeben und für einige Sekunden geschüttelt. Eine sich im Magnetfeld befindende •MACS-Säule wurde mit 100 •l Protein-Äquilibriumspuffer (Miltenyi Biotec) und 2 x 100 •l Lysepuffer gespült. Anschließend wurden pro Säule 600 •l des mit den ‚MicroBeads‘ konjugierten Überstandes aufgetragen, der Durchlauf wurde aufgefangen. Die Säule wurde mit 4 x 100 •l Lysepuffer und 1 x 100 •l Niedrig-Salzpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Moleküle wegzuwaschen. Die auf der Säule verbliebenen biotinylierten Moleküle wurden im Magnetfeld mit 20 •l 95°C heißem 1 x SDS-Probenpuffer (3.7.1) für 5 min inkubiert und abschließend mit 50 •l 95°C heißem 1 x SDS-Probenpuffer außerhalb des Magnetfeldes aus der Säule eluiert. Das Eluat wurde direkt im Western Blot (3.7.3) eingesetzt.

Lysepuffer	150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl (pH 8, entgast) Proteaseninhibitoren
-------------------	---

Niedrig-Salzpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
---------------------------	-------------------------

3.7 Antigennachweise

3.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Lämmli, 1970). Unter Zugabe des denaturierenden Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die native Proteinstruktur aufgefaltet und die Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld Richtung Anode. Die Strecke, die sie hierbei zurücklegen, ist ausschließlich von ihrem Molekulargewicht abhängig. Zur Untersuchung des Bereichs um 30 kDa Molekulargewicht wurden Trenngele mit 12%

Polyacrylamid unter reduzierenden Bedingungen verwendet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach 30 min wurde das n-Butanol abgenommen und das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkammes wurden Probenkammern ausgespart. Das Sammelgel wurde mit den Proben befüllt, die zuvor mit 20% 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min aufgekocht worden waren. Die Elektrophorese erfolgte mit 100 V bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte und ab dann mit 200 V bis zum Erreichen des Gelendes. Auf jedem Gel wurde SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard als Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Das Gel wurde anschließend geblottet und Coomassie gefärbt.

Trenngel 12%	12% (w/v) Acrylamid 0,32% (w/v) Bisacrylamid 25 mM Tris-HCl (pH 8,8, entgast) 0,1% (w/v) SDS 0,1% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 0,1% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Sammelgel	3% (w/v) Acrylamid 0,08% (w/v) Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl (pH 6,8, entgast) 0,1% (w/v) SDS 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS
Elektrophoresepuffer	400 mM Glycin 50 mM Tris 0,1% (w/v) SDS
5 x SDS-Probenpuffer	10% (w/v) SDS 250 mM Tris-HCl (pH 6,8, entgast) 40% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 5% • -Mercaptoethanol

3.7.2 Coomassie-Färbung

Für die Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE (4.5.1) wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung für mindestens 3 h entfärbt und auf Filterpapier getrocknet. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 300 ng Protein.

Coomassie-Färbelösung	40% (v/v) Ethanol 7,5% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärbelösung	7,5% (v/v) Essigsäure 20% (v/v) Ethanol

3.7.3 Western Blot

Zum immunchemischen Nachweis von Antigenen wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten (3.7.1) Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden 9 Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Gels geschnitten. Drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier wurden auf die Kathodenplatte gelegt. Darauf folgte das in Kathodenpuffer gewaschene Gel und die mit Anodenpuffer I befeuchtete Nitrozellulosemembran. Anschließend wurden je drei in Anodenpuffer I bzw. II getränkte Filterpapiere darüberschichtet. Das Gel-Membran-Sandwich wurde mit einer Glaspipette ausgerollt, um Luftblasen zu entfernen. In einem ‚Semi Dry Blot‘ erfolgte der Elektrotransfer der Proteine mit 0,8 mA/cm² Gelfläche für 30-60 min.

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM 6-Aminohexansäure 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer I	30 mM Tris 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II

300 mM Tris

20% (v/v) Methanol

Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran durch Inkubation in PBS mit 5% Milchpulver für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Horizontalschüttler blockiert. Die Markierung mit Primär- und Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper wurde in PBS mit 1% Milchpulver für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran 2 x 5 min in PBS gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Chemolumineszenz-Substrat entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Lumineszenz wurde mit Röntgenfilmen in einer Expositionskassette für 30 Sekunden bis 30 Minuten detektiert.

3.7.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht den Nachweis von intrazellulären Antigenen und Oberflächenantigenen über die Detektion von Fluoreszenzsignalen. Im ‚fluorescence-activated cell sorter‘ (FACS) wird die fluoreszenzmarkierte Zellsuspension über eine Kapillare vereinzelt und an einem Laser vorbeigeleitet. Das Licht wird an den Zellen gestreut und an Antigene gebundene Fluoreszenzmoleküle werden zum Fluoreszieren angeregt. Photodetektoren messen die Lichtstreuung und die Fluoreszenzemission. Ersteres ist abhängig von der Zellgröße und -granularität und wird als forward (FSC) und side scatter (SSC) angegeben. Die Intensität der Fluoreszenz liefert Informationen über das Vorhandensein von Antigenen. Für Analysen mit dem FACS wurden HS27-Fibroblasten benutzt, die wie unter 3.3.2 beschrieben mit *T. gondii* infiziert wurden.

Zur Ernte wurden HS27-Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion 2 x mit PBS gespült, mit 12 ml 0,1% (w/v) EDTA in PBS 1-2 h im Brutschrank inkubiert und anschließend vorsichtig mit dem Zellschaber geerntet. Uninfizierte Kulturen dienten als Negativkontrolle. Bei der Zellernte wurde bewusst auf den Einsatz von Trypsin verzichtet, um oberflächenständige Epitope zu erhalten. Die Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen und durch Siebgewebe (40 µm) filtriert und mit mindestens $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Probe in FACS-Röhrchen gefüllt. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen 8 min mit 200 x g bei 4 °C pelletiert und nach Abschütten des Überstandes mit je 500 µl Cytofix fixiert. Die Suspension wurde 20 min auf Eis

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 2 ml FACS-Puffer gewaschen (8 min, 200 x g, 4°C), aufgeschüttelt und mit 0,1% (w/v) Saponin in FACS-Puffer für 20 min auf Eis permeabilisiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten für die intrazelluläre Färbung mit 0,1% (w/v) Saponin in FACS-Puffer und für die Oberflächenfärbung mit FACS-Puffer. Beide Ansätze wurden nun 8 min mit 200 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden mit 10% (v/v) Ziegen Serum in Puffer für 30 min auf Eis geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen und mit Primärantikörper 30 min auf Eis gefärbt. Die Spezifität der Primärantikörperbindung wurde mit irrelevanten Antikörpern des gleichen Isotyps und über die Analyse uninfizierter Fibroblasten geprüft. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit dem Phycoerythrin- (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) konjugierten Sekundärantikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Waschung und die Zellen wurden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Kurz vor der Messung wurde zu den Proben der Oberflächenfärbung 1 µg Propidiumjodid (PI) gegeben. Dadurch wurden die toten Zellen markiert und konnten von der Messung ausgeschlossen werden. Bei beiden Ansätzen wurden nur die Fluoreszenzsignale von Zellen erfasst, die ihrer Größe und Granularität nach intakt waren. Außerdem wurde anhand des Vimentin-Signals bei der Oberflächenfärbung die Intaktheit und bei der intrazellulären Färbung der Permeabilisierungsgrad der Zellmembranen geprüft. Der Antikörper markiert dabei spezifisch Vimentin, das als Intermediärfilament des Zytoskelettes von mesenchymalen Zellen nur intrazellulär vorkommt (Franke *et al.*, 1978). Mit dem Durchflusszytometer wurden drei Fluoreszenzen (FITC bzw. YFP, PE und PI) gemessen. Je Probe wurden die Fluoreszenzmuster von 10.000 Zellen detektiert und die Ergebnisse mit der Cellquest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

FACS-Puffer

0,1% (w/v) BSA

0,05% (w/v) Natriumazid

in PBS, steril filtriert

3.8 Nachweis intrazellulärer Toxoplasmen

3.8.1 Diff-Quik-Färbung

Zur Detektion intrazellulärer Toxoplasmen wurden etwa 2×10^4 Wirtszellen in PBS mit Hilfe einer Zytocentrifuge (5 min, 50 x g, RT) pro Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden anschließend mit Diff-Quik gefärbt. Der Diff-Quik ist ein Schnellfärbetest, dessen Ergebnisse gut mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) vergleichbar sind. Die Objektträger wurden luftgetrocknet, 5 x 1 Sekunde in die Fixierlösung (Methanol), 5 x 1 Sekunde in Färbelösung I (Eosin G) und 5 x 1 Sekunde in Färbelösung II (Thiazin-Farbstoff) getaucht. Abschließend wurden die Objektträger mit *aqua* abgespült und nach Lufttrocknung mit Vecta Mount und einem Deckglas eingedeckt. Pro Infektionsansatz wurden 3 Objektträger angefertigt und pro Objektträger drei Gesichtsfelder bei 100facher Vergrößerung gezählt. Dabei wurden die Anzahl der infizierten Zellen und die Anzahl der Toxoplasmen pro Zelle bestimmt.

3.8.2 Messung der intrazellulären Proliferation

Die intrazelluläre Toxoplasmenvermehrung wurde spezifisch über den Einbau von ^3H -Uracil in parasitäre DNA und RNA gemessen. Toxoplasmen besitzen im Gegensatz zur Wirtszelle eine 100fach stärkere Aktivität der Uracil-Phosphoribosyltransferase und sind so in der Lage externes Uracil direkt zur Nukleotidsynthese zu verwenden (Pfefferkorn & Pfefferkorn, 1977).

Zur Messung wurden Dendritische Zellen aus dem Hirn (3.5) infizierter Mäuse (10^5 /well) in 96 well-Platten ausgesät. Als Positivkontrollen dienten HS27-Fibroblasten, die mit 3×10^4 BK Tachyzoiten bzw. Dx Bradyzoiten beimpft wurden. Dendritische Zellen aus der Milz uninfizierter Mäuse und nicht infizierte HS27-Zellen stellten die Negativkontrollen. Nach 48 h wurden die Kulturen mit 37 kBq/well ^3H -Uracil für weitere 90 h markiert. Anschließend wurden die Testplatten bei -20°C eingefroren und so die Nukleinsäuren freigesetzt. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt der wells mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf einen Glasfaserfilter übertragen. Dieser wurde 10 min bei 100°C getrocknet und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie eingeschweißt. Dem Inhalt der wells

entsprechende Felder wurden mit dem Szintillationszähler auf Radioaktivität abgetastet. Die pro Ansatz gezählten ‚counts per minute‘ (cpm) dienten als Maß für die Stärke der Toxoplasmenproliferation. Für jede Versuchsbedingung wurden Dreifachansätze angelegt, deren arithmetisches Mittel als Ergebnis angegeben ist. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde ‚Graphpad Prism‘ (GraphPad Software, San Diego, USA) benutzt.

3.8.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Dendritische Zellen aus dem Hirn mit *T. gondii* infizierter Mäuse und Dendritische Zellen aus der Milz naiver Mäuse wurden wie unter 3.4 und 3.5 beschrieben gewonnen und mit der Zytocentrifuge 5×10^4 Zellen pro Objektträger aufgebracht (6 min, 400 x g, RT). HS27-Fibroblasten wurden auf 8-Kammer-Objektträgern (Lab-Tek II Chamber Slide System) mit 1 cm^2 Grundfläche pro Kammer ausgesät. Dazu wurden die Objektträger vorher mit Medium inkubiert und 3×10^4 Zellen pro Kammer dazugegeben. Über Nacht wurden die Fibroblasten mit BK Toxoplasmen in einem Parasit/Wirtszell-Verhältnis von 5:1 infiziert. Die Dendritischen Zellen aus der Milz und die mit BK Toxoplasmen infizierten HS27-Fibroblasten dienten als Kontrollen. Alle Objektträger wurden 15 min bei -20°C mit Aceton fixiert. Um den Zellspot auf den mit der Zytocentrifuge hergestellten Präparaten wurde mit Fettstift eine Markierung gezogen, die das Ablauen der Reaktionsflüssigkeiten vom Objektträger verhinderte. Dann wurden alle Objektträger mit Blocklösung (10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Ziegenserum in PBS) 30 min bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit dem Primärantikörper in 10fach verdünnter Blocklösung 1 h bei RT in der Feuchtkammer markiert. Zur Kontrolle Antigen-unspezifischer Bindungen wurde ein gleicher Isotyp mit irrelevanter Antigenspezifität eingesetzt. Anschließend wurden die Präparate 2 x mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzkonjugiertem Sekundärantikörper in 10fach verdünnter Blocklösung 1 h bei RT in der abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Die Objektträger wurden 2 x mit PBS gewaschen. Alle Objektträger wurden mit *aqua* gespült und mit Fluoromount G eingedeckt. Die Analyse der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei den Anregungs-/Emissionswellenlängen 490/525 nm (FITC, grün) oder 540/580 nm (Tetramethyl-Rhod.-Isothiocyanat (TRITC), rot).

3.9 Antigenpräsentationstests

3.9.1 Stimulationsansatz

Zum Nachweis von Antigenpräsentation durch Dendritische Hirnzellen aus infizierten Mäusen wurde die antigenabhängige Stimulation von syngen *T. gondii*-spezifischen T-Zellklonen gemessen. Die Proliferation und die IFN γ -Sekretion der T-Zellen dienten dazu als Messstrecke.

In Mikrotiterplatten (96 A/2 well) wurden 10^4 T-Zellen mit 2×10^4 Dendritischen Zellen aus dem Hirn chronisch infizierter Mäuse ohne Zugabe von exogenem Antigen in Hirnzellmedium ausgesät. Als Referenz-APC dienten Dendritische Zellen aus dem Hirn oder der Milz naiver Mäuse. Alle verwendeten antigenpräsentierenden Zellen wurden mit 10 Gy gamma-bestrahlt (137 Cs), um ihre Eigenproliferation zu unterdrücken. Als Positivkontrollen dienten Ansätze, denen 1 μ g TL pro well als exogenes Antigen zugesetzt wurde. In alle wells wurde Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P) (1:20.000) gegeben, um eine Proliferation der Toxoplasmen zu unterdrücken.

3.9.2 Messung der T-Zellproliferation

Die Proliferation der T-Zellklone wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA replizierender T-Zellen gemessen. Dazu wurden die Stimulationsansätze nach 48 h Kultur mit 0,1 μ Ci/well (3,7 kBq/well) ^3H -Thymidin für weitere 24 h markiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Die DNA-gebundene Radioaktivität als Maß für die stattgefundene T-Zellproliferation wurde wie unter 3.8.2 beschrieben im Szintillationszähler bestimmt. Für jede Versuchsbedingung wurden Dreifachansätze angelegt, deren arithmetisches Mittel als Ergebnis angegeben ist. Die Software ‚Graphpad Prism‘ (GraphPad Software, San Diego, USA) wurde zur Datendarstellung verwendet.

3.9.3 Messung der IFN γ -Sekretion (ELISA)

Als typische $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen produzieren beide T-Zellklone IFN γ nach antigenabhängiger Stimulierung. Die Messung des sezernierten IFN γ erfolgte photometrisch mit Hilfe eines ‚enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA). Dem T-Zellstimulationsansatz

wurde nach 48 h vor der Zugabe von ^3H -Thymidin 30 μl Überstand pro well abgenommen und in neue Mikrotiterplatten überführt. Diese wurden bei -20°C gelagert. Für den Sandwich-Elisa wurde zunächst der Fängerantikörper Ratte anti-Maus IFN γ in PBS (pH 8) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ mit 100 $\mu\text{l/well}$ bei 4°C über Nacht an eine 96 well ‚Immunoplate Maxisorp‘ angelagert. Nach 3 x Waschen mit 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 $\mu\text{l/well}$ 10% (v/v) FCS in PBS 1 h bei 37°C geblockt. Anschließend wurden die Platten 3 x gewaschen und der IFN γ -Standard und die aufgetauten Überstände titriert auf die Platten übertragen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze 3 x gewaschen und mit dem biotinylierten Detektionsantikörper Ratte anti-Maus IFN γ 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3 x Waschen wurde Peroxidasegekoppeltes Streptavidin zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 5 x gewaschen und nach Zugabe von 100 μl des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) pro well nach Augenmaß entwickelt. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde 100 $\mu\text{l/well}$ 1 M H_2SO_4 zupipettiert. Die Proben wurden im ELISA-Photometer bei 450 nm unter Verwendung der Software ‚Easy WIN fitting‘ (Tecan Software, Hannover) gemessen. Zur Auswertung der Daten diente ‚Graphpad Prism‘ (GraphPad Software, San Diego, USA). Das angegebene Ergebnis ist das arithmetische Mittel aus drei Ansätzen pro Versuchsbedingung.

3.10 Statistik

Der ‚students t-test‘ wurde zur Berechnung der Signifikanzen verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Export parasitärer Antigene in infizierten Zellen

GRA7 ist ein integrales Membranprotein, das in extra- und intrazellulären Toxoplasmen membrangebunden vorliegt (Neudeck *et al.*, 2002). In infizierten Zellen assoziiert GRA7 mit der Membran und dem tubulovesikulären Netzwerk der PV (Bonhomme *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1998) sowie mit filamentären Strukturen, die von der PV ins Zytoplasma der Wirtszelle ziehen (Jacobs *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde GRA7 im Überstand Zysten tragender Zellen nachgewiesen (Fischer *et al.*, 1998). Basierend auf diesen Befunden wurde die Hypothese formuliert, dass GRA7 aus der Wirtszelle exportiert wird. Da GRA7 membrangebunden vorliegt, stellt die Wirtszellmembran eine mögliche Station des Exportweges dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirtszelloberfläche auf GRA7 untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, wie oberflächenassoziiertes GRA7 Signal mit dem Infektionsstatus der Zelle korreliert.

