

**Die Interferon- $\gamma$ -unabhängige anti-*T. gondii* Aktivität  
muriner Dendritischer Zellen und ein Zytokinmimikry des  
Parasiten**

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Alexandra Gastens**  
aus Dresden

Düsseldorf  
2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Fischer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2003

Teile dieser Arbeit wurden als Tagungsberichte veröffentlicht:

Schwarzenberg, A.M., Volkman, S., and Fischer, H.G. 2001. A *Toxoplasma gondii* factor that triggers functional maturation of brain dendritic cells. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology. *Immunobiology*. 204: 139

Volkman, S., Schwarzenberg, A.M., Gastens, M.H., Neudeck, A., Reichmann, G., and Fischer H.G. 2001. Evidence for a microglia-to-dendritic cell differentiation pathway. Forum des Sonderforschungsbereich 194, Düsseldorf.

Reichmann, G., Schwarzenberg, A.M., Jander, S., Schlüter, D., and Fischer, H.G. 2002. Brain dendritic cells: origin, maturation, functions. 7th International Symposium on Dendritic cells, Bamberg.

Reichmann, G., Schwarzenberg, A.M., and Fischer, H.G. 2002. GM-CSF is required for intracerebral immunity against *Toxoplasma gondii*. 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, Marburg.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft über das Projekt Re 1334/2-1, Projekt B11 im Sonderforschungsbereich 194 „Struktur und Dysfunktion im Nervensystem“ und das Graduiertenkolleg 320 „Pathologische Prozesse des Nervensystems – Vom Gen zum Verhalten“.

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>2</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.1.1 Biologie .....	2
1.1.2 Stadien im Zwischenwirt.....	3
1.2 Dendritische Zellen .....	4
1.2.1 Definition .....	4
1.2.2 Ontogenese und Subpopulationen .....	5
1.2.3 Antigenpräsentation .....	6
1.2.4 Reifung und Aktivierung Dendritischer Zellen .....	8
1.3 Zelluläre Immunantworten gegen <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.3.1 Akute Abwehr.....	9
1.3.1.1 Rolle von Interleukin-12 .....	10
1.3.1.2 Dendritische Zellen als IL12-Produzenten .....	11
1.3.2 IL12-abhängige Produktion von IFN $\gamma$ .....	11
1.3.3 IFN $\gamma$ -abhängige Effektormechanismen .....	13
1.3.3.1 Produktion von Stickstoffmonoxid.....	13
1.3.3.2 Selektiver Tryptophanverbrauch.....	14
1.3.3.3 Produktion reaktiver Sauerstoff-Intermediate.....	15
1.3.3.4 Selektiver Eisenverbrauch .....	16
1.3.3.5 IGTP-vermittelte Mechanismen .....	16
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	17
<b>2 Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
2.1 Eine parakrine toxoplasmastatische Aktivität von Dendritischen Zellen .....	19
2.1.1 Verschiedene Populationen Dendritischer Zellen hemmen <i>T. gondii</i> in Hirnzellkulturen.....	19
2.1.2 Die antiparasitäre Aktivität Dendritischer Zellen ist unabhängig von ihrem Reifezustand .....	22
2.1.3 Die Rolle der infizierten Wirtszelle.....	24
2.1.3.1 Die Wirtszelle ist beteiligt an der antiparasitären Aktivität.....	25
2.1.3.2 Dendritische Zellen induzieren keine Apoptose in infizierten Wirtszellen .....	27