4.1.1 Nachweis von GRA7 an der Oberfläche lebendiger Zellen

Es sollte geprüft werden, ob GRA7 an der Oberfläche intakter, lebendiger Zellen nachweisbar ist. Dazu wurde zunächst die Detektion von GRA7 mittels ‚fluorescence-activated cell sorter‘ (FACS) etabliert. In infizierten HS27-Zellen konnte, nach Permeabilisierung, intrazelluläres GRA7 mittels FACS nachgewiesen werden (Abb. 3). Der Grad der Permeabilisierung wurde über die Färbung des intrazellulären Markers Vimentin geprüft. Es erwiesen sich 92,2% der Zellen als Vimentin-positiv und damit permeabel. Bei der gewählten Infektionsdosis und -dauer waren 90,6% der Zellen GRA7-positiv und somit infiziert. Ein vergleichbarer Anteil infizierter Zellen ($89,3 \pm 1,3\%$) wurde durch Auszählen am Mikroskop nach Diff-Quik-Färbung bestimmt. In uninfizierten Zellen wurde mittels FACS kein GRA7 detektiert (Abb. 3).

Für den Nachweis von ausschließlich oberflächenassoziiertem GRA7 war es notwendig die Intaktheit der Wirtszellmembran sicherzustellen. Deshalb war es erforderlich tote Zellen, die unspezifisch Antikörper binden und permeabel sind, von den Analysen auszuschließen. Mit dem FACS können die toten Zellen über die

Markierung mit Propidiumjodid (PI) detektiert werden (Pavlik *et al.*, 1985). Dazu wurde den humanen Fibroblasten PI zugegeben, das an die DNA nekrotischer und spätapoptotischer Zellen bindet, während lebendige Zellen die Fähigkeit besitzen PI aus der Zelle zu eliminieren (Abb. 4). Darüber hinaus wurde die Integrität der Membran der PI-negativen, lebendigen Zellen über Markierung mit anti-Vimentin mAk kontrolliert. Nur 2,4% der Zellen waren Vimentin-positiv (Abb. 4) und wurden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu zeigten sich 27,7% der analysierten Fibroblasten positiv für GRA7. Damit gelang erstmals ein Nachweis von GRA7 an der Oberfläche intakter, lebendiger Zellen einer infizierten Zellkultur.

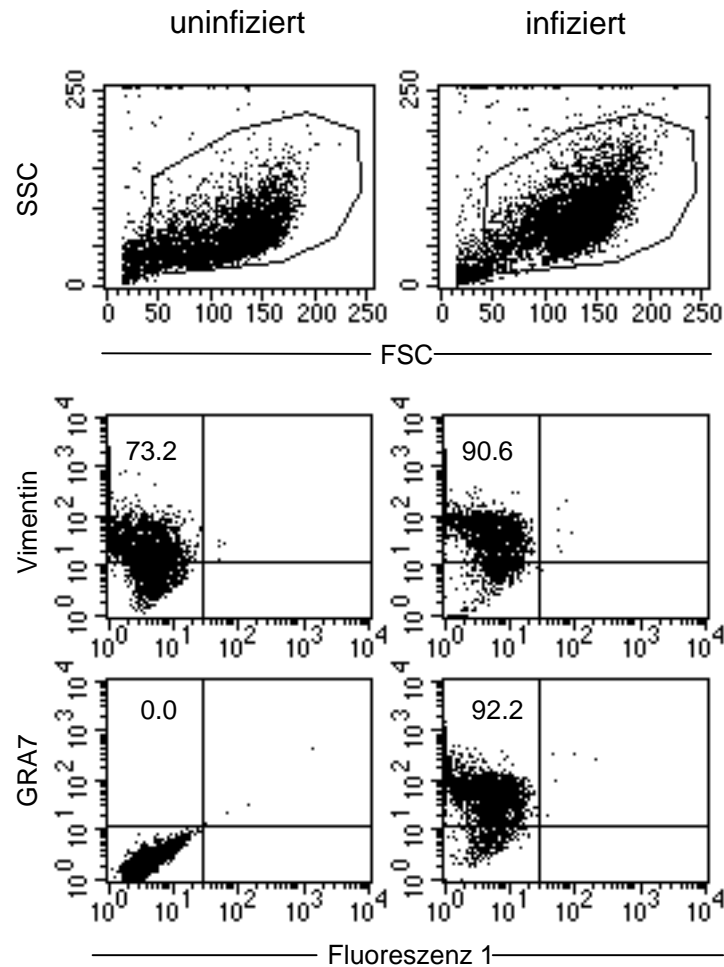


Abb. 3 Nachweis von intrazellulärem GRA7 in *T. gondii*-infizierten Zellen

HS27-Fibroblasten wurden mit aBK Tachyzoiten mit einer MOI von 40 pulsinfiziert, für weitere 16 h inkubiert und anschließend geerntet, fixiert und permeabilisiert. Alle nachfolgenden Inkubationen erfolgten in der Anwesenheit von 0,1% Saponin. Die Zellen wurden mit anti-Vimentin mAk V9 bzw. anti-GRA7 mAk 5-241-178 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG gefärbt und im FACS analysiert. Uninfizierte HS27 wurden parallel dazu gefärbt. Das jeweils erste Punktediagramm zeigt den nach forward (FSC) und side scatter (SSC) ausgewählten Bereich, der der Größe und Granularität nach intakte Zellen enthält. Pro Probe wurden 10.000 Zellen aus diesem Bereich analysiert. Die Quadranten wurden nach der Isotypkontrolle gesetzt. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Analyse von 10 unabhängigen Experimenten.

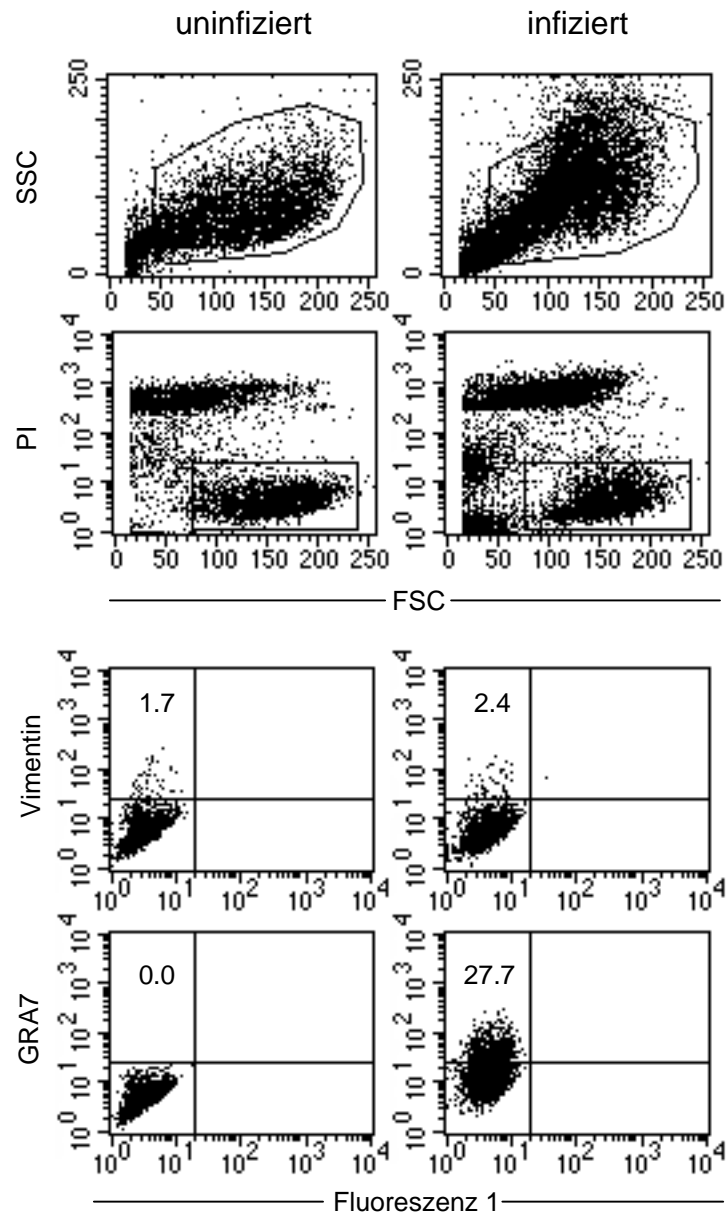
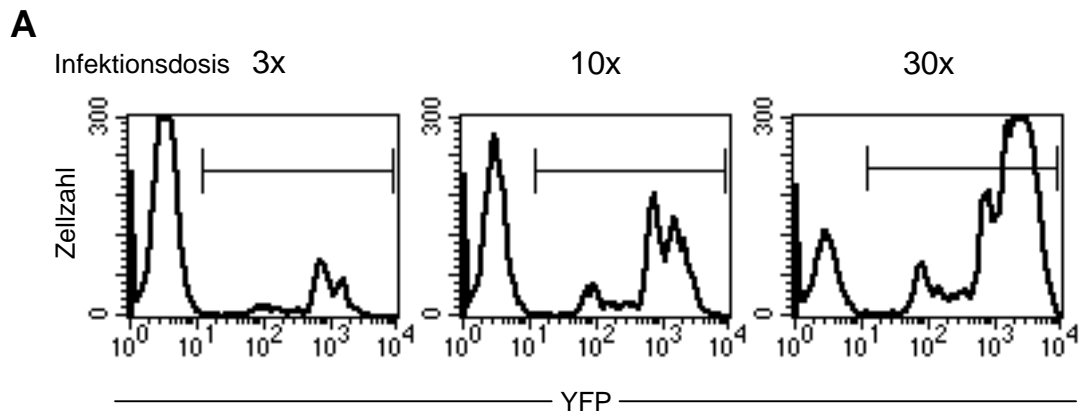


Abb. 4 Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 in infizierten Zellkulturen

Uninfizierte HS27 und mit aBK Tachyzoiten (MOI=40) infizierte HS27-Fibroblasten (16 h *p.i.*) wurden mit anti-Vimentin mAk V9 bzw. anti-GRA7 mAk 5-241-178 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG gefärbt. Kurz vor der Messung im FACS wurde den Zellen Propidiumjodid (PI) zugegeben. 10.000 Zellen pro Probe wurden basierend auf FSC und SSC unter Ausschluss PI-positiver Zellen analysiert. Die Quadranteneinteilung basiert auf der Färbung mit dem Isotypkontroll-Antikörper. Gezeigt ist eine repräsentative FACS-Analyse aus 10 unabhängigen Experimenten.

4.1.2 Nachweis infizierter Zellen mittels YFP-exprimierender Toxoplasmen

Als nächstes sollte untersucht werden, wie der Infektionsstatus der Zelle die Stärke des oberflächenassoziierten GRA7-Signals bestimmt. Um infizierte Zellen mittels FACS ohne Permeabilisierung identifizieren zu können, wurden fluoreszierende Toxoplasmen eingesetzt. Es wurde zunächst getestet, ob mittels FACS alle infizierten Zellen anhand ihrer Fluoreszenz erfasst werden. Dazu wurden HS27-Fibroblasten mit ‚yellow fluorescent protein‘ (YFP)-exprimierenden RH Tachyzoiten infiziert und anschließend im FACS analysiert (Abb. 5A). Parallel dazu wurde der Anteil infizierter Zellen nach Diff-Quik-Färbung mikroskopisch bestimmt. Abb. 5B zeigt zusammenfassend, dass mit beiden Methoden ein übereinstimmendes Ergebnis gefunden wurde.



B

Nachweismethode	% infizierte Zellen		
	Infektionsdosis		
	3x	10x	30x
FACS	21	52	83
Mikroskopie	25 ± 3	45 ± 8	79 ± 4

Abb. 5 Identifikation infizierter Zellen mittels fluoreszierender Toxoplasmen

HS27-Fibroblasten wurden 20 h nach Pulsinfektion mit 3fach, 10fach bzw. 30fach YFP-RH Tachyzoiten (MOI=3, 10 bzw. 30) geerntet und vergleichend mittels FACS und Mikroskop auf ihren Infektionsstatus untersucht.

A Dargestellt sind repräsentative Histogramme der FACS-Analyse. Pro Probe wurden 10.000 Zellen basierend auf FSC und SSC unter Ausschluss PI-positiver Zellen gemessen. Der Marker wurde nach einer uninfizierten Probe gesetzt.

B Mittels Zytozentrifuge wurden die Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Pro Probe wurden 3 Objektträger angefertigt und die Zellen mit Diff-Quik gefärbt. Je 100 Zellen wurden pro Objektträger bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Die Ergebnisse der FACS-Analyse und mikroskopischen Auswertung (Mittelwert ± SD) sind in der Tabelle gegenübergestellt.

4.1.3 Infizierte und uninfizierte Zellen tragen GRA7 an ihrer Oberfläche

Durch die Verwendung YFP-exprimierender Toxoplasmen konnten infizierte Zellen parallel zum Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 identifiziert werden. So sollte untersucht werden, wie das GRA7-Signal an der Zelloberfläche vom Grad der Infektion der Zellen abhängt. Dazu wurden HS27-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit YFP-RH im FACS auf oberflächenassoziiertes GRA7 getestet (Abb. 6).

Es zeigte sich ein Anstieg der GRA7-positiven Zellen über die Infektionszeit. 2 h nach Infektion waren 2% der YFP-positiven Zellen GRA7-positiv. Das entspricht dem Anteil Vimentin-positiver (2,12%) und somit permeabler Zellen, so dass hier am ehesten intrazelluläres GRA7 detektiert wurde. Der Anteil Vimentin-positiver Zellen blieb über die gesamte Versuchszeit unter 4% (ohne Abb.). 2 h nach Infektion waren mikroskopisch $66,7 \pm 3,1\%$ der Zellen infiziert. Im FACS zeigten sich 68,4% der Gesamtzellen YFP-positiv.

15 h nach Infektion waren 5,9% der infizierten Zellen GRA7-positiv. Dieser Anteil stieg auf 21,7% 30 h nach Infektion. 30 h nach Infektion konnten zwei in ihrer YFP-Fluoreszenz unterschiedliche Populationen detektiert werden. Die Zellen mit niedrigerer YFP-Intensität zeigten mit 38,4% einen höheren Anteil GRA7-positiver Zellen. Wohingegen nur 11,4% der YFP-intensiven Zellen positiv für oberflächenassoziiertes GRA7 waren. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt wurden 72,3% YFP-positive Zellen im FACS detektiert und $69,5 \pm 4,6\%$ infizierte Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Es fand sich somit durchflusszytometrisch und mikroskopisch und wie bei den anderen Untersuchungszeitpunkten ein übereinstimmender Anteil infizierter Zellen. Die Infektionsrate der Zellen war damit über den gesamten Infektionszeitraum stabil. Das deutet daraufhin, dass keine Neuinfektion durch ausgestiegene Toxoplasmen in dieser Zeit erfolgte.

An den uninfizierten Zellen wurde ebenfalls oberflächliches GRA7 nachgewiesen. Es zeigten sich 2 h nach Infektion 2,9 % der uninfizierten Zellen GRA7-positiv, 15 h nach Infektion 6,7% und 30 h nach Infektion 45,3%. Eine Erklärung dafür könnte ein Verlust bzw. Abschwächung des YFP-Signals der Toxoplasmen im Versuchsverlauf sein. Aufgrund der Ergebnisse aus dem Vergleich FACS und Mikroskopie der mit

YFP-exprimierenden Toxoplasmen infizierten Zellen 20 h nach Infektion (4.1.2) und der Übereinstimmung des mittels FACS und Mikroskopie ermittelten Anteils infizierter Zellen in dieser Versuchsreihe erscheint das jedoch wenig wahrscheinlich. Es muss eher von einer Anlagerung des GRA7 von außen ausgegangen werden. Als Quelle hierfür könnte von den Toxoplasmen sezerniertes GRA7 dienen.

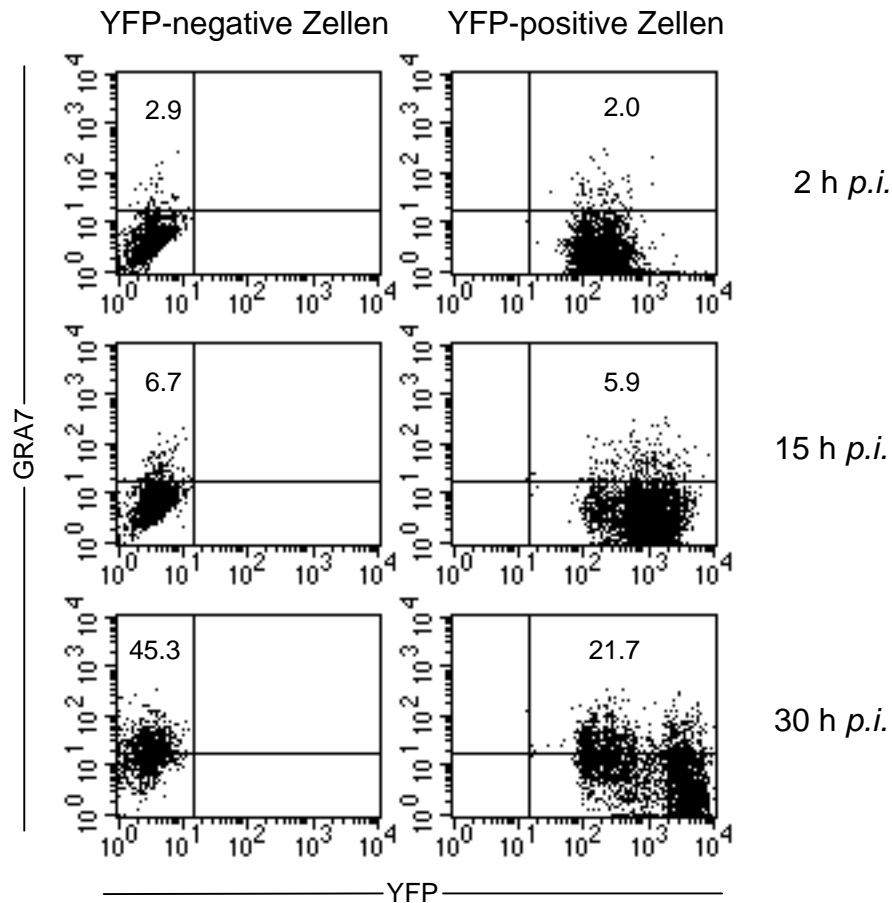


Abb. 6 Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 zu verschiedenen Zeiten nach Infektion

HS27-Fibroblasten wurden mit YFP-RH Tachyzoiten (MOI=30) pulsinfiziert und 2 h, 15 h bzw. 30 h später mit anti-GRA7 mAk 5-241-178 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG gefärbt und im FACS analysiert. Die parallel dazu durchgeführte Färbung mit anti-Vimentin mAk zeigt <4% positive Zellen. Die Kontrolle mit uninfizierten Zellkulturen zeigte keine Markierung mit anti-GRA7 mAk. Pro Probe wurden 10.000 Zellen basierend auf FSC und SSC unter Ausschluss PI-positiver Zellen gemessen. Gezeigt ist eine repräsentative FACS-Analyse von 2 unabhängigen Experimenten. Parallel dazu wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt 3 Objektträger zur Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen angefertigt. Pro Objektträger wurden 100 Zellen ausgezählt.

4.1.4 Untersuchung von extrazellulär sezerniertem GRA7 und extrazellulären Toxoplasmen als exogene GRA7 Quelle

Es ist gezeigt, dass sekretorische *T. gondii* Proteine an die Wirtszelloberfläche binden können (Fourmaux *et al.*, 1996; Garcia-Réguet *et al.*, 2000). Die Detektion von oberflächenassoziiertem GRA7 auf YFP-negativen Zellen (4.1.3) warf die Frage auf, ob exogenes GRA7 an der Zelloberfläche adhärieren kann. Als Quelle für exogenes GRA7 wurde *T. gondii*-konditioniertes Medium (TgKM) aus der zweifachen der normalerweise zur Infektion benutzten Parasitenkonzentration präpariert. Mittels Western Blot wurde bestätigt, dass TgKM GRA7 enthält (Abb. 7A). Sowohl in TgKM als auch in *T. gondii* Tachyzoiten konnte die GRA7 Bande bei 29 kDa detektiert werden, während sich in den Wirtszellen kein GRA7-Signal zeigte. Anschließend wurden uninfizierte HS27 mit dem TgKM für 12 h inkubiert und im FACS auf oberflächenassoziiertes GRA7 untersucht. Es waren keine GRA7-positiven Zellen nachweisbar (Abb. 7B), d.h. GRA7, das von extrazellulären Toxoplasmen sezerniert wird, adhärert nicht an die Oberfläche uninfizierter Zellen.

Eine andere mögliche Quelle für exogenes GRA7 stellen Toxoplasmen dar, die in geringem Maß während der Versuchsdauer (Zellernte, FACS-Färbung) aus den Wirtszellen frei werden. Deshalb wurde geprüft, ob Toxoplasmen, die zu Beginn der FACS-Färbung zu nicht infizierten Fibroblasten zugesetzt werden, ein GRA7-Signal auf der Zelloberfläche hervorrufen (Abb. 7B). Es wurden 3,4% GRA7-positive Zellen in der nachfolgenden FACS-Analyse gemessen.

Freie Toxoplasmen können somit als exogene GRA7-Quelle dienen. Jedoch fand sich nur ein geringer Prozentsatz GRA7-positiver Zellen bei Verwendung der doppelten Infektionsdosis. In den mikroskopischen Kontrollen fanden sich keine größeren Mengen freie Parasiten in den Versuchsansätzen, so dass es unwahrscheinlicher erscheint, dass die GRA7-Positivität allein durch freie Toxoplasmen verursacht wird. Jedoch zeigte sich bei der Markierung mit PI ein großer Anteil toter Zellen (Abb. 4). Möglicherweise wird GRA7 in relevantem Maße aus den toten, permeablen Wirtszellen frei und lagert sich an die Oberfläche uninfizierter und infizierter Zellen an (4.1.3).

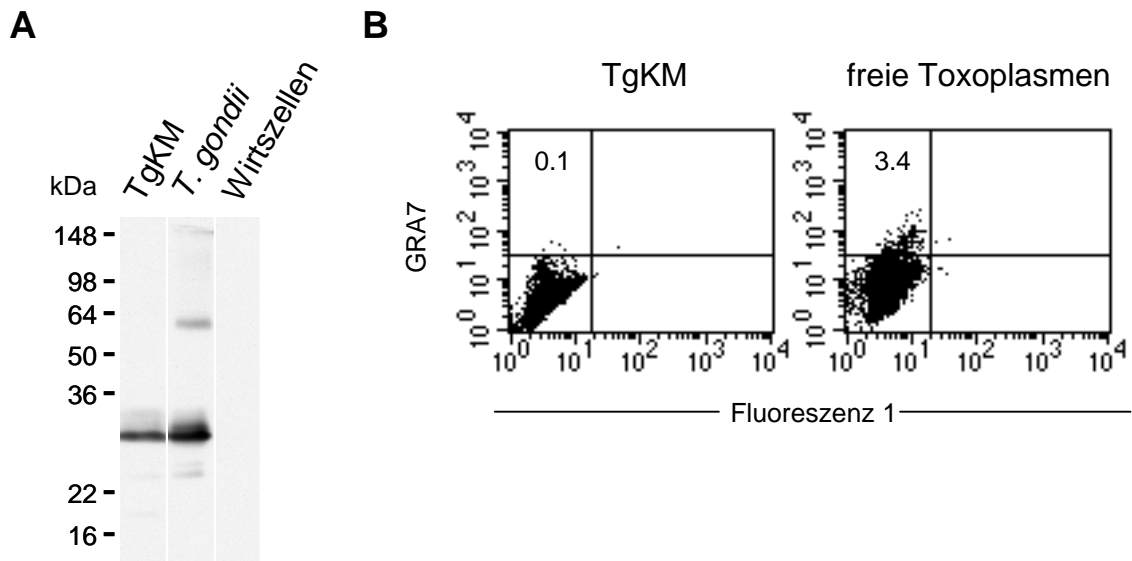


Abb. 7 Sezerniertes GRA7 bindet nicht an uninferierte Wirtszellen, freie Toxoplasmen können als exogene Quelle dienen

A TgKM aus 80fach (MOI=80) aBK Tachyzoiten, aBK Tachyzoiten (*T. gondii*) und Fibroblasten (Wirtszellen) wurden unter reduzierenden Bedingungen in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot mit anti-GRA7 mAk 5-241-178 wurden sie auf GRA7 getestet.

B HS27 wurden mit dem im Western Blot getesteten TgKM 12 h inkubiert bzw. nach der Ernte wurden den Fibroblasten 80fach (MOI=80) freie Toxoplasmen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit anti-GRA7 mAk 5-241-178 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG markiert und 10.000 pro Probe basierend auf FSC und SSC unter Ausschluss PI-positiver Zellen im FACS gemessen. Der Quadrant wurde nach der Isotypkontrolle gesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.5 Kein Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 durch Biotinylierung der Zellmembranproteine infizierter Kulturen

Es wurde eine alternative Messstrecke für den Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 getestet, bei der die Freisetzung von Toxoplasmen aus den infizierten Wirtszellen bzw. die Anlagerung von Parasitenproteinen aus permeablen, toten Wirtszellen während des Versuches vermieden wird. Die Markierung der Oberflächenproteine erfolgt hier am intakten Wirtszellrasen direkt zu Beginn des Versuches und ist damit während des Versuchsablaufes fixiert. Beim FACS dagegen wurden die Wirtszellen vor der Färbung geerntet, filtriert und mehrfach zentrifugiert, so dass es bis zur Markierung des oberflächlichen GRA7 möglich war, dass sich versuchsbedingt GRA7 extrazellulärer Toxoplasmen bzw. aus toten, infizierten Fibroblasten von außen anlagern konnte.

Es wurden die Zelloberflächenproteine des intakten Wirtszellrasens 20 h nach Pulsinfektion mit *T. gondii* biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-konjugierten magnetischen ‚beads‘ immunpräzipitiert. Im Gesamtlysat biotinylierter Fibroblasten wurden durch Western Blot-Analyse mit Streptavidin-HRP hochmolekulare biotinylierte Proteine detektiert (Abb. 8A), während im Kontrolllysat nicht biotinylierter Fibroblasten kein Signal auftauchte. Abb. 8B zeigt die Ergebnisse des Western Blots mit anti-GRA7 mAk 5-241-178 von Durchlauf und Eluat. In beiden Durchläufen ließ sich GRA7 detektieren. Es fand sich eine Bande bei 32 und bei 36 kDa. Dabei handelt es sich um GRA7-Isoformen mit höherem Molekulargewicht, die in infizierten Wirtszellen beschrieben sind (Neudeck *et al.*, 2002). Im Eluat, das die mit Streptavidin präzipitierten Proteine enthält, ließ sich kein GRA7 nachweisen. In der parallel dazu durchgeführten FACS-Analyse der infizierten Zellen wurde bei 10% der Zellen oberflächenassoziiertes GRA7 gemessen (ohne Abb.). Es ist möglich, dass der GRA7-Anteil an den biotinylierten Gesamtoberflächenproteinen zu gering ist und somit nicht mit dieser Methode detektiert werden konnte. Eine Detektion des oberflächenassoziierten GRA7 durch Biotinylierung wäre auch nicht möglich, wenn eine Anlagerung des GRA7 von außen unter den harschen Versuchsbedingungen des FACS erfolgt.

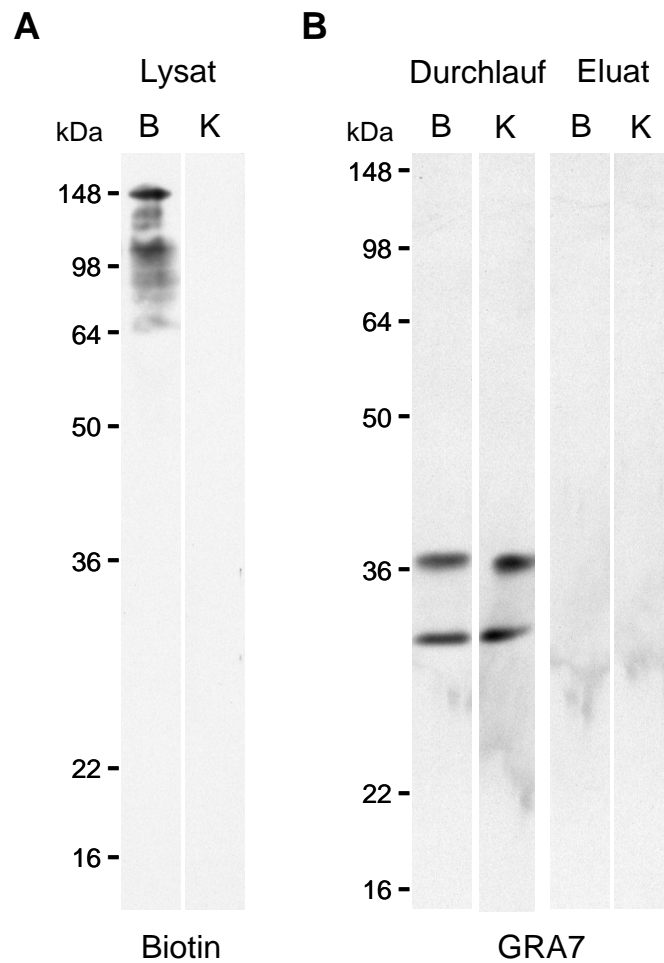


Abb. 8 Kein Nachweis von GRA7 in der Fraktion biotinylierter Zelloberflächenproteine

HS27-Fibroblasten wurden 20 h nach Pulsinfektion mit aBK Tachyzoiten (MOI=40) mit Sulfo-NHS-Biotin (B) bzw. als Negativkontrolle mit PBS (K) inkubiert. Nach der Ernte mit Lysepuffer wurde das Lysat mit Streptavidin MicroBeads markiert und über eine •MACS-Säule, die durch Magnetismus die an MicroBeads gebundenen biotinylierten Oberflächenproteine festhält, aufgereinigt. Eluat, das die mit SDS-Probenpuffer eluierten biotinylierten Oberflächenproteine enthält und Durchlauf wurden aufgefangen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. In der parallel durchgeführten FACS-Analyse waren 10% der Zellen GRA7-positiv (ohne Abb.).

A Gesamtlisat der biotinylierten und Kontrollfibroblasten wurde im Western Blot mit Streptavidin-HRP getestet.

B Das Eluat und der Durchlauf der Kontrollzellen sowie der biotinylierten Zellen wurden im Western Blot mit anti-GRA7 mAk 5-241-178 getestet.

4.2 Spontane Präsentation von *T. gondii*-Antigen durch Dendritische Zellen aus dem Hirn chronisch infizierter Mäuse

Mit dem GRA7-Export wurde ein möglicher Weg, wie dem Immunsystem während der chronischen Phase der Infektion parasitäres Antigen zugänglich werden könnte, untersucht. Nun sollte der Umgang des Immunsystems mit dem Antigen charakterisiert werden. Dabei sollte besonders die Rolle der Dendritischen Zellen (DC) im chronisch mit *T. gondii* infizierten Hirn genauer untersucht werden. Bei einer Toxoplasma-Enzephalitis lassen sich aus dem Hirn reife, funktionell aktive DC isolieren, die naive, allogene T-Zellen aktivieren können (Fischer *et al.*, 2000). Ob DC im Hirn auch *Toxoplasma*-Antigen präsentieren, ist bislang unbekannt. Deshalb wurde hier die Antigenpräsentation von aus dem chronisch infizierten Hirn isolierten DC gegenüber *T. gondii*-spezifischen T-Zellen geprüft.

4.2.1 Hirn-DC stimulieren *T. gondii*-spezifische CD4⁺ T-Zellen zur Proliferation und IFN γ -Sekretion

Zur Gewinnung der Hirn-DC wurden intrazerebrale Leukozyten (ICL) aus dem Hirn präpariert und aus dieser Zellpopulation CD11c⁺ Zellen mittels MACS isoliert. Alle DC der Maus exprimieren diesen Oberflächenmarker und können darüber aufgereinigt werden. Es wurde aus chronisch infizierten Mäusen eine größere Zahl ICL und CD11c⁺ Zellen gewonnen als aus naiven Mäusen (Abb. 9). Der Präparationszeitpunkt wurde so gewählt, weil die Zahl der Hirn-DC 5-6 Wochen *p.i.* am höchsten ist (Fischer *et al.*, 2000). Um die Reinheit der gewonnenen Hirn-DC zu prüfen, wurde die Expression des pan-DC-Markers CD11c untersucht. Die FACS-Analyse zeigte, dass >85% der Zellen CD11c⁺ sind (Abb. 10).

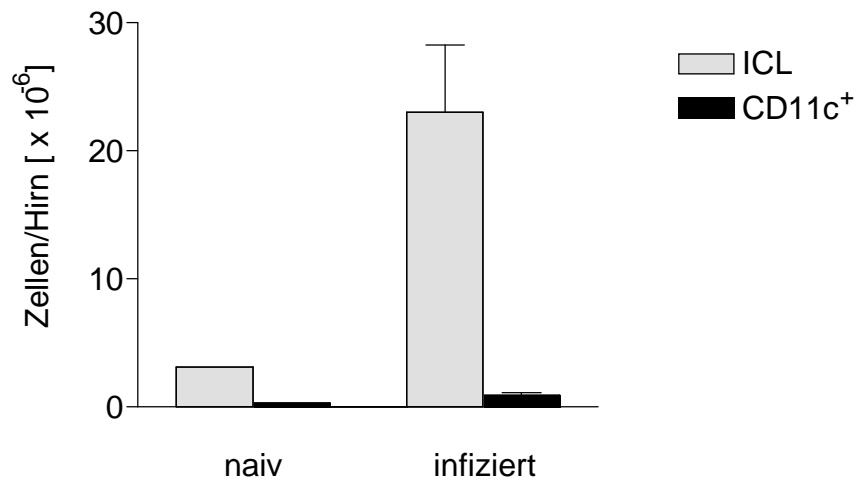


Abb. 9 Anteil der CD11c⁺ Zellen an der intrazerebralen Leukozyten-Population

Intrazerebrale Leukozyten (ICL) wurden aus naiven (n = 10) und aus chronisch mit *T. gondii* infizierten (B10xC3H)F₁-Mäusen (n = 3-5) präpariert. Aus den ICL der uninfizierten Mäuse wurden direkt und aus den ICL der infizierten Mäuse wurden nach T-Zelldepletion CD11c⁺ Zellen mittels MACS isoliert. Die Daten für die infizierten Mäuse sind Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Experimenten.

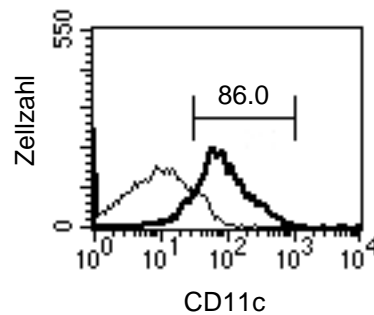


Abb. 10 Reinheit der Hirn-DC nach MACS-Aufreinigung

Aus chronisch mit *T. gondii* infizierten (B10xC3H)F₁-Mäusen wurden 5 Wochen *p.i.* ICL präpariert und anschließend CD11c⁺ Zellen mittels MACS gewonnen. Nach Blocken der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit biotinyliertem anti-CD11c mAk (dickes Histogramm) bzw. einem Isotypkontroll-mAk (dünnes Histogramm) inkubiert und mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin markiert. Im FACS wurde die Expression von CD11c auf der Oberfläche der Zellen untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Analyse aus vier unabhängigen Experimenten.