2.1.4 Die Wirkung der antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen.....	28
2.1.4.1 Die intrazelluläre Proliferation von <i>T. gondii</i> wird durch Dendritische Zellen gehemmt .....	28
2.1.4.2 Die antiparasitäre Aktivität wirkt zytostatisch .....	30
2.1.4.3 Der Effekt ist transient und die Parasiten konvertieren nicht ins Zystenstadium .....	31
2.1.5 Charakteristika der anti- <i>T. gondii</i> Aktivität Dendritischer Zellen .....	34
2.1.5.1 Der Effekt wird nicht durch NO, ROI oder Tryptophan verursacht .....	34
2.1.5.2 Die toxoplasmastatische Aktivität wird sezerniert, ist hitzestabil, Proteinase K resistent und kleiner als 5 kDa .....	39
2.1.5.3 Die anti- <i>T. gondii</i> Aktivität ist im DC-Lysat nachweisbar .....	41
2.2 <i>T. gondii</i> induziert eine Reifung muriner Dendritischer Zellen.....	43
2.2.1 <i>T. gondii</i> Lysat und murines IL4 induzieren in Dendritischen Zellen einen reifen Phänotyp .....	43
2.2.2 Nachweis einer anti-IL4 Reaktivität in Tachyzoiten-Lysat .....	44
2.2.3 Immunoaffinitätschromatographische Anreicherung anti-IL4-reaktiver Proteine.....	45
2.2.4 Identifizierung anti-IL4-reaktiver Proteine im Tachyzoitenproteom.....	47
2.2.5 <i>T. gondii</i> Lysat besitzt keine biologische IL4-Aktivität.....	49
2.2.5.1 <i>T. gondii</i> Lysat induziert keine Proliferation von IL4-Indikatorzellen ...	49
2.2.5.2 <i>T. gondii</i> Lysat induziert die Expression von MHCII-Molekülen auf B-Zellen .....	51
2.2.5.3 <i>T. gondii</i> -Lysat zeigt keine IL4-artige Aktivität .....	52
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>55</b>
3.1 Eine anti- <i>T. gondii</i> Aktivität Dendritischer Zellen.....	55
3.2 Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen, <i>T. gondii</i> und der infizierten Wirtszelle .....	57
3.2.1 Wirkung der Aktivität Dendritischer Zellen auf <i>T. gondii</i> .....	57
3.2.2 Beteiligung der Wirtszelle am antiparasitären Effekt .....	59
3.3 Charakteristika der anti- <i>T. gondii</i> Aktivität Dendritischer Zellen.....	60
3.3.1 Wirkung als Effektormolekül.....	61
3.3.2 Wirkung als Signalmolekül .....	62
3.3.3 Ausschluss bekannter anti- <i>T. gondii</i> Effektormechanismen .....	63

3.3.4 Modell des antiparasitären Effektormechanismus .....	65
3.4 Eine IL4-artige Aktivität von <i>T. gondii</i> .....	67
3.4.1 ‚Molecular mimicry‘ von Wirtsproteinen .....	67
3.4.2 <i>T. gondii</i> induziert die Expression von MHCII-Molekülen auf B-Zellen .....	69
3.4.3 Das IL4-ähnliche <i>T. gondii</i> Protein vermittelt keine IL4-Funktion .....	70
<b>4 Material .....</b>	<b>72</b>
4.1 Allgemeines .....	72
4.2 Proteine .....	72
4.2.1 Antikörper .....	72
4.2.2 Zytokine .....	73
4.2.3 Enzyme .....	73
4.3 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide .....	73
4.4 Medien und Puffer .....	75
4.5 Feinchemikalien .....	76
4.6 Organismen .....	78
4.6.1 Zelllinien .....	78
4.6.2 <i>Toxoplasma gondii</i> Stämme .....	78
4.6.3 Mausstämme .....	78
4.7 Sonstige Geräte und Materialien .....	79
<b>5 Methoden .....</b>	<b>80</b>
5.1 Zellkultur .....	80
5.1.1 Kultivierung von Wirtszellen .....	80
5.1.1.1 L929 Fibroblasten .....	80
5.1.1.2 C6 Hirnzellen .....	81
5.1.1.3 HS27 Fibroblasten .....	81
5.1.1.4 EG2 Hirnzellen .....	81
5.1.1.5 Neonatale Gehirnzellen .....	82
5.1.1.6 86HG39 Hirnzellen .....	82
5.1.2 Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	83
5.1.2.1 <i>In vitro</i> Passage .....	83
5.1.2.2 Toxoplasmen-Proliferationstest .....	84
5.1.2.3 Quantifizierung von infizierten Wirtszellen .....	85

5.1.3 Zellpräparationen .....	86
5.1.3.1 Knochenmarkszellen .....	86
5.1.3.2 Gesamtmilzzellen .....	87
5.1.3.3 Hirn-Leukozyten.....	88
5.1.3.4 Peritonealexsudat-Makrophagen .....	89
5.1.4 Differenzierung myeloider Zellen aus Knochenmarkskulturen .....	90
5.1.4.1 Mastzellen .....	90
5.1.4.2 Dendritische Zellen .....	90
5.1.5 Isolierung Dendritischer Zellen mittels MACS .....	91
5.1.6 Mastzell-Proliferationstest .....	92
5.2 Präparation von Zell-Lysaten .....	92
5.2.1 Toxoplasma-Lysat.....	92
5.2.2 Zell-Lysat.....	93
5.3 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL-Reaktion).....	93
5.4 Molekularbiologische Methoden .....	94
5.4.1 Präparation von Gesamt-RNA.....	94
5.4.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA.....	95
5.4.3 Herstellung von cDNA.....	95
5.4.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	96
5.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	96
5.4.6 Gelelektrophoresen .....	97
5.4.6.1 Agarosegelelektrophorese .....	97
5.4.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	97
5.4.6.3 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	99
5.4.7 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	101
5.4.7.1 Coomassie-Färbung .....	101
5.4.7.2 Silberfärbung .....	101
5.4.7.3 Zink-Imidazol Färbung .....	102
5.4.7.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot) .....	103
5.4.8 Identifizierung einzelner Proteine im 2D-Gel.....	104
5.5 Antigen-Nachweise .....	105
5.5.1 Immunonachweis von Proteinen .....	105
5.5.2 Immunoaffinitätschromatographie .....	105
5.5.3 ‚Enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA).....	106

---

5.5.4 Immunfluoreszenzanalysen.....	107
5.5.5 Durchflusszytometrischer Nachweis von Zelloberflächen-Antigenen .....	108
5.6 Nachweis von Effektormolekülen.....	109
5.6.1 Stickstoffmonoxid .....	109
5.6.2 Wasserstoffperoxid.....	110
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>126</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	126
7.2 Danksagung.....	129
7.3 Eidesstattliche Erklärung .....	130

## Zusammenfassung

*Toxoplasma gondii* ist ein intrazellulärer Parasit, der im Zwischenwirt lebenslang persistiert. Hier wird die Infektion durch die zelluläre Immunabwehr kontrolliert. Die vorliegende Arbeit analysiert die Interaktion zwischen *T. gondii* und den Dendritischen Zellen (DC) des Immunsystems. DC spielen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Regulation einer Immunantwort, eine Funktion als antimikrobielle Effektorzelle ist bislang unerforscht. Im Mausmodell der *T. gondii*-Infektion wird eine antiparasitäre Aktivität Dendritischer Zellen sowie ein parasitäres Zytokinhomolog näher charakterisiert.

Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass DC partiell das Wachstum von *T. gondii* in vielen Zelltypen hemmen. Verschiedene DC-Populationen hemmen gleichermaßen das Parasitenwachstum unabhängig von ihrer Herkunft und dem Reifegrad der Zellen. In einem Doppelkammer-Kokultursystem wurde gezeigt, dass DC konstitutiv einen Faktor freisetzen, der die intrazelluläre Replikation von *T. gondii* Tachyzoiten, nicht jedoch ihre Invasion in Wirtszellen hemmt. Die Toxoplasma-Tachyzoiten durch DC geschieht spontan und erfordert keine Voraktivierung. An der Hemmwirkung ist die Wirtszelle beteiligt, die dabei selbst nicht apoptotisch wird. Die parakrine Aktivität der DC beruht auf keinem der bekannten antimikrobiell wirksamen Effektormoleküle, der lösliche Faktor ist hitzestabil, molekular kleiner als fünf kDa und proteaseresistent. Während alle beschriebenen antimikrobiellen Abwehrmechanismen in den Effektorzellen durch Interferon- $\gamma$  induziert werden, ist die anti-*T. gondii* Aktivität Dendritischer Zellen unabhängig von diesem Zytokin.

Molekular nicht identifizierte Komponenten aus Tachyzoitenlysat induzieren in DC eine Reifung, wie sie während der Differenzierung *in vitro* unter dem Einfluss von Interleukin-4 (IL4) stattfindet. Mit Antikörpern gegen das murine IL4 wurde eine Kreuzreaktivität mit *T. gondii* Lysatproteinen nachgewiesen. Weder das Lysat noch daraus aufgereinigte Fraktionen zeigten dagegen IL4-Bioaktivität. Ein IL4-ähnliches *T. gondii* Protein kann somit als Reifungssignal für DC ausgeschlossen werden.