In weiteren Experimenten wurden Hirn-DC als APC für *T. gondii*-spezifische CD4⁺ T-Zellen getestet. Die T-Zellklone 3Tx15 und 3TxS wurden dabei als Modell-T-Zellen eingesetzt. Als Referenz-APC dienten CD11c⁺ Milz-DC aus naiven Mäusen. Beide DC-Populationen wurden als APC in Gegenwart oder Abwesenheit von *T. gondii*-Lysat (TL) als exogenem Antigen eingesetzt. Allen Kulturansätzen wurde Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P) zugegeben, das über die Hemmung der parasitären Folsäuresynthese toxoplasmastatisch wirkt. Damit sollte eine Vermehrung von möglicherweise in der Hirn-DC-Population enthaltenen Toxoplasmen unterdrückt werden, um den *in vivo* Antigengehalt der Hirn-DC für die Stimulation *ex vivo* zu konservieren. Wie in Abb. 11 gezeigt, präsentierten beide DC-Populationen exogenes *Toxoplasma*-Antigen für die beiden T-Zellklone. In Abwesenheit von exogenem Antigen, waren jedoch nur DC aus dem infizierten Hirn in der Lage, die *T. gondii*-spezifischen T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Dabei zeigte der Klon 3TxS ein stärkeres Wachstum als der Klon 3Tx15. Die Milz-DC wiesen in Abwesenheit von Antigen keine stimulatorische Aktivität auf. Hirn-DC aus nicht infizierten, naiven Mäusen zeigen ebenfalls keine stimulatorische Aktivität für *Toxoplasma*-spezifische T-Zellen in Abwesenheit von exogenem Antigen (Abb. 12A). Als alternative Messstrecke zum Nachweis der Antigenpräsentation durch Hirn-DC wurde die Sekretion von IFN• bestimmt. Als typische T_H1-Zellen produzieren beide T-Zellklone das Zytokin nach antigenabhängiger Stimulation. In Abwesenheit von exogenem Antigen waren ausschließlich Hirn-DC aus infizierten Mäusen in der Lage, die beiden T-Zellklone zur IFN•-Produktion zu aktivieren, während in den Kulturen mit Kontroll-DC kein IFN• gemessen werden konnte (Abb. 11).

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass aus dem chronisch mit *T. gondii* infizierten Hirn isolierte DC ohne Zugabe von exogenem Antigen *ex vivo* *Toxoplasma*-spezifische T-Zellen stimulieren können.

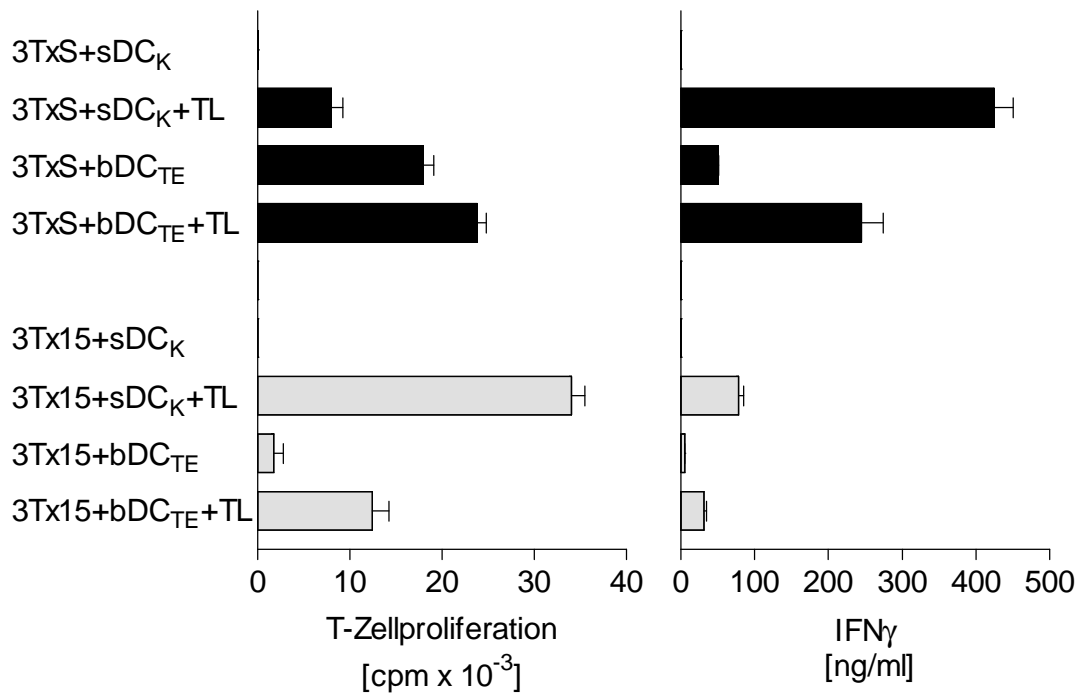


Abb. 11 Spontane Stimulation *T. gondii*-spezifischer T-Zellen durch frisch *ex vivo* aus dem infizierten Hirn isolierte DC

CD11c⁺ Zellen wurden mittels MACS aus der Milz naiver (B10xC3H)F₁-Mäuse (sDC_K) bzw. aus T-zelldepletierten ICL aus chronisch mit *T. gondii* infizierten (B10xC3H)F₁-Mäusen 6 Wochen *p.i.* (bDC_{TE}) aufgereinigt. Beide mit 10 Gy bestrahlten DC-Populationen wurden mit 2 x 10⁴ Zellen pro well vergleichend als APC gegenüber den syngen CD4⁺ T-Zellklonen 3TxS und 3Tx15 (10⁴/well) getestet. Alle wells enthielten S/P in einer Endkonzentration von 1:20.000. Die T-Zellproliferation in An- oder Abwesenheit von TL (10 • g/ml) als Kontrollantigen wurde über den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Die IFN•-Sekretion der CD4⁺ T-Zellklone wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA in den Zellüberständen gemessen. Die Überstände wurden nach 48 h dauernder Kokultur abgenommen. Kontrollansätze mit T-Zellen bzw. APC alleine ergaben <100 cpm bzw. Werte unter dem nachweisbaren Minimum des ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus dreifachen Kulturansätzen.

4.2.2 Die spontane Stimulation *T. gondii*-spezifischer T-Zellen verläuft MHC-restringiert

Es wurde nun untersucht, ob die Aktivierung der *Toxoplasma*-spezifischen T-Zellen durch frisch *ex vivo* aus dem chronisch infizierten Hirn gewonnene DC antigenspezifisch erfolgt. Dazu sollte durch Verwendung eines anti-MHCII mAk die spezifische Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Antigen-MHCII-Komplex blockiert und damit die antigenabhängige T-Zellaktivierung verhindert werden. Es wurde ein Antikörper gegen I-A.^k eingesetzt, da der T-Zellklon 3TxS Antigen zusammen mit dem MHC-Klasse II-Restriktionselement I-A.^bA.^k erkennt, das von den APC aus (B10xC3H)F₁-Mäusen exprimiert wird. In Gegenwart des Antikörpers wurde die T-

Zellproliferation, die durch Hirn-DC aus Mäusen mit chronischer Toxoplasmose stimuliert wurde, gehemmt (Abb. 12A). Ebenso war auch die IFN γ -Sekretion des T-Zellklons 3TxS in Gegenwart des anti-MHCII Antikörpers stark reduziert.

Um sicher zu stellen, dass die Hemmung durch den anti-MHCII mAk spezifisch erfolgt, wurden 3TxS T-Zellen alternativ nicht über TCR/MHCIIAG sondern über anti-CD3 stimuliert mit Milzzellen aus uninfizierten Mäusen in Kokultur genommen (Abb. 12B). Zur Stimulation wurde entweder TL oder ein Antikörper gegen die ϵ -Kette des CD3-Komplexes eingesetzt. In beiden Fällen erfolgt der Signalweg auf verschiedene Art. Während das Parasitenantigen von der T-Zelle im Komplex mit dem MHCII-Molekül auf der APC erkannt wird, aktiviert der anti-CD3 ϵ mAk die T-Zellen direkt über Quervernetzungen mehrerer CD3-Komplexe. Damit ist hier die T-Zellaktivierung unabhängig von der Erkennung des MHCII-Antigen-Komplexes. Wie aus Abb. 10B ersichtlich, hemmte der verwendete anti-MHCII mAk nur die antigeninduzierte T-Zellproliferation, während die Aktivierung über den CD3-Komplex unbeeinflusst blieb. Dies bedeutet, dass die Reduktion der T-Zellaktivierung durch akut isolierte Hirn-DC in Gegenwart des anti-MHCII mAk auf einer spezifischen Blockade der TCR-MHCII-Ag-Interaktion und nicht auf einer unspezifischen toxischen Wirkung der eingesetzten Ak-Charge beruht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hirn-DC aus chronisch infizierten Mäusen *ex vivo* ein im Hirn während der Infektion vorhandenes Parasitenantigen präsentieren und damit den *T. gondii*-spezifischen T-Zellklon 3TxS antigenspezifisch und MHC-restringiert stimulieren.

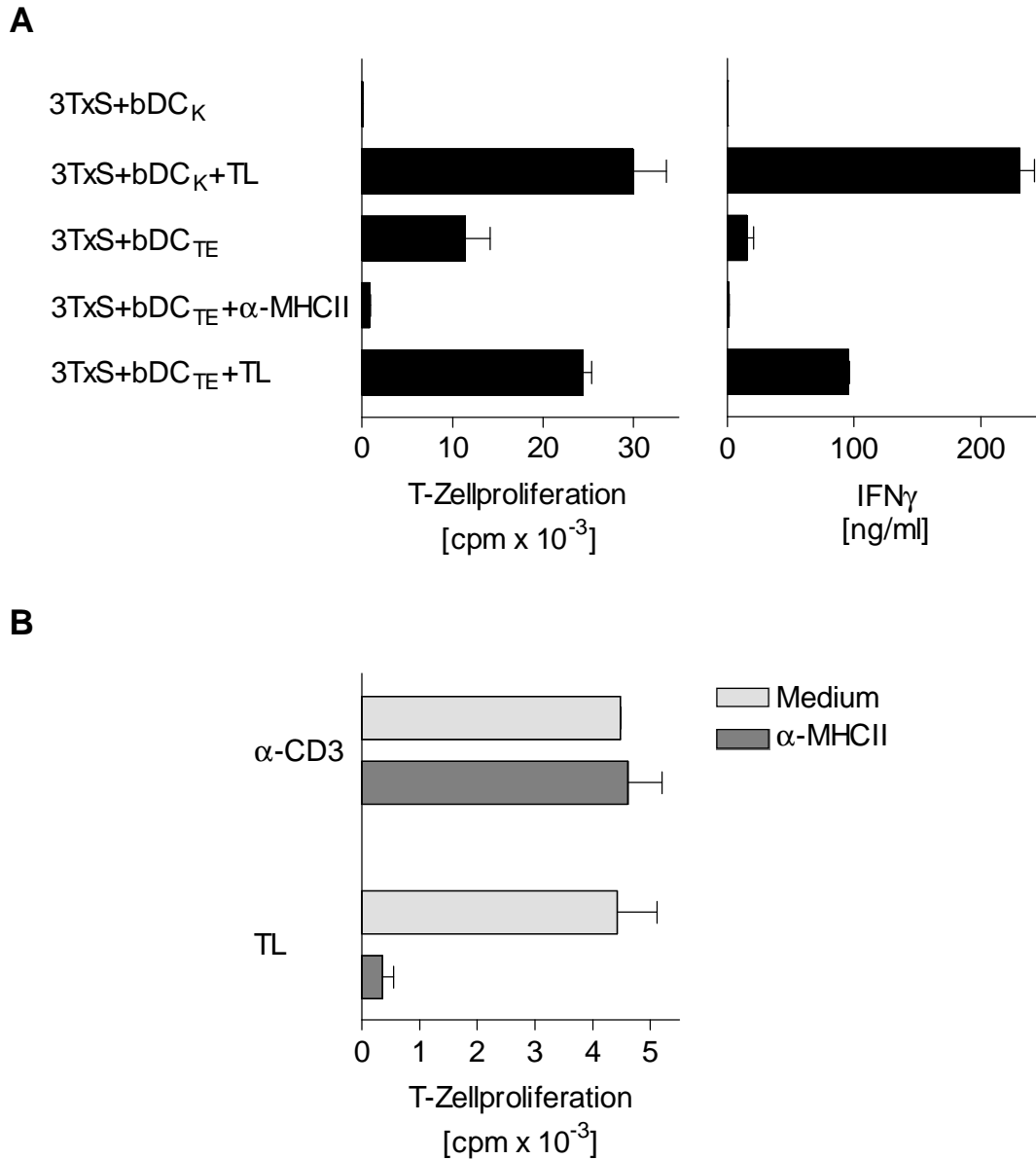


Abb. 12 Die T-Zellstimulation durch DC aus dem infizierten Hirn verläuft MHCII-restringiert

A CD11c⁺ Zellen wurden aus ICL naiver (B10xC3H)F₁-Mäuse (bDC_K) bzw. chronisch infizierter Tiere (bDC_{TE}) mittels MACS isoliert und als 10 Gy bestrahlte APC (2×10^4 /well) gegenüber dem T-Zellklon 3TxS (10^4 /well) getestet. Die T-Zellproliferation in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μ g/ml TL als Kontrollantigen wurde über den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Kontrollansätze nur mit T-Zellen oder DC zeigten eine Hintergrundproliferation von <100 cpm. Die IFN γ -Konzentration in den Zellüberständen nach 48 h Kultur wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Der anti-MHCII Antikörper (α -MHCII) wurde 1:50 verdünnt eingesetzt. DC und T-Zellen allein zeigten Werte unter dem nachweisbaren Minimum des ELISA. Allen Stimulationsansätzen wurde Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P) in einer Verdünnung von 1:20.000 zugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD von jeweils drei Ansätzen.

B T-Zellen des Klones 3TxS wurden mit bestrahlten Milzzellen aus naiven (B10xC3H)F₁-Mäusen unter Zugabe von TL (0,1 μ g/ml) oder einem anti-CD3 mAk (α -CD3) kokultiviert. Der anti-CD3 mAk wurde zuvor für 4 h bei 37°C mit 1 μ g/well an eine Mikrotiterplatte angelagert. Es wurde die T-Zellproliferation in Gegenwart (α -MHCII) oder Abwesenheit (Medium) des anti-MHCII mAk (1:50) gemessen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD aus zwei Parallelansätzen.

4.2.3 Hirn-DC scheinen nicht infiziert zu sein

Die Präsentation von Parasitenantigenen durch frisch *ex vivo* isolierte Hirn-DC warf die Frage nach dem Ursprung der Antigene auf. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Hirn-DC infiziert sind. Um zu überprüfen, ob die Hirn-DC intakte Toxoplasmen enthalten, wurden CD11c⁺ ICL aus chronisch mit *T. gondii* infizierten Mäusen in einem *T. gondii*-Proliferationstest untersucht (Abb. 13A). Als Referenzen wurden CD11c⁺ Milzzellen aus naiven Mäusen, uninfizierte HS27-Fibroblasten sowie mit Bradyzoiten bzw. mit Tachyzoiten infizierte HS27-Zellen getestet. Es wurde eine niedrige Infektionsdosis für die Referenzwirtszellen und eine lange Inkubationszeit für den Test gewählt, um auch eine minimale Infektion der Hirn-DC detektieren zu können. In Hirn-DC war eine geringe *Toxoplasma*-Proliferation messbar (Abb. 13A). Sie war niedriger als die Proliferation, die in den mit Bradyzoiten infizierten HS27-Zellen messbar war, lag aber dennoch signifikant über der Hintergrundproliferation der nicht infizierten Milz-DC und HS27-Fibroblasten. Eine deutlich stärkere Proliferation konnte in der Positivkontrolle, den mit schnell wachsenden Tachyzoiten infizierten HS27-Fibroblasten, festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hirn-DC mit Bradyzoiten infiziert sind.

Um dies genauer zu analysieren, wurden die CD11c⁺ ICL aus chronisch infizierten Mäusen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auf GRA7 und Bradyzoiten-Antigen 4F8 untersucht (Abb. 13B). Dabei konnten extrazelluläre *T. gondii*-Zysten detektiert werden, die mit beiden Antikörpern markiert wurden. Die Hirn-DC selbst zeigten keine Fluoreszenzmarkierung, und im Phasenkontrast fanden sich keine intrazellulären Parasiten. Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass sich in der Hirn-DC Präparation *T. gondii* Zysten befanden, während die Hirn-DC selbst uninfiziert waren.

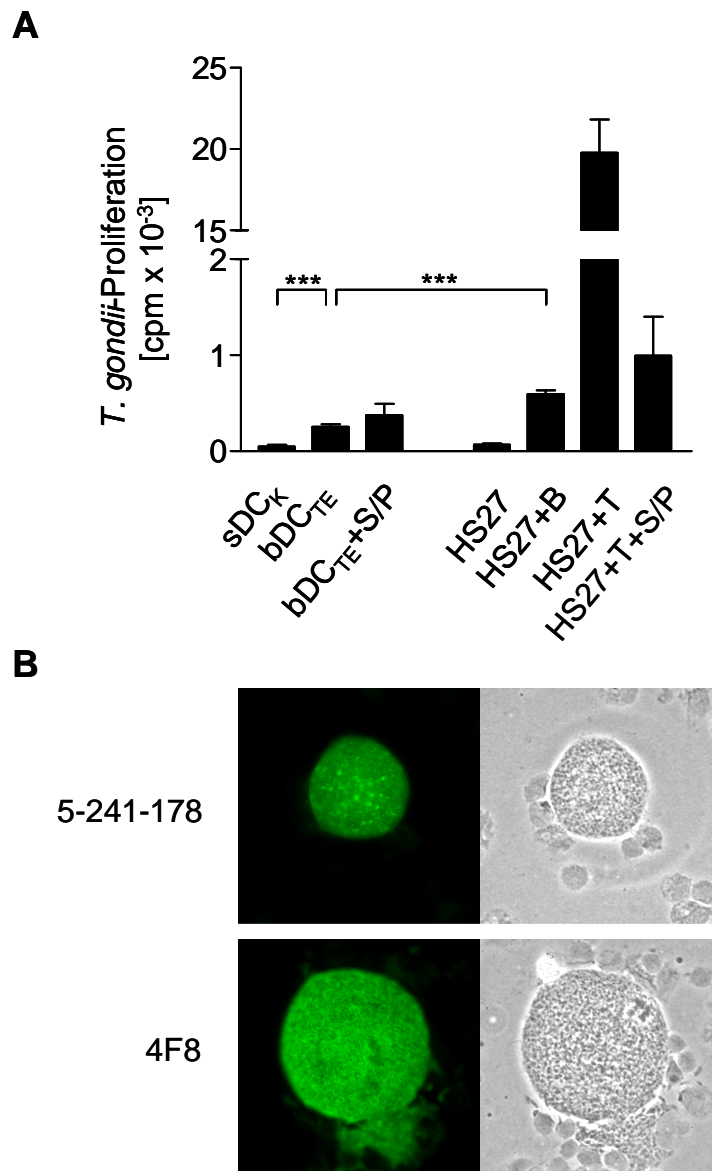


Abb. 13 Infektionsstatus der aus dem Hirn isolierten DC

A Aus infizierten (B10xC3H)F₁-Mäusen wurden 6 Wochen *p.i.* CD11c⁺ Zellen (bDC_{TE}) isoliert und im Vergleich zu CD11c⁺ Milzzellen aus naiven Mäusen (sDC_K) auf *T. gondii*-Proliferation getestet. Als Kontrollzellen wurden uninfizierte Fibroblasten (HS27) sowie mit Bradyzoiten (MOI=0,3) (HS27+B) bzw. mit Tachyzoiten (MOI=0,3) (HS27+T) infizierte Fibroblasten eingesetzt. Alle Zellen wurden in einer Konzentration von 10⁵ pro well ausgesät. Nach 48 h wurden die Kulturen mit ³H-Uracil markiert und nach weiteren 90 h wurde die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* über den Einbau von ³H-Uracil bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD von jeweils drei Ansätzen. Die Signifikanzen wurden mit dem ‚students t-test‘ beurteilt (***: p<0,0001).

B Die CD11c⁺ Hirnzellen aus infizierten Mäusen wurden mittels Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht und mit anti-GRA7 mAk (5-241-178) bzw. anti-Bradyzoiten mAk (4F8) markiert. Der Nachweis erfolgte über FITC-konjugierte anti-Maus IgG+IgM Antikörper im Fluoreszenzmikroskop (links) und im Phasenkontrast (rechts) bei 40facher Vergrößerung. Die Ergebnisse zeigen repräsentative Befunde. Die Kontrollpräparate mit CD11c⁺ Zellen aus naiven Mäusen und Färbung der CD11c⁺ Zellen aus infizierten Tieren mit Isotypkontroll-mAk zeigten nur geringe Hintergrundfluoreszenz.

4.2.4 Zysten können als Antigenquelle dienen

Es sollte geprüft werden, inwieweit die in der Hirn-DC-Präparation gefundenen *T. gondii*-Zysten das Antigen für die *T. gondii*-spezifischen T-Zellen liefern. Dazu sollte zunächst getestet werden, ob der T-Zellklon 3TxS reaktiv für native Zysten ist. Deshalb wurde die Proliferation des T-Zellklons in Kokultur mit Milz-DC aus uninfizierten Mäusen als APC und *T. gondii*-Zysten als Antigen gemessen (Abb. 14). Als Referenz dienten Ansätze mit *T. gondii*-Lysat (TL) aus Tachyzoiten als Antigen. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit nativen *T. gondii*-Zysten eine T-Zellproliferation induzieren lässt. Die optimale T-Zellproliferation zeigte sich dabei mit 50 Zysten/well. Jedoch war die Höhe der Proliferation immer noch deutlich geringer als die optimale T-Zellproliferation mit 0,2 • g/ml TL. Bis zu 6 Zysten/well induzierten noch eine T-Zellproliferation, die signifikant über der Hintergrundproliferation lag.

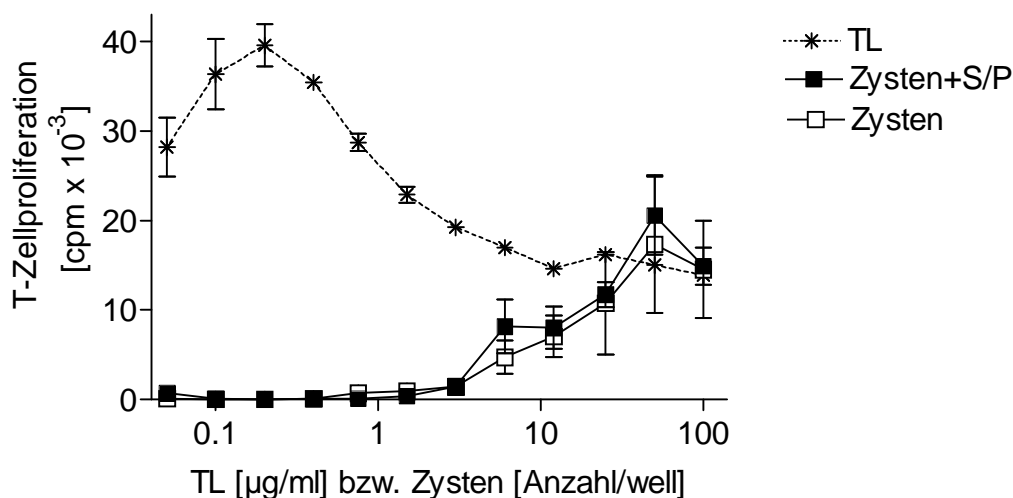


Abb. 14 Freie *T. gondii*-Zysten dienen als Antigenquelle für den T-Zellklon 3TxS

Der T-Zellklon 3TxS (10^4 /well) wurde in einem Proliferationstest mit verschiedenen Konzentrationen von TL und Zysten ohne bzw. mit S/P (1:20.000) getestet. Die Zysten wurden aus chronisch mit Dx infizierten BALB/c Mäusen gewonnen. Als APC dienten bestrahlte $CD11c^+$ Milzzellen aus naiven Mäusen (2×10^4 /well). Die T-Zellproliferation wurde über den Einbau von 3H -Thymidin gemessen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD aus 2 Parallelansätzen.

Um auszuschließen, dass die die Hirn-DC-Präparation kontaminierenden Zysten *ex vivo* als Antigenquelle dienen, wurde versucht eine zystenfreie DC-Präparation zu gewinnen. Dazu wurden aus ICL chronisch infizierter Mäuse $CD11c^+/CD11b^+$ Zellen

mittels FACS-Sortierung isoliert. Abb. 15 zeigt die Effizienz dieser Aufreinigung. In der ICL-Ausgangspopulation waren 23,3% der Zellen doppelt-positiv für die beiden Oberflächenmoleküle. Nach der durchflusszytometrischen Sortierung konnten 69% doppelt-positive Zellen detektiert werden. Die so gewonnenen Hirn-DC wurden vergleichend zu CD11c⁺ Hirn-DC, die mittels MACS aufgereinigt waren, als APC in einem Proliferationstest mit dem T-Zellklon 3TxS getestet (Abb. 16A). Beide DC-Populationen waren in der Lage den T-Zellklon zu stimulieren, und diese Stimulation konnte mit anti-MHCII mAk gehemmt werden. Die durch MACS-gereinigte Hirn-DC induzierte T-Zellproliferation war etwas höher. Um zu untersuchen, ob diese Hirn-DC-Präparation mehr Zysten enthält, wurden beide DC-Präparationen mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert und mit Diff-Quik gefärbt. Unter dem Mikroskop konnten die Zysten aufgrund ihrer typischen Struktur ausgezählt werden. Der Anteil der kontaminierenden Zysten war in den beiden DC-Präparationen vergleichbar (Abb. 16B). Es fiel jedoch auf, dass die FACS-sortierten Zellen kleinere Zysten enthielten (ohne Abb.). MACS-gereinigte Hirn-DC enthielten durchschnittlich $6 \pm 1,4$ Zysten pro 5×10^4 Zellen. In den T-Zellproliferationstests wurden 2×10^4 Hirn-DC eingesetzt. Damit lässt sich eine Zystenzahl von circa 3 Zysten pro well vermuten. Wie in Abb. 14 gezeigt, fand sich erst ab 6 Zysten pro well eine signifikante T-Zellproliferation. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Stimulation des *T. gondii*-spezifischen T-Zellklon 3TxS ohne Zugabe von exogenem Antigen durch DC aus dem chronisch infizierten Hirn (Abb. 12A) nicht allein durch die kontaminierenden Zysten erklärbar ist.

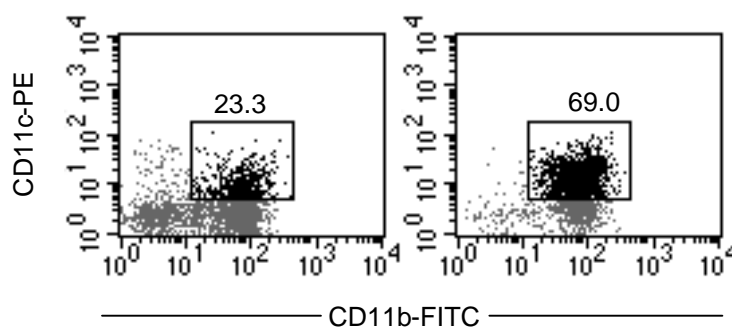


Abb. 15 Anreicherung von Hirn-DC durch FACS-Sortierung

Aus ICL chronisch mit *T. gondii* infizierter (B10xC3H)F₁-Mäuse (6 Wochen *p.i.*) wurden nach T-Zelldepletion und Blocken der Fc-Rezeptoren Hirn-DC über markierte CD11c und CD11b Oberflächenmoleküle mittels FACS-sort positiv selektioniert. Dargestellt ist die FACS-Analyse der Zellpopulation vor (links) und nach der Sortierung (rechts). Als Negativprobe diente die ungefärbte Ausgangspopulation, nach der auch der Quadrant gesetzt wurde.

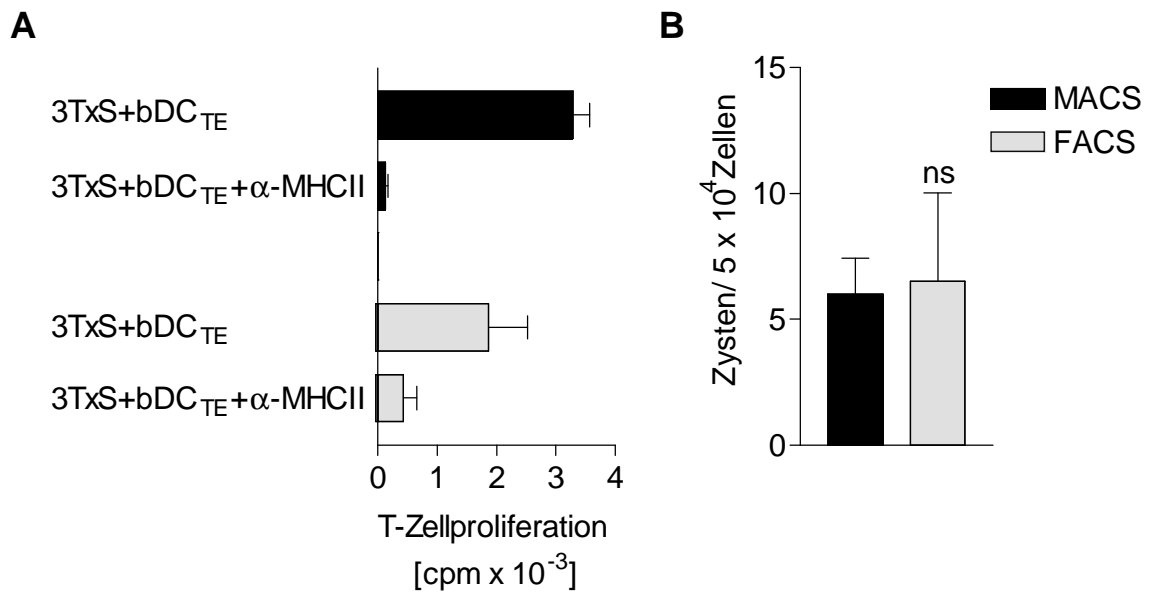


Abb. 16 MACS-aufgereinigte und FACS-sortierte zystenhaltige Hirn-DC-Populationen stimulieren den T-Zellklon 3TxS

A CD11c⁺ Zellen wurden nach T-Zelldepletion aus intrazerebralen Leukozyten chronisch mit *T. gondii* infizierter Tiere (bDC_{TE}) mittels MACS isoliert (MACS) bzw. durch FACS-Sortierung gewonnen (FACS). Die beiden DC-Populationen wurden mit 10 Gy bestrahlt und als APC (2 x 10⁴/well) gegenüber dem T-Zellklon 3TxS (10⁴/well) eingesetzt. Die T-Zellproliferation in Gegenwart oder Abwesenheit von anti-MHCII Antikörper (•-MHCII) wurde über den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Allen Stimulationsansätzen wurde S/P bis zu einer Endkonzentration von 1:20.000 im well zugegeben. Kontrollen nur mit T-Zellen oder DC zeigten eine Hintergrundproliferation von <100 cpm. In Ansätzen mit Milz-DC aus uninfizierten Mäusen und T-Zellen wurden ebenfalls Werte <100 cpm gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Stimulationsansätzen.

B MACS-aufgereinigte und FACS-sortierte Hirn-DC wurden mittels Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht und Diff-Quik gefärbt. Die Anzahl von Zysten pro 5 x 10⁴ Zellen wurde unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte ± SD von je 2 Objektträgern. Die Signifikanz wurde mit dem ‚students t-test‘ berechnet. ns: p>0,05

5 DISKUSSION

5.1 GRA7-Export in *Toxoplasma*-infizierten Fibroblasten

5.1.1 Exportweg

Das *Toxoplasma*-Protein GRA7 ist in den parasitären ‚dense granules‘ lokalisiert und assoziiert nach Sekretion in die PV mit dem intravakuolären Membrannetzwerk und der PV-Membran (Fischer *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 1998). Darüber hinaus zeigen verschiedene Befunde eine Lokalisation von GRA7 außerhalb des parasitären Kompartiments auf: So wurde GRA7 immunfluoreszenzmikroskopisch an filamentösen von der Zystenwand bzw. PVM ins Wirtszellzytoplasma ziehenden Strukturen nachgewiesen (Fischer *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998). Mittels Immunelektronenmikroskopie wurde GRA7 an filamentären Strukturen, die von der PV ins Wirtszellzytoplasma und zur Wirtszellmembran ziehen, detektiert (Bonhomme *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde GRA7 im Überstand zystentragender Hirnzellen nachgewiesen (Fischer *et al.*, 1998). An Hirnschnitten *ex vivo* konnte GRA7 in der Zystenwand und im Wirtszellzytoplasma angefärbt werden (Ferguson *et al.*, 1999). Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass GRA7 aus der PV heraus exportiert wird. Da GRA7 ein Transmembranprotein ist, ist davon auszugehen, dass der postulierte Transport membrangebunden stattfindet.

Obwohl für *T. gondii* bislang noch nicht beschrieben, findet ein Export von Parasitenproteinen ins Zytoplasma und an die Wirtszellmembran bei dem mit *T. gondii* verwandten *Apicomplexa Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) statt (Trelka *et al.*, 2000, Übersicht in: Marti *et al.*, 2005). Nach der Invasion von Erythrozyten setzt eine Umstrukturierung der Wirtszelle durch den Transport von Parasitenproteinen in die Wirtszelle ein. *Plasmodium* initiiert die Ausbildung von Membranstrukturen in den normalerweise endomembranfreien Erythrozyten. Dazu gehört die intraerythrozytäre Entwicklung eines tubulovesikulären Netzwerkes mit Verbindung zur PVM und den so genannten ‚Maurer´s clefts‘, hüllenartiger Membranstrukturen in der Peripherie der infizierten Erythrozyten (Haldar *et al.*, 2002). Als wirtszellmembranständige Parasitenproteine wurden *P. falciparum*-Erythrozytenmembranprotein (PfEMP)1 und PfEMP3, ‚knob‘-assoziiertes

histidinreiches Protein (KAHRP) sowie Oberflächenantigen ringinfizierter Erythrozyten (RESA) identifiziert.

KAHRP und PfEMP1 kumulieren im Bereich von ‚knobs‘, noppenartigen Strukturen auf der Wirtszelloberfläche, die für die Zytoadhärenz an das Wirtsendothel entscheidend sind. RESA wird nach der Erythrozyteninvasion aus den ‚dense granules‘ des Parasiten in die entstehende PV freigesetzt und dann zur Erythrozytenzellmembran transportiert (Culvenor *et al.*, 1991). Dort findet eine Interaktion mit dem Wirtsspektrin statt, die zu einer Membranstabilisierung bei Hitze führt, deren Funktion am ehesten im Schutz während der Fieberschübe zu sehen ist (Foley *et al.*, 1991; Da Silva *et al.*, 1994). PfEMP3 ist ebenfalls mit dem Zytoskelett der Wirtszelle assoziiert (Pasloske *et al.*, 1993).