In der akuten Phase einer *T. gondii*-Infektion sind DC die Auslöser Interferon- $\gamma$ -abhängiger Abwehrreaktionen durch andere Immunzellen. Die hier beschriebene Effektorfunktion von DC könnte einen direkten Abwehrmechanismus darstellen, der während der akuten und der chronischen Phase in befallenen Organen lokal an den Entzündungsherden wirksam ist.

## 1 Einleitung

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

#### 1.1.1 Biologie

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit. Als Verursacher der Toxoplasmose bei Immunsupprimierten und Neugeborenen hat *T. gondii* in den letzten Jahren an medizinisch-klinischer Bedeutung gewonnen. Der Erreger wurde erstmals 1908 aus dem nordafrikanischen Nager *Ctenodactylus gundi* isoliert (Nicolle und Manceaux, 1908). Taxonomisch wird *T. gondii* dem Stamm Sporozoa/Apicomplexa und hier der Subklasse Coccidia zugeordnet (Mehlhorn und Walldorf, 1988). *Toxoplasma gondii* infiziert Katzen als Endwirt und andere Warmblüter, z.B. Mensch oder Maus, als Zwischenwirte. Der Name *Toxoplasma* (*toxon*, griechisch Bogen, *plasma*, griechisch Form) rührt von der sichelförmigen Gestalt des Tachyzoitenstadiums her.

Der Stamm Apicomplexa ist durch die Bildung infektiöser Sporozoen gekennzeichnet. Alle Apicomplexa weisen einen dreiphasigen Lebenszyklus auf. Die erste Phase ist die sexuelle Vermehrung im Darm des Endwirts, die zweite Phase die Sporulation der Oozyste, die im Freien abgeschlossen wird. Bei der dritten Phase des Lebenszyklus handelt es sich um die asexuelle Vermehrung des Parasiten, die im Körper von Zwischenwirten ausgehend vom Darm stattfindet. *Toxoplasma gondii* bildet drei infektiöse Stadien aus: das Tachyzoitenstadium, das sich nicht sexuell vermehrt und das Bradyzoitenstadium, das in Gewebezysten vorliegt und sich ebenfalls nur asexuell vermehren kann. Das dritte Stadium sind Sporozoen, die aus einer sexuellen Vermehrung hervorgehen. Im Darm des Endwirts dringt der Parasit in Darmzellen ein, durchläuft hier mehrere Teilungen und differenziert zu Mikro- und Makrogametozyten, die schließlich zur diploiden Oozyste fusionieren. Im Freien findet die Reduktionsteilung der Oozyste zu acht hochinfektiösen Sporozoen statt (Frenkel, 1973). In den Endwirt gelangt der Parasit durch orale Aufnahme von Sporozoen oder Gewebezysten. Zwischenwirte nehmen die Erreger durch orale Aufnahme von Oozysten und Gewebezysten auf bzw. durch vertikale Übertragung von Tachyzoiten während der Schwangerschaft. Ausgehend von der Darmwand

verbreitet sich der Parasit über Zellen des Blut- und Lymphsystems und infiziert schließlich Zellen in anderen Geweben des Wirtsorganismus (Ajioka *et al.*, 2001).

Die Invasion der Wirtszelle ist ein aktiver Prozess, der nur 15 Sekunden dauert (Smith, 1995). Dabei spielt der Apikalkomplex, der das taxonomische Kriterium für die Zuordnung von *T. gondii* zum Stamm der Apicomplexa ist, eine wichtige Rolle. Der Apikalkomplex liegt am apikalen Ende des Parasiten. Als charakteristische Strukturen finden sich im Apikalkomplex von *T. gondii* das Conoid und die sekretorischen Organellen Rhoptrien und Mikronemen. Das Conoid, ein stumpfer hohler Kegel, wird von den Polarringen umgeben und kann während der Invasion vor und zurück geschoben werden sowie kreisende Bewegungen ausführen. Damit spielt das Conoid wahrscheinlich eine Rolle bei der Invasion der Wirtszelle (Morrissette und Sibley, 2002).