Die Mechanismen des Exportes von Parasitenproteinen in die Wirtszelle sind noch weitgehend unklar. In aktuellen Untersuchungen konnten jedoch durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten *P. falciparum*-Proteinen neue Erkenntnisse über den Exportweg und die notwendigen Signalsequenzen gewonnen werden. Eine wichtige Rolle spielen N-terminale Signalsequenzen, die diese Proteine in den sekretorischen Transportweg und in das Wirtszellkompartiment dirigieren. So induziert die Signalsequenz von KAHRP die Sekretion in die PV; eine zusätzliche Information, die der Signalsequenz 60 Aminosäuren nachgeschaltet ist, wird zum Transport durch die PVM benötigt (Wickham *et al.*, 2001). Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass ein kurzes Peptid für den Proteinexport in die Wirtszelle notwendig ist (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004). Dieses so genannte *Plasmodium*-Exportelement (PEXEL) ist 15-20 Aminosäuren nach der N-terminalen Signalsequenz lokalisiert und kommt in löslichen sowie in Transmembranproteinen vor. Aufgrund dieser Daten wurden die PEXEL-positiven Proteine identifiziert und als voraussichtliches Exportom/Sekretom von *P. falciparum* definiert. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem PfEMP1, PfEMP3, KAHRP und RESA (Übersicht in: van Ooij & Haldar, 2007). Weiterhin wird eine neue *Apicomplexa*-spezifische Proteinkinase-Familie dazugezählt (Schneider & Mercereau-Puijalon, 2005). Mitglieder dieser R54-FIKK-Kinase-Familie wurden in *Plasmodium* und *Toxoplasma* identifiziert. Dabei weisen die 20 *P. falciparum* Paraloge die PEXEL-Signatur auf, was einen Export der R54-FIKK-Kinasen aus der PV vermuten lässt. Die *Toxoplasma* R54-FIKK-Kinase besitzt hingegen kein PEXEL-Motiv. GRA7 besitzt ebenfalls kein PEXEL-Motiv. Es ist davon auszugehen, dass sich der Export in *T. gondii* anderer Signale bedient.

Für den Export von KAHRP wird ein Transport übers endoplasmatische Retikulum zur PV via den klassischen sekretorischen Exportweg und eine Überwindung der PVM mittels ATP-abhängigem Transporter diskutiert. Frei löslich gelangt KAHRP durchs Erythrozytenzytoplasma zu ‚Maurer’s clefts‘, mit denen es vorübergehend assoziiert und wo die Formation der ‚knobs‘ erfolgen könnte (Wickham *et al.*, 2001). Beim Transport von PfEMP1 und PfEMP3 ist ebenfalls eine Bindung an ‚Maurer’s clefts‘ essentiell. Beim Fehlen des Skeleton-bindenden Proteins (SBP)1 der ‚Maurer’s clefts‘ verbleibt PfEMP1 dort und erscheint nicht auf der Erythrozytenoberfläche (Cooke *et al.*, 2006). Maier *et al.* (2007) sehen SBP1 bereits als notwendig für den Transfer von PfEMP1 zu ‚Maurer’s clefts‘. SBP1 besitzt kein PEXEL-Motiv. Sein PEXEL-unabhängiger Export erfolgt über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur ‚Maurer’s clefts‘-Membran. Basierend auf dem elektronenmikroskopischen Nachweis von Parasitenprotein-tragenden Vesikeln unter dem Einfluss des Vesikeltransportinhibitors Aluminiumtetrafluorid wurde bislang angenommen, dass membrangebundene Proteine wie PfEMP1 über Vesikel zur Erythrozytenmembran transportiert werden (Trelka *et al.*, 2000, Taraschi *et al.*, 2003). Neuere Daten zeigen jedoch auch die Möglichkeit eines nichtvesikulären Proteintransports auf (Knuepfer *et al.*, 2005, Papakrivos *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass PfEMP1 erst bei Ankunft an der Erythrozytenmembran eine Transmembrantopologie annimmt und über Protein-Protein-Interaktionen in der Membran verankert wird. Bis dahin liegt es löslich vor, so dass ein Transport als löslicher Komplex im Erythrozytenzytosol wahrscheinlicher erscheint als ein Transport in Vesikeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Infektionssystem mit *T. gondii* gezeigt, dass das ‚dense granule‘-Protein GRA7 an der Oberfläche vitaler Wirtszellen durchflusszytometrisch nachweisbar ist. Bei hoher Infektionsrate und mit zunehmender Infektionszeit erhöhte sich der Anteil der GRA7-positiven Wirtszellen von 2% 2 h nach Infektion auf 21,7% 30 h nach Infektion (4.1.3). Diese Ergebnisse sprechen für einen Export des Parasitenproteins an die Wirtszellmembran. GRA7 besitzt keine PEXEL-Sequenz. Es ist für GRA7 wie für die zahlreichen PEXEL-negativen exportierten *Plasmodium*-Proteine ein PEXEL-unabhängiger Exportweg anzunehmen. Es ist vorstellbar, dass in *Toxoplasma*-infizierten Zellen ein Vesikeltransport an die Wirtszelloberfläche durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat vermittelt werden. Auch wenn in *Toxoplasma*-infizierten Zellen vergleichbare Strukturen wie ein tubulovesikuläres Netzwerk und ‚Maurer’s

cleft' fehlen, die den *Plasmodium*-Protein-Export vermitteln, können *T. gondii*-Proteine aus der PV ins Wirtszellzytoplasma gelangen (Gubbels *et al.*, 2005). Dies wurde in Wirtszellen mit einem inaktiven ‚green fluorescent protein‘ (GFP)-Gen, welches durch Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion eines Transkriptionsstopps aktiviert wird, nachgewiesen. Werden solche Wirtszellen mit Toxoplasmen infiziert, die Cre-Rekombinase exprimieren, findet eine Aktivierung des GFP-Reporters statt; jedoch nur, wenn die Cre-Rekombinase von den Parasiten sezerniert wird (secCre). Stellen die Parasiten eine zytoplasmatische Version der Cre-Rekombinase her, kommt es nicht zur GFP-Expression der Wirtszellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in die PV sezernierte Cre-Rekombinase die PVM überwindet und in die Wirtszelle gelangt, wo sie im Wirtszellkern GFP aktiviert. Allerdings ist nur ein Bruchteil (1-2%) der mit secCre-exprimierenden Parasiten infizierten Zellen in diesem Modell GFP-positiv (Gubbels *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass der *Toxoplasma*-Antigen-Export nicht so effizient und regelmäßig stattfindet wie der Protein-Export bei *Plasmodium*.

Das liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum in der vorliegenden Arbeit mit einem zweiten experimentellen Ansatz (4.1.5) GRA7 nicht an der Wirtszelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil durch die Biotinylierung der Oberflächenproteine zu Beginn des Versuches und damit für die Versuchsdauer fixierte Verhältnisse Kontaminationen durch von außen angelagertes GRA7 minimiert wurden. Die erfolgreiche Biotinylierung wurde durch den Nachweis biotinylierter Proteine mittels Western Blot-Analyse mit Streptavidin-HRP kontrolliert. Als Positivkontrolle für die GRA7-Detektion dienten die nicht biotinylierten intrazellulären Proteine. In der Western-Blot-Analyse der biotinylierten Oberflächenproteine konnte GRA7 jedoch nicht nachgewiesen werden. Falls GRA7 jedoch, wie secCre, nur in 1-2% der Zellen exportiert wird, wäre die verwendete Methode sicherlich nicht sensitiv genug. Der geringe Anteil von GRA7 würde damit in der Masse der biotinylierten Oberflächenproteine nicht nachzuweisen sein. Mit der Durchflusszytometrie war es außerdem möglich eine größere Anzahl an Zellen auf GRA7 zu untersuchen, wohingegen die Proteinmenge begrenzt war, die im Western Blot untersucht werden konnte und damit möglicherweise einen unter der Nachweisgrenze liegenden GRA7-Anteil aufwies.

Kürzlich konnte GRA7 an vesikelähnlichen Strukturen im Wirtszellzytoplasma und an von der PVM ins Wirtszellzytoplasma ziehenden Strängen, wo es mit ROP2 und ROP4 assoziiert ist, nachgewiesen werden (Dunn *et al.*, 2008). Diese Strukturen

könnten am Transport von GRA7 zur Wirtszellmembran und/oder an der Nährstoffaufnahme aus der Wirtszelle durch *T. gondii* beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass endozytische Wirtszellstrukturen aus dem Wirtszellzytoplasma ins Lumen der PV befördert werden (Coppens *et al.* 2006). Damit konnte widerlegt werden, dass die PV vom endolysosomalen Transportweg der Wirtszelle ausgeschlossen ist. GRA7 schnürt dabei die endozytischen Wirtszellorganellen in die PV ab und ist somit an diesem Transportweg entscheidend beteiligt. GRA7-,knock out' Parasiten zeigten gegenüber dem Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum unter nährstoffarmen Bedingungen, so dass eine Nährstoffaufnahme aus der Wirtszelle über diesen Mechanismus postuliert wurde.

Im Gegensatz zu den Befunden mit secCre-exprimierenden Toxoplasmen steht der in der vorliegenden Arbeit gemessene, vergleichsweise hohe Prozentsatz GRA7-positiver Wirtszellen (27,7%) (4.1.1). Um diese Population genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit YFP-exprimierende Toxoplasmen eingesetzt. Ihr YFP-Signal zeigte sich im FACS als valider Marker für infizierte Zellen (4.1.2). Auch Gubbels *et al.* (2005) setzten YFP zur durchflusszytometrischen Unterscheidung von infizierten und uninfizierten Zellen ein. Bei den Untersuchungen mit YFP-exprimierenden Toxoplasmen erwiesen sich überraschenderweise infizierte und uninfizierte Zellen als GRA7-positiv (4.1.3). 30 h nach Infektion ließ sich oberflächliches GRA7 an 45,3% der uninfizierten und 21,7% der infizierten Zellen nachweisen.

Diese Befunde sprechen dagegen, dass GRA7 aus infizierten Zellen an die Wirtszelloberfläche transportiert wird. Eine Anhaftung von außen erscheint in dem verwendeten Versuchsaufbau wahrscheinlicher. Als mögliche exogene GRA7-Quelle konnten freie Toxoplasmen identifiziert werden (4.1.4), deren Freisetzung im Versuchsverlauf nicht verhindert werden konnte. Durch den Einsatz einer weniger kontaminationsanfälligeren Methode gelang kein Nachweis von oberflächenassoziiertem GRA7 (4.1.5). Mögliche Ursachen könnten die Antigenaufbereitung und die niedrigere Sensitivität dieser Methode sein. Zusammenfassend können die hier vorliegenden Daten einen Export von GRA7 nicht bestätigen aber auch nicht ausschließen.

Stachelhaus (2001) gelang die Isolierung CD4⁺ T-Zellen aus dem Hirn chronisch mit *T. gondii* infizierter Mäuse, die *in vitro* durch *T. gondii*-Antigene aktiviert werden konnten. Bisher ist nicht bekannt, welche parasitären Antigene die Immunantwort in

der chronischen Phase der Infektion stimulieren. Einen Hinweis für eine *in vivo* Relevanz eines GRA7-Exportes lieferte der Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor chronisch infizierter Mäuse (Stachelhaus, 2001). Als ein Parasitenantigen, das mit der Wirtszellmembran assoziiert ist und ein Zielantigen der Immunantwort ist (Jacobs *et al.* 1999; Jongert *et al.* 2007), könnte GRA7 einen permanenten Stimulus des Wirtsimmunsystems während der chronischen *T. gondii* Infektion darstellen. Somit wurde mit der Untersuchung des GRA7-Exportes eine Möglichkeit, wie dem Immunsystem während der chronischen Phase der Infektion Antigen zugänglich werden könnte, betrachtet.

5.1.2 Rolle exportierter Antigene als T-Zellantigene

Toxoplasma entzieht sich als intrazellulärer Parasit der Immunantwort. Auch in der Wirtszelle sitzt *Toxoplasma* in einem "abgeschottetem" Kompartiment. Es stellt sich die Frage, wie *Toxoplasma*-Antigen dem Immunsystem zugänglich wird. Als ein Parasitenantigen, das mit der Wirtszellmembran assoziiert ist, könnte GRA7 einen permanenten Stimulus des Wirtsimmunsystems während einer *Toxoplasma*-Infektion darstellen.

Mit dem Nachweis, dass vom Parasiten sezernierte Moleküle die PVM überwinden und in die Wirtszelle gelangen können (Gubbels *et al.*, 2005) wird eine weitere Möglichkeit aufgezeigt, wie *Toxoplasma*-Protein als Antigen dem Immunsystem zur Verfügung gestellt werden kann. Das ins Wirtszellzytoplasma exportierte Antigen steht in infizierten Zellen dem endogenen MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg zur Verfügung. Tatsächlich haben Gubbels *et al.* (2005) in infizierten Zellen eine TAP-abhängige Präsentation des sezernierten, nicht aber zytoplasmatischen Modellantigens Ovalbumin (OVA) an CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen.

Ebenso zeigen Mäuse, die mit α -Galaktosidase(Gal)-sezernierenden Toxoplasmen infiziert sind, eine α -Gal-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort (Kwok *et al.*, 2003). Mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) exprimierenden Toxoplasmen konnten *in vivo* und *in vitro* Ova-spezifische CD4⁺ T-Zellen stimuliert werden (Pepper *et al.*, 2004). Nur in die PV sezerniertes und nicht zytoplasmatisches OVA induzierte eine CD4⁺ T-Zellantwort mit IFN γ -Produktion.

Sezernierte Antigene wären somit geeignete T-Zellantigene, einerseits für die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort durch Freisetzung der Antigene aus der PV in die Wirtszelle und Eintritt in den endogenen MHC I-Antigenpräsentationsweg (Gubbels *et*

al., 2005; Kwok *et al.*, 2003) und andererseits für die Induktion einer CD4⁺ T-Zellantwort (Pepper *et al.*, 2004). Durch den Transfer Ova-spezifischer CD4⁺T-Zellen in IFN•-defiziente Mäuse und anschließende Immunisierung mit OVA wurde eine gewisse Protektion der Tiere vor einer *T. gondii*-Infektion erreicht (Pepper *et al.*, 2004). Die Relevanz *in vivo* konnte so belegt werden.

Das legt die Schlussfolgerung nah, dass womöglich *T. gondii*-Antigene nicht die Wirtszelle verlassen müssen, um präsentiert zu werden, sondern eine Freisetzung aus der PV ins Wirtszellzytoplasma ausreichend ist für eine effiziente Präsentation.

Bisherige Untersuchungen zum Export von *Toxoplasma*-Antigenen aus der PV (Gubbels *et al.*, 2005; vorliegende Arbeit) wurden *in vitro* an Erythroblasten, Milzzellen und Fibroblasten durchgeführt, die nicht mit IFN• stimuliert waren. Neue Befunde weisen darauf hin, dass sich die Situation in IFN•-stimulierten Zellen grundsätzlich anders darstellt. So konnte GRA7 im Zytoplasma von infizierten, IFN•-stimulierten murinen Astrozyten nachgewiesen werden (Martens *et al.*, 2005). Dies gelang schon 2-6 h nach Infektion mit nur einem intrazellulären *Toxoplasma*. In Anwesenheit von IFN• kommt es zu einer Zerstörung der PV-Integrität (Martens *et al.*, 2005; Ling *et al.*, 2006) und darüber zu einer Freisetzung von Antigenen in das Wirtszellzytoplasma, die dann zur Antigenpräsentation zur Verfügung stehen. Während der Infektion *in vivo* spielt IFN• eine entscheidende Rolle (Suzuki *et al.*, 1988; Gazzinelli *et al.*, 1994; Übersicht in: Lieberman & Hunter, 2002), so dass diese *in vitro* gefundenen Ergebnisse durchaus *in vivo* relevant sein könnten.

5.2 Dendritische Zellen als APC im chronisch mit *T. gondii* infizierten Hirn

Während einer *Toxoplasma*-Enzephalitis wurden reife, funktionell aktive DC im Hirn nachgewiesen. Am Maustoxoplasmosemodell wurde untersucht, ob Hirn-DC somit als APC während der chronischen Toxoplasmose aktiv sind.

DC wurden im normalen, nicht entzündlichen Hirnparenchym der Ratte und der Maus bisher nicht nachgewiesen. Bei der Ratte wurden sie in der *Dura mater*, *Arachnoidea mater*, *Pia mater* und im *Plexus choroideus* lokalisiert (McMenamin *et al.*, 1999; McMenamin *et al.*, 2003). Perivaskuläre Makrophagen, Mikrogliazellen und Astrozyten sind ebenfalls potentielle APC im Hirn (Übersicht in: Aloisi *et al.*, 2000). Im normalen ZNS sind diese Zelltypen, wie DC, nur in geringer Zahl und mit geringer

stimulatorischer Aktivität zu finden. Perivaskuläre Makrophagen, Mikrogliazellen und Astrozyten weisen eine geringe stimulatorische Aktivität auf. Die bei Toxoplasmose im Hirn nachgewiesenen DC zeigen einen aktivierten und reifen Phänotyp mit hoher stimulatorischer Aktivität (Fischer *et al.*, 2000). Ihre Zahl nimmt während der chronischen Infektion zu. Es wurde gezeigt, dass sie *ex vivo* naive T-Zellen stimulieren und CD4⁺ T-Zellen Fremdartigen präsentieren können.