Nach dem Eindringen in die Wirtszelle ist der Parasit von einer parasitophoren Vakuole (PV) umgeben. Die parasitophore Vakuole besteht zu 85% aus der eingestülpten Wirtszellmembran. Aus dieser werden Transmembranproteine und membranassoziierte Wirtsproteine sehr schnell entfernt und unter anderem durch Rhoptrienproteine ersetzt (Joiner und Roos, 2002). Die Modifikation der PV-Membran durch *T. gondii* verhindert, dass die Vakuole mit endozytotischen Kompartimenten des Wirts fusioniert und ihr Inhalt in Lysosomen degradiert wird (Hakansson *et al.*, 2001). Damit stellt die PV ein sicheres Kompartiment dar, in dem der Parasit seine intrazelluläre Replikation durchführen kann.

### 1.1.2 Stadien im Zwischenwirt

In seinem Zwischenwirt vermehrt sich *T. gondii* ausschließlich ungeschlechtlich. In der akuten Phase, ein bis zwei Wochen nach Infektion, vermehrt sich der Parasit als Tachyzoit in allen kernhaltigen Wirtszellen. Tachyzoiten sind ein schnell proliferierendes Stadium, das nach 48 Stunden seine Wirtszelle lysiert. Tachyzoiten tragen als spezifische Oberflächenantigene das ‚surface antigen‘ (SAG) 1 und SAG2 (Kasper *et al.*, 1985). Nach der akuten Phase der Infektion folgt, hervorgerufen durch die einsetzende Immunantwort, die chronische Phase der Infektion, in der *T. gondii* in ein langsam wachsendes Stadium, den Bradyzoiten, konvertiert. Bradyzoiten liegen in Gewebezysten vor. Durchschnittlich erreicht eine reife Zyste einen Durchmesser

von 50 bis 70  $\mu\text{m}$  und enthält 1000 bis 2000 Bradyzoiten (Weiss und Kim, 2000). In diesen Gewebezysten persistiert *T. gondii* vermutlich lebenslang im Wirt. Auch Bradyzoiten exprimieren spezifische Antigene wie das zytoplasmatische ‚bradyzoite antigen‘ (BAG) 1 oder das Oberflächenantigen SAG4 (Bohne *et al.*, 1995; Odberg-Ferragut *et al.*, 1996). Anhand dieser Marker können die Stadien voneinander unterschieden werden.

*Toxoplasma gondii* Isolate werden in drei spezieinterne Gruppen klassifiziert. Die Einteilung basiert auf dem Genotyp und biochemischen Isoenzym-Analysen verschiedener Isolate aus Mensch und Tier (Darde *et al.*, 1988; Darde *et al.*, 1992; Howe und Sibley, 1995). Gruppe I-Isolate sind virulent in der Maus. Für diese Isolate ist die letale Dosis, bei der 100% Mortalität auftritt, kleiner als 10 Parasiten (Sibley und Boothroyd, 1992). Isolate der Gruppen II und III sind schwach virulent in der Maus und die Infektionsdosis, bei der 50% Mortalität auftritt, liegt bei über 1000 Parasiten (Howe und Sibley, 1995).

## 1.2 Dendritische Zellen

### 1.2.1 Definition

Dendritische Zellen wurden 1973 von Ralph M. Steinman entdeckt, der sie in der Milz von Mäusen fand, und erkannte, dass sie Teil des Immunsystems sind (Steinman und Cohn, 1973). Aufgrund ihrer spitzen, astförmigen Fortsätze wurden sie als „Dendritische“ Zellen bezeichnet (*dendros*, griechisch Baum). Dendritische Zellen (DC) spielen eine Schlüsselrolle in der Initiierung und Amplifikation einer angeborenen oder adaptiven Immunantwort (Banchereau und Steinman, 1998). Die angeborene Immunantwort ist charakterisiert durch die Fähigkeit, Pathogene und/oder Gewebeschädigungen rasch zu erkennen und das Signal für die Gefahr an Zellen des adaptiven Immunsystems weiterzuleiten. Ein Schlüsselmerkmal der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Dendritische Zellen prägen aber auch das Immunsystem, körpereigene Strukturen zu tolerieren und nicht anzugreifen (Zal *et al.*, 1994).

Dendritische Zellen entstehen kontinuierlich aus hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks. Unreife Vorläufer zirkulieren im Blut, um dann die Haut, Schleimhäute und Organe zu infiltrieren. Als unreife Zellen verfügen DC über eine

hohe phagozytische Aktivität. Nach einer Gewebeschädigung durch Verletzung oder Infektion nehmen diese unreifen DC Antigene auf und wandern zu lymphoiden Organen, wo sie antigenspezifische T-Zellen aktivieren und Immunreaktionen auslösen. In der Interaktion mit T-Zellen reifen DC zu perfekten antigen-präsentierenden Zellen. Dendritische Zellen präsentieren  $CD4^+$  T-Helferzellen Antigen, welche wiederum Effektorzellen stimulieren können, wie z.B. antigenspezifischen B-Zellen und  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen oder Makrophagen, eosinophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die antigenunspezifisch reagieren (Banchereau *et al.*, 2000).

## 1.2.2 Ontogenese und Subpopulationen

Mindestens zwei verschiedene Subpopulationen Dendritischer Zellen mit jeweils eigener Ontogenese wurden in der Maus identifiziert. DC entwickeln sich sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen. Hinweise für einen myeloiden Ursprung der DC stammen hauptsächlich aus Studien *in vitro*, in denen nach Zugabe des Zytokins ‚granulocyte/macrophage colony-stimulating factor‘ (GM-CSF) zu Knochenmarkszellkulturen myeloide DC herangezüchtet worden sind (Inaba *et al.*, 1992). Unabhängig davon können DC aber auch aus lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren (Vremec *et al.*, 1992). Durch Transfer von aufgereinigten lymphoiden Vorläuferzellen in bestrahlte Mäuse wurde gezeigt, dass zwar T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und  $CD8\alpha^+$  DC gebildet wurden, aber keine  $CD8\alpha^-$  DC des myeloiden Subtyps (Ardavin *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1996).

Lymphoide und myeloide DC unterscheiden sich in ihrem Phänotyp, der Lokalisation in lymphatischen Organen und ihrer Funktion. In der Maus exprimieren DC beider Subpopulationen den Oberflächenmarker CD11c, eine  $\alpha^X$ -Untereinheit des Integrins Komplementrezeptor (CR) 4 (Larson und Springer, 1990). Außerdem tragen DC T-Zell-costimulatorische Moleküle wie CD40 und CD80/86 auf ihrer Oberfläche. Zur Präsentation von Antigenen dienen Moleküle des Haupt-Histokompatibilitätskomplex Klasse II (MHCII), die ebenfalls auf der Oberfläche von DC exprimiert werden. Bis heute ist der zuverlässigste Marker zur Unterscheidung der beiden Subpopulationen das  $CD8\alpha$ -Molekül (Vremec *et al.*, 1992).  $CD8\alpha$  wird als Homodimer nur auf lymphoiden nicht aber auf myeloiden DC exprimiert (Wu *et al.*, 1996). Ein weiterer

Marker, der zur Unterscheidung der beiden DC-Subpopulationen dient, ist CD11b, die  $\alpha^M$ -Untereinheit des Integrins Komplementrezeptor (CR) 3, die nur auf myeloiden Zellen exprimiert wird (Beller *et al.*, 1982).

Lymphoide DC sind in den T-Zell-reichen Gebieten der so genannten ‚periarteriolar lymphoid sheath‘ (PALS) Region der Milz und der Lymphknoten lokalisiert (Steinman *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu befinden sich myeloide DC im Randbereich der weißen Pulpa der Milz. Unter dem Einfluss von mikrobiellen Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS) (De Smedt *et al.*, 1996) oder Parasitenextrakten (Sousa *et al.*, 1997) können auch myeloide DC in die PALS einwandern. *In vivo* scheinen beide DC-Subpopulationen antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleichermaßen effizient zu aktivieren (Banchereau *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Antigenpräsentation

Ein wichtiges Unterscheidungskriterium von Differenzierungsstadien Dendritischer Zellen ist ihre Mobilität (Austyn *et al.*, 1988). Nach dem derzeit gültigen Konzept wandern Dendritische Zellen vom Knochenmark zu peripheren Geweben, wo sie fremde Moleküle aufnehmen. Noch während sie das aufgenommene Material als Antigen aufbereiten, wandern die Zellen über die Blutbahn in die Milz oder über Lymphgefäße zu den Lymphknoten. Dort schließen sie ihren Reifeprozess ab und präsentieren die mit Antigen beladenen MHC-Moleküle anderen Zellen des Immunsystems, z.B. naiven T-Helferzellen (Banchereau und Steinman, 1998).