5.2.1 Stimulatorische Aktivität der Hirn-DC für *Toxoplasma*-spezifische T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Hirn-DC aus chronisch mit *T. gondii* infizierten Mäusen nach Zugabe von exogenem Antigen in der Lage sind *Toxoplasma*-spezifische T-Zellen zu aktivieren (4.2.1). Auch ohne Zugabe von Antigen stimulierten die Hirn-DC *T. gondii*-spezifische T-Zellen zur Proliferation und IFN γ -Produktion. Das deutet daraufhin, dass die Hirn-DC schon *in vivo* Antigen aufgenommen haben.

Zytokininduzierte DC aus peripheren Blutmonozyten können in Abwesenheit von Antigen T-Zellen aktivieren (Kondo *et al.*, 2001). Diese antigenunabhängige T-Zellstimulation war *in vitro* mit höherem Überleben und Zytokingenexpression der T-Zellen korreliert. Hirn-DC aus uninfizierten Mäusen zeigten ohne Antigen-Zugabe jedoch keine T-Zellstimulation (4.2.1).

Die von exogenem Antigen unabhängige Aktivierung von *T. gondii*-spezifischen T-Zellen durch Hirn-DC aus infizierten Mäusen deutet auf eine Antigenbeladung der DC im Hirn hin. Bei Autoimmunenzephalomyelitis wurden mit Myelin beladene DC in den hirndrainierenden Lymphknoten gefunden, wo eine Interaktion mit T-Zellen stattfindet (de Vos *et al.*, 2002). Prinzipiell ist eine Aufnahme von aus dem Hirn drainiertem Antigen durch DC in den Lymphknoten möglich, aber wahrscheinlicher ist eine Migration von antigenbeladenen DC aus dem Hirn in die zervikalen Lymphknoten. DC nehmen Antigen auf und tragen es dann zu Lymphknoten. Eine Wanderung von beladenen APC zu lymphoiden Organen während entzündlicher Prozesse wurde für Makrophagen bei Peritonitis und Glomerulonephritis schon beschrieben (Bellingan *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 1993). DC der Haut und der Peyer'schen Plaques wandern ebenfalls zu Lymphknoten, um ihr Antigen zu präsentieren (Itano *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2003).

Eine weitere Arbeit zeigt, dass die intrazerebrale Injektion antigenbeladener, migrationsunfähiger DC zu keiner systemischen T-Zellaktivierung und einer geringeren intrazerebralen Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen führt als die Injektion migrationsfähiger DC (Karman *et al.*, 2004). Das spricht für die Notwendigkeit der Antigenpräsentation durch hirnemigrierte DC in lymphoiden Organen, da sie darüber eine spezifische T-Zellakkumulation im Hirn induzieren. Durch die intrazerebrale Injektion von antigenbeladenen DC wurde demonstriert, dass durch DC eine Immunantwort in der Peripherie und eine T-Zellmigration ins Hirn induziert werden. Der Migrationsweg der DC vom Hirn in die zervikalen Lymphknoten ließ sich durch die intrazerebrale Injektion von OVA-beladenen DC aus GFP transgenen Mäusen verfolgen (Karman *et al.*, 2004). Die DC verbleiben in der Hemisphäre, in die sie injiziert wurden und migrieren entlang der *Capsula externa* zu den zervikalen Lymphknoten.

Der Ort der Antigenpräsentation und die involvierten APC während der chronischen zerebralen Toxoplasmose sind unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Präsentation von Antigen aus dem Hirn durch Hirn-DC gegenüber T-Zellklonen *ex vivo* gezeigt werden (4.2.1). Es ist ebenfalls eine Migration von antigenbeladenen DC vom Hirn zu zervikalen Lymphknoten, wo T-Zellen Antigen präsentiert wird, wie für die Autoimmunenzephalomyelitis gezeigt, möglich.

Hirn-DC zeigen eine T-Zellinhibitorische Aktivität bei der Autoimmunmyeloenzephalitis. Es konnte die Inhibierung der T-Zellstimulation durch Hirn-DC gezeigt werden (Suter *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Hirn-DC aus *Toxoplasma*-infizierten Mäusen waren diese Hirn-DC nicht in der Lage naive T-Zellen zu stimulieren (Fischer & Reichmann, 2001). Bei der Toxoplasmose ist eine Aktivierung naiver T-Zellen im Hirn durch DC denkbar (Krakowski & Owen 2000). Hirn-DC besitzen nach den vorliegenden Ergebnissen hauptsächlich immunstimulatorische Fähigkeiten. Ob daneben auch zusätzlich regulatorische DC existieren, die eine überschießende T-Zellaktivierung verhindern, ist bisher unklar.

5.2.2 *Toxoplasma*-Antigenquelle für Hirn-DC

Mit dem Nachweis der Präsentation von *T. gondii*-Antigen durch Hirn-DC stellt sich die Frage, woher das präsentierte Antigen stammt.

Eine Möglichkeit für die Herkunft des Antigens ist die Phagozytose von toten, infizierten Zellen oder Zellresten *in vivo* durch die Hirn-DC. Durch die Infektion mit *T. gondii* kommt es im Hirn zu Gewebeuntergang und damit zu Antigenfreisetzung.

Die Infektion der Hirn-DC ist eine andere Möglichkeit. Erstmals wurde gezeigt, dass Hirn-DC mit *Toxoplasma* infiziert sind (Courret *et al.*, 2006). Der Parasit gelangt über infizierte CD11c⁺ und CD11b⁺ Zellen ins Hirn. Die Zellen wurden jedoch nur früh nach der Infektion auf Parasiten untersucht. Insgesamt zeigten sich wenig infizierte Zellen. 7 Tage *p.i.* wurden kaum Parasiten (<25) und 15 Tage *p.i.* 20.000 Parasiten in 10⁵ Zellen detektiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Infektion der Hirn-DC nicht nachgewiesen werden (4.2.3). Es zeigte sich ein geringes Toxoplasmenproliferationssignal, das über der Hintergrundproliferation lag. Das geringe Signal im ³H-Uracileinbau könnte an einer geringen Toxoplasmenzahl und zu langsamer Proliferation der Parasiten liegen. Es wurde bereits gezeigt, dass DC die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* hemmen (Schwarzenberg, 2003). Darin könnte ebenfalls das geringe Proliferationssignal begründet sein. Nach Fluoreszenzmarkierung konnten jedoch mikroskopisch keine intrazellulären Toxoplasmen nachgewiesen werden, so dass eine Infektion der Hirn-DC hier ausgeschlossen wurde. Möglich ist auch die Abtötung der intrazellulären Parasiten durch die DC im Laufe der Infektion. Der Nachweis infizierter Hirn-DC fanden bei Courret *et al.* (2006) 15 Tage *p.i.* statt. Die Untersuchungen der Hirn-DC in der vorliegenden Arbeit erfolgten jedoch 6 Wochen nach Infektion.

Als dritte Möglichkeit ist die Aufnahme von *Toxoplasma*-Antigen *ex vivo* während des Testes zu sehen. Es konnten Zysten im Testansatz nachgewiesen werden (4.2.3). Beide T-Zellklone zeigten sich durch zugegebene Zysten in Anwesenheit von APC stimulierbar (4.2.4). Damit bestand die Möglichkeit, dass nicht das *in vivo* aufgenommene Parasitenantigen sondern *ex vivo* aufgenommenes Parasitenantigen für die gemessene T-Zellproliferation verantwortlich war. Deshalb wurde versucht eine zystenfreie Präparation der Hirn-DC zu erreichen. Das gelang durch FACS-sort leider nicht. Die Kontamination des Testansatzes mit frisch *ex vivo* isolierten Hirn-DC durch Zysten betrug ca. 3 Zysten/well. Es konnte jedoch erst ab 6 Zysten/well eine

signifikante T-Zellproliferation gemessen werden (4.2.4). Zusammenfassend lässt sich nicht ausschließen, dass die Hirn-DC Antigen durch die Zysten im Test aufgenommen haben, jedoch ist die gezeigte T-Zellproliferation nicht ausschließlich damit erklärbar. Es ist davon auszugehen, dass die T-Zellklone hauptsächlich durch die Präsentation von *in vivo* aufgenommenem Parasitenantigen durch die Hirn-DC stimuliert wurden.

6 LITERATUR

- Adjogble, K.D., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Hucke, C., MacKenzie, C.R., Cesbron-Delauw, M.F. and Däubener, W. 2004.** GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* 34: 1255.
- Ahn, H.J., Kim, S. and Nam, H.W. 2005.** Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331: 614.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. 2001.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732.
- Aliberti, J., Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B. and Sher, A. 2000.** CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1: 83.
- Aliberti, J., Valenzuela, J.G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J.M. and Sher, A. 2003.** Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 4: 485.
- Aloisi, F., Ria, F. and Adorini, L. 2000.** Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today.* 21: 141.
- D' Angelillo, A., De Luna, E., Romano, S., Bisogni, R., Buffolano, W., Gargano, N., Del Porto, P., Del Vecchio, L., Petersen, E. and Romano, M.I. 2011.** *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 1 stimulates apoptosis of monocytes through autocrine TGF- \bullet signaling. *Apoptosis.* 16: 551.
- Asai, T., O'Sullivan, W.J. and Tatibana, M. 1983.** A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 258: 6816.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K. 2000.** Immunobiology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. 1998.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245.

- Barsoum, R.S. 2004.** Parasitic infections in organ transplantation. *Exp. Clin. Transplant.* 2: 258.
- Bellingan, G.J., Caldwell, H., Howie, S.E., Dransfield, I. and Haslett, C. 1996.** *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J. Immunol.* 157: 2577.
- Black, M.W. and Boothroyd, J.C. 2000.** Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 607.
- Bliss, S.K., Zhang, Y. and Denkers, E.Y. 1999.** Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J. Immunol.* 163: 2081.
- Bohne, W., Heesemann, J. and Gross, U. 1993.** Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 61: 1141.
- Bonhomme, A., Maine, G.T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Hunt, J., Chovan, L., Howard, L., Brojanac, S., Sheu, M., Tyner, J., Pluot, M. and Pinon, J.M. 1998.** Quantitative immunolocalization of a p29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 1411.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. and Willems, F. 1997.** Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 27: 1848.
- Butcher, B.A., Greene, R.I., Henry, S.C., Annecharico, K.L., Weinberg, J.B., Denkers, E.Y., Sher, A. and Taylor, G.A. 2005.** p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infect. Immun.* 73: 3278.
- Carey, K.L., Donahue, C.G. and Ward, G.E. 2000.** Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105: 25.
- Carruthers, V.B. and Sibley, D.L. 1997.** Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* 73: 114.
- Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce R.J., Lenzen, G., Gesbron, J.Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P. and Capron, A. 1989.** Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7537.

- Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P.I., Striepen, B., Roos, D.S. and Joiner, K.A. 1999.** Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* 274: 2424.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D. Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F., Sher, A. and Taylor, G.A. 2001.** Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* 194: 181.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.J. 2004.** Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5: 1219.
- Cooke, B.M., Buckingham, D.W., Glenister, F.K., Fernandez, K.M., Bannister, L.H., Marti, M., Mohandas, N. and Coppel, R.L. 2006.** A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J. Cell. Biol.* 172: 899.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C. and Joiner, K.A. 2006.** *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125: 261.
- Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D. and Tomavo, S. 2003.** Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* 85: 353.
- Cortez, E., Stumbo, A.C., Saldanha-Gama, R., Villela, C.G., Barja-Fidalgo, C., Rodrigues, C.A., das Graças Henriques, M., Benchimol, M., Barbosa, H.S., Porto, L.C. and Carvalho, L. 2008.** Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. *Micron.* 39: 25.
- Couret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gâtel, D. and Tardieux, I. 2006.** CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309.
- Culvenor, J.G., Day, K.P. and Anders, R.F. 1991.** *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* 59: 1183.

- Da Silva, E., Foley, M., Dlużweski, A.R., Murray, L.J., Anders, R.F. and Tilley, L. 1994.** The *Plasmodium falciparum* protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66: 59.
- Denkers, E.Y., Yap, G., Scharon-Kersten, T., Charest, H., Butcher, B.A., Caspar, P., Heiny, S. and Sher, A. 1997.** Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 159: 1903.
- Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. 1988.** Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407.
- Dugońska, H., Dytnerka, K., Reichmann, G., Stachelhaus, S. and Fischer, H.G. 2001.** Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: positions of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. *Parasitol. Res.* 87: 634.
- Dziarszinski, F., Popescu, O., Tourse, C., Slomianny, C., Yahiaoui, B. and Tomavo, S. 1999.** The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 274: 34888.
- Dubey, J.P. 1998.** Toxoplasmosis. In: *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections* 9th ed. Vol 5, L. Collier, A. Balows and Sussman, M., eds.: 303. Edward Arnold, London, UK.
- Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. 1972.** Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. and Speer, C.A. 1998.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D. and Joiner, K.A. 1993.** Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 79: 402.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V. and Fourmaux, M.N. 1998.** Apical organelles and host-cell invasion by *Apicomplexa*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1007.
- Dunn, J.D., Ravindran, S., Kim, S.K. and Boothroyd, J.C. 2008.** The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4. *Infect. Immun.* 76: 5853.

- Ferguson, D.J.P., Jacobs, D., Saman, E., Dubremetz, J.F. and Wright, S.E. 1999.** In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 119: 259.
- Filisetti, D. and Candolfi, E. 2004.** Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 40: 71.
- Fischer, H.G., Bonifas, U. and Reichmann, G. 2000.** Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 164: 4826.
- Fischer, H.G., Reichmann, G. and Hadding, U. 1996.** *Toxoplasma* proteins recognized by protective T lymphocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219: 175.
- Fischer, H.G. and Reichmann, G. 2001.** Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 166: 2717.
- Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H.E. and Reichmann, G. 1998.** GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 251.
- Foley, M., Tilley, L., Sawyer, W.H. and Anders, R.F. 1991.** The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46: 137.
- Fourmaux, M.N., Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Biderre, C., Briche, I., Loyens, A., Odberg-Ferragut, C., Camus, D. and Dubremetz, J.F. 1996.** The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 201.
- Frenkel, J.K. 1973.** *Toxoplasma* in and around us. *BioScience.* 23: 343.
- Garcia-Réquet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C.J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D. and Dubremetz, J.F. 2000.** The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol.* 2: 353.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G. and Sher, A. 1994.** Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153: 2533.

- Gazzinelli, R.T., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A. and Sher, A. 1992.** Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149: 175.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Patrel, C., Antonenko, S., Xu, X.L., Trinchieri, G., O'Garra, A. and Lui, Y.J. 2002.** The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 195: 953.
- Gonzales, G. 1988.** Biochromatography Symposium. 2.-3.6.1988. Paris. (abstract)
- Gross, U., Holpert, M. and Goebel, S. 2004.** Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 40: 65.
- Gubbels, M.J., Li, C. and Striepen, B. 2003.** High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 309.
- Gubbels, M.J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M. and Robey, E.A. 2005.** Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 73: 703.
- Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B.U., Harrison, T., Hiller, N.L., Akompong, T. and Cheres, P. 2002.** Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell. Microbiol.* 4:383.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. 2000.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740.
- Henriquez, F.L., Nickdel, M.B., McLeod, R., Lyons, R.E., Lyons, K., Dubremetz, J.F., Grigg, M.E., Samuel, B.U. and Roberts, C.W. 2005.** *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitol.* 131: 169.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R.M., Romani, N. and Schuler, G. 1996.** Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 659.
- High, K.P., Joiner, K.A. and Handschumacher, R.E. 1994.** Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269: 9105.

- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C. and Haldar, K. 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*. 306: 1934.
- Hu, K., Roos, D.S. and Murray, J.M. 2002. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Cell Biol* 156: 1039.
- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H. and Remington, J.S. 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 62: 2818.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Maramatsu, S. and Steinman, R.M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y. and Jenkins, M.K. 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*. 19: 47.
- Jacobs, D., Dubremetz, J.F., Loyens, A., Bosman, F. and Saman, E. 1998. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 237.
- Jacobs, D., Vercammen, M. and Saman, E. 1999. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 24.
- Jacobs, L., Remington, J.S. and Melton, M.L. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46: 11.
- Jongert, E., DE Craeye, S., Dewit, J. and Huygen, K. 2007. GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 29: 445.
- Joynson, D.H.M. and Wreghitt, T.G. 2001. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide. Cambridge University Press, Cambridge.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M. and Fabry, Z. 2004. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J. Immunol.* 173: 2353.

- Kim, S.K. and Boothroyd, J.C. 2005.** Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *J. Immunol.* 174: 8038.
- Knuepfer, E., Rug, M., Klonis, N., Tilley, L. and Cowman, A.F. 2005.** Trafficking of the major virulence factor to the surface of transfected *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Blood.* 105: 4078.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. and Schuler, G. 1996.** High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184: 741.
- Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K.P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S. and Martin, R. 2001.** Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat. Immunol.* 2: 932.
- Kostulas, N., Li, H.L., Xiao, B.G., Huang, Y.M., Kostulas, V. and Link, H. 2002.** Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 33: 1129.
- Krakowski, M.L. and Owens, T. 2000.** Naive T-lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur. J. Immunol.* 30: 1002.
- Kwok, L.Y., Lütjen, S., Soltek, S., Soldati, D., Busch, D., Deckert, M. and Schlüter, D. 2003.** The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis. *J. Immunol.* 170: 1949.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C. and Sibley, L.D. 1999.** Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 311.
- Lan, H.Y., Nikolic-Paterson, D.J. and Atkins, R.C. 1993.** Trafficking of inflammatory macrophages from the kidney to draining lymph nodes during experimental glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 92: 336.
- Lappalainen, M. and Hedman, K. 2004.** Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 40: 81.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D. and Cesbron-Delauw, M.F. 1999.** Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* 10: 1277.

- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J.L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F. 1993.** Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 143.
- Lecordier, L., Moleon-Borodowski, I., Dubremetz, J.F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslée, D., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F. 1995.** Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70: 85.
- Lekutis, C., Ferguson, D.J.P., Grigg, M.E., Camps, M. and Boothroyd, J.C. 2001.** Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31: 1285.
- Lieberman, L.A. and Hunter, C.A. 2002.** The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.* 21: 373.
- Liendo, A., Stedman, T.T., Ngô, H.M., Chaturvedi, S., Hoppe, H.C. and Joiner, K.A. 2001.** *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 18272.
- Lingelbach, K. and Przyborski, J.M. 2006.** The long and winding road: Protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147: 1.
- Ling, Y.M., Shaw, M.H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G.A., Ferguson, D.J.P. and Yap, G.S. 2006.** Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* 203: 2063.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B. 1997.** Alveolata. In: *Parasitologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg: 66.
- Maier, A.G., Rug, M., O'Neill, M.T., Beeson, J.G., Marti, M., Reeder, J. and Cowman, A.F. 2007.** Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface. *Blood* 109: 1289.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G. and Howard, J.C. 2005.** Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* 1: e24.

- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L. and Cowman, A.F. 2005.** Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J. Cell. Biol.* 171: 587.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. and Cowman, A.F. 2004.** Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science.* 306: 1930.
- McMenamin, P.G. 1999.** Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemound preparations. *J. Comp. Neurol.* 405: 553.
- McMenamin, P.G., Wealthall, R.J., Deverall, M., Cooper, S.J. and Griffin, B. 2003.** Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 313: 259.
- Mercier, C., Adjogble, K.D., Däubener W. and Cesbron-Delauw, M.F. 2005.** Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all *apicomplexa* parasites? *Int. J. Parasitol.* 35: 829.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F. and Sibley, L.D. 1998.** The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate postsecretory membrane association. *J. Cell. Sci.* 111: 2171.
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslée, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F. 1993.** Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 71.
- Metsis, A., Pettersen, E. and Petersen, E. 1995.** *Toxoplasma gondii*: Characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 kDa with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. *Experimental Parasitol.* 81: 472.
- Mévelec, M.N., Chardès, T., Mercereau-Puijalon, O., Bourguin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J.F. and Bout, D. 1992.** Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 227.
- Michelin, A., Bittame, A., Bordat, Y., Travier, L., Mercier, C., Dubremetz, J.F. and Lebrun, M. 2009.** GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membraneous nanotubular network. *Int. J. Parasitol.* 39: 299.

- Montoya, J.G. 2002.** Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185: S73.
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M. and Von Andrian, U.H. 2003.** Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature.* 424: 88.
- Morris, M.T. and Carruthers, V.B. 2003.** Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128: 119.
- Morris, M.T., Coppin, A., Tomavo, S. and Carruthers, V.B., 2002.** Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J. Biol. Chem.* 277: 45259.
- Morrisette, N.S. and Sibley, L.D. 2002.** Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 21.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. 1986.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348.
- Nam, H.W. 2009.** GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean. J. Parasitol.* 47 Suppl: S29.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G. and Fischer, H.G. 2002.** Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect.* 4: 581.
- Ngô, H.M., Hoppe, H.C. and Joiner, K.A. 2000.** Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol.* 10: 67.
- Nicolle, C. and Manceaux, L. 1908.** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 147: 763.
- Nischik, N. 2003.** Immunogenität des virulenzabhängig exprimierten dense granule Proteins GRA7 von *Toxoplasma gondii*. *Dissertation Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., D•ugo• ska, H., Reichmann, G. and Fischer, H.G. 2001.** Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect.* 3: 1.
- Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W. and Herzenberg, L.A. 1978.** Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81: 115.

- van Ooij, C. and Haldar, K. 2007.** Protein export from *Plasmodium* parasites. *Cell. Microbiol.* 9: 573.
- Ossorio, P.N., Dubremetz, J.F. and Joiner, K.A. 1994.** A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J. Biol. Chem.* 21: 15350.
- Papakrivos, J., Newbold, C.I. and Lingelbach, K. 2005.** A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol. Microbiol.* 55: 1272.
- Pasloske, B.L., Baruch, D.I., van Schravendijk, M.R., Handunnetti, S.M., Aikawa, M., Fujioka, H., Taraschi, T.F., Gormley, J.A. and Howard, R.J. 1993.** Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 59.
- Pavlik, E.J., Flanigan, R.C., van Nagell, J.R. Jr., Hanson, M.B., Donaldson, E.S., Keaton, K., Doss, B., Bartmas, J. and Kenady, D.E. 1985.** Esterase activity, exclusion of propidium iodide, and proliferation in tumor cells exposed to anticancer agents: phenomena relevant to chemosensitivity determinations. *Cancer Invest.* 3: 413.
- Pepper, M., Dzierszynski, F., Crawford, A., Hunter, C.A. and Roos, D. 2004.** Development of a system to study CD4⁺-T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 72: 7240.
- Petersen, E. 2007.** Toxoplasmosis. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12:214.
- Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C. 1977.** Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* 24: 449.
- Pfefferkorn, E.R. 1984.** Interferon • blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 908.
- Plumb, J., Armstrong, M.A., Duddy, M., Mirakhur, M. and McQuaid, S. 2003.** CD83-positive dendritic cells are present in occasional perivascular cuffs in multiple sclerosis lesions. *Mult. Scler.* 9: 142.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. 1998.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085.

- Pszenny, V., Angel, S.O., Duschak, V.G., Paulino, M., Ledesma, B., Yabo, M.I., Guarnera, E., Ruiz, A.M. and Bontempi, E.J. 2000.** Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107: 241.
- Pszenny, V., Ledesma, B.E., Matrajt, M., Duschak, V.G., Bontempi, E.J., Dubremetz, J.F. and Angel, S.O. 2002.** Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121: 283.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Marakovsky, E. and Maliszewski, C.R. 1999.** Distinct dendritic subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1036.
- Reichmann, G., Dugo•ska, H., Hiszczy•ska-Sawicka, E. and Fischer, H.G. 2001.** Tachyzoite-specific isoform of *Toxoplasma gondii* lactate dehydrogenase is the target antigen of a murine CD4(+) T-cell clone. *Microbes Infect.* .3: 779.
- Reichmann, G., Schroeter, M., Jander, S. and Fischer, H.G. 2002.** Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *J. Neuroimmunol.*129: 125.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N. and Sher, A. 1997.** *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186: 1819.
- Reis e Sousa, C., Sher, A. and Kaye, P. 1999.** The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 392.
- Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P. and Desmonts, G. 2001.** Toxoplasmosis. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 5th ed., Remington, J.S., Klein, J., eds.: 205. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M. and Ricciardi-Castagnoli, P. 1999.** Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today.* 20: 200.
- Rome, M.E., Beck, J.R., Turetzky, J.M., Webster, P. and Bradley, P.J. 2008.** Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76: 4865.

- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D. and Saeij, J.P. 2011.** Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp. Med.* 208: 195.
- Sabin, A.B. and Feldman, H.A. 1948.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. 1995.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389.
- Sanford, K.K., Earle, W.R. and Likely, G.D. 1948.** The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 9: 229.
- Saunders D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovski, E., Dunn, A., Metcalf, D. and Shortman, K. 1996.** Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 184: 2185.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R. and Sher, A. 2002.** Cutting Edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 5997.
- Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T. and Sher, A. 1996.** In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* 157: 4045.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J. and Sher, A. 1997.** Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185: 1261.
- Schlüter, D., Hein, A., Dorries, R. and Deckert-Schlüter, M. 1995.** Different subsets of T cells in conjunction with natural killer cells, macrophages, and activated microglia participate in the intracerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. *Am. J. Pathol.* 146: 999.
- Schlüter, D., Lohler, J., Deckert, M., Hof, H. and Schwendemann, G. 1991.** *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *J. Neuroimmunol.* 31: 185.

- Schneider, A.G. and Mercereau-Puijalon, O. 2005.** A new *Apicomplexa*-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genomics* 6: 30.
- Schwarzenberg, A. 2003.** Die Interferon- γ -unabhängige anti-*T. gondii* Aktivität muriner Dendritischer Zellen und ein Zytokinmimikry des Parasiten. *Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa F. and Aloisi, F. 2000.** Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 157: 1991.
- Shortman, K. and Liu, Y.J. 2002.** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 151.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Parmley, S.F. and Cesbron-Delauw, M.F. 1995.** Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulovesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Science.* 108: 1669.
- Simon, C. und Stille, W. 2000.** In: Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis. Schattauer Verlagsgesellschaft: 222.
- Stachelhaus, S. 2001.** Charakterisierung und Identifizierung eines 29 kDa Proteins von *Toxoplasma gondii* - Bedeutung bei der Wirt-Parasit-Wechselbeziehung. *Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. 1973.** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142.
- Streptoe, R.J. and Thomson, A.W. 1999.** Dendritic cells in the liver, kidney, heart and pancreas. In: *Dendritic cells* Lotze, M.L. and Thomson, A.W. eds.: 153. Academic Press, San Diego.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J. and Ward, G.E. 1996.** *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8413.
- Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W. and Fontana, A. 2003.** The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 33: 2998.

- Suter, T., Malipiero, U., Otten, L., Ludewig, B., Muelethaler-Mottet, A., Mach, B., Reith, W. and Fontana, A. 2000.** Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 30: 794.
- Suzuki, Y. 2002.** Host Resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185: S58.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D. and Remington, J.S. 1988.** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516.
- Suzuki, Y., Rani, S., Liesenfeld, O., Kojima, T., Lim, S., Nguyen, T.A., Dalrymple, S.A., Murray, R. and Remington, J.S. 1997.** Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect. Immun.* 65: 2339.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. 2001.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933.
- Taraschi, T.F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V.M., Tilley, L. and Moriyama, Y. 2003.** Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood.* 102: 3420.
- Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L.S., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E., Reid, S.W., Tassarollo, L., Bray, M., McVicar, D.W., Komschlies, K.L., Young, H.A., Biron, C.A., Sher, A. and Vande Woude, G.F. 2000.** Pathogen specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. USA* 97: 751.
- Taylor, G.A., Feng, C.G. and Sher, A. 2004.** p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 100.
- Torpier, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J., Darde, M.L. and Capron, A. 1993.** *Toxoplasma gondii*: Differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. *Exp. Parasitol.* 77: 13.
- Torrey, E.F. and Yolken, R.H. 2003.** *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1375.
- Trelka, D.P., Schneider, T.G., Reeder, J.C. and Taraschi, T.F. 2000.** Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106: 131.

- de Vos, A.F., van Meurs, M., Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., van der Valk, P., Ravid, R., Rensing, S., Boon, L., 't Hart, B.A., and Laman, J.D. 2002.** Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 169: 5415.
- Weiss, L.M. and Kim, K. 2000.** The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.* 5: d391.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L. and Cowman, A.F. 2001.** Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *EMBO J.* 20: 5636.
- Yang, S. and Parmley, S.F. 1997.** *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. *Gene.* 184: 1.
- Yap, G., Pesin, M. and Sher, A. 2000.** Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165: 628.
- Yap, G. and Sher, A. 1999.** Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology.* 201: 240.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S. and Sher, A. 2005.** TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626.

7 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AIDS	‚acquired immunodeficiency syndrome‘
APC	antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
CCR	Chemokinrezeptor
CD	‚cluster of differentiation‘
cpm	‚counts per minute‘
DC	Dendritische Zellen
DMEM	‚Dulbecco´s modified Eagle´s medium‘
Dnase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	‚enzyme-linked immunosorbent assay‘
ENO	Enolase
FACS	‚fluorescence-activated cell sorter‘
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Flt3L	Flt3-Ligand
FSC	‚forward scatter‘
Gal	Galaktosidase
GFP	‚green fluorescent protein‘
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GRA	‚ <i>T. gondii</i> dense granule protein‘
HRP	Meerrettichperoxidase
ICL	intrazerebrale Leukozyten
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGTP	induzierbares GTP-bindendes Protein

IL	Interleukin
IMDM	‚Iscove´s modified Dulbecco´s medium‘
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KAHRP	‚knob‘-assoziiertes histidinreiches Protein
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	‚magnetic-activated cell sorting‘
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	‚major histocompatibility complex‘
MIC	<i>T. gondii</i> -Mikronemenprotein
min	Minute
MyD88	‚myeloid differentiation factor 88‘
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTPase	Nukleosidtriphosphathydrolase
OVA	Ovalbumin
PCR	‚polymerase chain reaction‘
PBS	‚phosphate-buffered saline‘
PE	Phycoerythrin
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum</i> - Erythrozytenmembranprotein 1
PfEMP3	<i>P. falciparum</i> - Erythrozytenmembranprotein 3
PI	Propidiumjodid
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der PV
RESA	Oberflächenantigen ringinfizierter Erythrozyten
ROP	<i>T. gondii</i> - Rhoprienprotein
RT	Raumtemperatur
SAG	‚ <i>T. gondii</i> -surface antigen‘
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
S/P	Sulfadoxin/Pyrimethamin

SSC	,side scatter'
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TgKM	<i>T. gondii</i> -konditioniertes Medium
TgPIs	<i>T. gondii</i> Serinproteaseinhibitoren
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TL	<i>T. gondii</i> -Lysat
TLR	,Toll-like receptor'
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhod.-Isothiocyanat
YFP	,yellow fluorescent protein'
V	Volt
v/v	,volume per volume'
w/v	,weight per volume'

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. U. Hadding danke ich, dass er mich für die Mikrobiologie begeistert hat und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Frau PD Dr. G. Reichmann und Herrn Prof. Dr. H.-G. Fischer danke ich sehr für Ihr Vertrauen in mich und dass ich von Ihnen wissenschaftliches Arbeiten lernen durfte.

Herrn Prof. Dr. W. Däubener danke ich für seine großzügige Unterstützung und wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene besonders Alexa und Martin Gastens danke ich sehr für das gute Arbeitsklima, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Meinen Freunden besonders Birgit Kowohl und Miriam Heckmann danke ich für den Rückhalt und die Ermutigungen.

Meiner Familie und vor allem meinem Mann Thorsten Nilges kann ich nicht genug dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt haben und mich selbstlos unterstützt haben.

9 CURRICULUM VITAE

ZUR PERSON

Name:	Anja Nilges geb. Neudeck
Geburtstag:	18.05.1977
Geburtsort:	Gera
Familienstand:	verheiratet

BERUFSTÄTIGKEIT

Seit 09/2004	wiss. Mitarbeiterin der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. med. W.T. Knoefel
Seit 11.11.2009	Fachärztin für Chirurgie

STUDIUM

10/1997-05/2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2008-08/2010	Masterstudium Medical Education an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

SCHULZEIT

1983 – 1991	Oberschule „Erwin Panndorf“, Kleinaga
1991 – 1994	„Willi-Graf“-Realschule, Willich-Schiefbahn
1994 – 1997	„St. Bernhard“-Gymnasium, Willich

DISSERTATION

09/2000-03/2002	„Toxoplasma gondii Antigenexport und – präsentation im Hirn“ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Universitätsklinikum Düsseldorf Betreuer: PD Dr. rer. nat. G. Reichmann Prof. Dr. med. W. Däubener
04/2001 – 03/2002	Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten“
Neuss, 16.06.2011	gez.: Anja Nilges

10 ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt.

Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Neuss, den 16.06.2011

gez.: Anja Nilges

***Toxoplasma gondii* Antigenexport und -präsentation im Hirn**

Anja Nilges

Die während der chronischen Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) im Hirn persistierenden enzystierten Parasiten werden durch parasitenspezifische T-Zellen kontrolliert. Welche Antigene und Mechanismen die Reaktivierung der Parasiten durch kontinuierliche Stimulation der T-Zellen verhindern, ist bislang ungeklärt. GRA (*T. gondii* dense granule) Proteine stellen potente Antigene dar, die eine starke Immunantwort während der Infektion mit *T. gondii* induzieren. Bisherige Befunde lassen auf einen membrangebundenen Export von GRA7 aus der Wirtszelle heraus schließen, wobei die Wirtszellmembran eine mögliche Station des Exportweges darstellt. GRA7, ein Zielantigen der Immunantwort, das in allen infektiösen Stadien von *T. gondii* exprimiert und möglicherweise auf die Wirtszelloberfläche exportiert wird, wäre ein idealer Kandidat durch Stimulation der Immunantwort das Wirt-Parasit-Gleichgewicht während der chronischen Infektion zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit konnte GRA7 an der Oberfläche von Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Bei der genaueren Charakterisierung der GRA7-positiven Zellen zeigten sich infizierte und uninfizierte Zellen GRA7-positiv. Damit wurde die Frage nach einer Anlagerung des GRA7 von außen aufgeworfen. Im Gegensatz zu extrazellulär sezerniertem GRA7 in TgKM (*T. gondii*-konditioniertes Medium) konnte durch Zugabe extrazellulärer Toxoplasmen in hohen Konzentrationen ein GRA7-Signal auf einem geringen Anteil der Fibroblasten gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte somit eine Anlagerung des GRA7 von außen nicht ausgeschlossen werden und ein Export von GRA7 an die Wirtszelloberfläche nicht bewiesen werden.

Dendritische Zellen (DC) spielen eine bedeutende Rolle bei der Initiierung und Regulation der Immunantwort bei der Infektion mit *T. gondii*. Während die Existenz von DC im entzündlich veränderten Hirn als gesichert gilt, ist ihre Rolle bei zellulären Immunreaktionen vor Ort noch unklar. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen erstmals, dass Hirn-DC aus chronisch mit *T. gondii* infizierten Mäusen *ex vivo* ein im Hirn vorhandenes Parasitenantigen präsentieren und damit *T. gondii*-spezifische T-Zellklone MHC-restringiert stimulieren können. Als Parameter für die T-Zellstimulation konnten Proliferation und IFN γ -Sekretion der T-Zellen gemessen werden. Damit ließ sich zeigen, dass Hirn-DC im Mausmodell der Toxoplasmose als APC aktiv sind.

Referent: Prof. Dr. med. W. Däubener