Unreife DC sind besonders effizient bei der Aufnahme von Mikroorganismen oder deren Molekülen, sie verfügen über verschiedene Mechanismen zur Antigenaufnahme. Fremdmoleküle können über Makropinozytose aufgenommen werden, einen Prozess, bei dem pinozytische Vesikel gebildet werden, die sie umgebende Flüssigkeit und gelöste Antigene beinhalten (Sallusto *et al.*, 1995). Partikuläre Strukturen können über Rezeptoren auf der Oberfläche gebunden und durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Der C-Typ Lectin-Rezeptor (Mannose-Rezeptor, DEC-205) (Engering *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1995) und der Fc $\gamma$  Rezeptor Typ I (CD64) und II (CD32) (Fanger *et al.*, 1996) spielen dabei eine wichtige Rolle. Ein dritter Mechanismus ist die Phagozytose, bei der apoptotische und nekrotische Zellfragmente (Albert *et al.*, 1998), Viren und Bakterien

(Inaba *et al.*, 1993; Rescigno *et al.*, 1999), Parasiten (Moll, 1993) sowie Partikel wie Latexkügelchen (Matsuno *et al.*, 1996) über sich einstülpende Membransäckchen aufgenommen werden. Die Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme durch DC sind so effiziente Prozesse, dass pico- bis nanomolare Konzentrationen des Antigens zur Prozessierung ausreichen. Im Gegensatz dazu benötigen andere antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und B-Zellen mikromolare Konzentrationen (Sallusto *et al.*, 1995). Nachdem DC Antigen internalisiert haben, nimmt ihre Aufnahmefähigkeit für weitere Antigene schnell ab. Danach beginnt die Prozessierung der Antigene und es werden Antigen-MHCII-Molekülkomplexe gebildet. Dendritische Zellen sind in der Lage große Mengen von MHCII-Peptid-Komplexen innerhalb eines kurzen Zeitraums zu synthetisieren. Sie besitzen MHCII-haltige Kompartimente, in denen diese Komplexe ständig gebildet werden (Pierre *et al.*, 1997). Während der Reifung der DC wandeln sich die MHCII-haltigen Kompartimente zu nicht-lysosomalen Vesikeln um, die ihre MHC-Peptid-Komplexe an die Oberfläche entlassen (Cella *et al.*, 1997; Pierre *et al.*, 1997). Die Präsentation von MHCII-Molekülen und costimulatorischen Molekülen (CD40, CD80) auf der Zelloberfläche ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Aktivierung von T-Zellen durch DC.

Zur Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> Killerzellen, die die Fähigkeit besitzen infizierte Zellen, Transplantate und Tumorzellen zu eliminieren, müssen DC Antigenpeptide auf MHC Klasse I Molekülen präsentieren. Die Antigenbeladung kann sowohl durch endogen als auch exogen aufgenommene Antigene erfolgen (Pamer und Cresswell, 1998). Die endogene Antigenaufnahme erfolgt bei Infektion der DC durch z.B. Influenza-Viren. Dabei verwendet das Virus die Zellmaschinerie um virale Proteine zu synthetisieren, die wie zelluläre Proteine in Peptide degradiert werden. Ein Peptidtransporter transportiert diese Peptide vom Zytosol zum endoplasmatischen Retikulum, wo sie an MHCI-Moleküle binden. Die peptidbeladenen MHCI-Komplexe wandern zur Oberfläche und präsentieren Antigen an T-Zellen. Die Präsentation von exogen aufgenommenen Antigenen ist noch unzureichend verstanden. Es ist jedoch gezeigt, dass DC Peptide von nicht-replizierenden Mikroben (Bender *et al.*, 1995) und sterbenden infizierten Zellen (Albert *et al.*, 1998) auf MHCI-Molekülen präsentieren.

### 1.2.4 Reifung und Aktivierung Dendritischer Zellen

Über Membranmoleküle, wie CD40 oder Zytokinrezeptoren, z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- und Interleukin (IL)-1, können DC aktiviert werden. Diese Aktivierungssignale steuern die Umwandlung von unreifen antigenaufnehmenden DC zu reifen antigenpräsentierenden DC. Die Reifung ist ein kontinuierlicher Prozess, der in der Peripherie durch die Antigenaufnahme und/oder inflammatorische Zytokine initiiert wird. Komplettiert wird der Prozess durch die Interaktion der DC mit T-Zellen. T-Zellen aktivieren DC, in dem der CD40-Ligand der T-Zellen an CD40 auf der DC-Oberfläche bindet. Die Folge ist eine erhöhte Expression von CD80, CD86 und eine Induktion der Zytokinproduktion in DC. Neben T-Zellen stimulieren auch pathogen-spezifische Moleküle wie Lipopolysaccharid (LPS) (Rescigno *et al.*, 1999), bakterielle DNA (Akbari *et al.*, 1999; Hacker *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999) und doppelsträngige RNA (Cella *et al.*, 1999) die Reifung Dendritischer Zellen. Die Konzentrationen von proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Signalen in der lokalen Mikroumgebung der DC, wie z.B. TNF, IL1, IL6, IL10, ‚transforming growth factor‘ (TGF)- $\beta$  und Prostaglandine, können ebenfalls einen Einfluss auf die DC-Aktivierung haben. Reife DC haben nach dem Aktivierungsprozess veränderte Eigenschaften. Endozytotische und phagozytotische Rezeptoren gehen verloren, T-Zell-costimulatorische Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86, werden verstärkt exprimiert. Die Zellmorphologie verändert sich dahingehend, dass verstärkt dendritische Fortsätze ausgebildet werden (Banchereau *et al.*, 2000). Nach der Interaktion mit Lymphozyten wird in DC Apoptose induziert (Winzler *et al.*, 1997).

Ein weiteres Markermolekül Dendritischer Zellen ist CD83. CD83 ist ein 45 kDa Glycoprotein, das zur Immunglobulin-Familie gehört und überwiegend auf der Oberfläche von DC exprimiert wird (Zhou *et al.*, 1992). Bei der Charakterisierung der DC im humanen System gilt CD83 als DC-Reifungsmarker (Zhou und Tedder, 1996). Jüngst gelang es, auch das murine CD83 zu klonieren und biochemisch zu charakterisieren (Berchtold *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass auch in der Maus die Expression von CD83 mit der Expression costimulatorischer Moleküle auf den DC korreliert (Berchtold *et al.*, 1999).

### 1.3 Zelluläre Immunantworten gegen *Toxoplasma gondii*

Die Entwicklung einer zellulären Immunantwort ist essentiell für die Kontrolle der Infektion durch *T. gondii*. Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems sind daran beteiligt. In den letzten zwei Jahrzehnten gab es große Fortschritte bei der Aufklärung der Frage, welche Rolle Zytokine in der Initiierung und Aufrechterhaltung einer protektiven Immunität gegen *T. gondii* spielen. Interferon (IFN)- $\gamma$  gilt dabei als wichtigster Vermittler der Immunabwehr gegen diesen Erreger. Viele verschiedene Zelltypen sind an der Abwehr und der Kontrolle des Parasiten entweder als IFN $\gamma$ -Produzenten oder IFN $\gamma$ -responsive Zellen beteiligt (Lieberman und Hunter, 2002).

#### 1.3.1 Akute Abwehr

Nach einer Infektion mit *T. gondii* erzeugen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems eine aufeinander abgestimmte Antwort, die schließlich eine Resistenz gegen den Parasiten bewirkt. Sofortreaktionen des angeborenen Immunsystems stellen die erste Abwehr während der akuten Phase der Infektion dar. Zugleich wird dabei die sich aufbauende Antwort des adaptiven Immunsystems beeinflusst, die letztlich die Aufrechterhaltung eines dauerhaften Schutzes des infizierten Wirtsorganismus gewährleistet (Lieberman und Hunter, 2002). Durch die frühe Produktion von IL12 werden NK-Zellen zur Produktion von IFN $\gamma$  stimuliert. Dieser T-Zell-unabhängige Abwehrmechanismus während der akuten Phase der Infektion ist entscheidend für eine wirksame Kontrolle der Infektion. Diese Befunde wurden mit Hilfe von SCID („severe combined immune deficiency“)-Mäusen gewonnen. SCID-Mäuse können keine T- und B-Zellen ausbilden, weisen aber normale Populationen von NK-Zellen auf. Infektionen von SCID-Mäusen mit *T. gondii* wiesen auf einen IFN $\gamma$ -abhängigen Abwehrweg hin (Sher *et al.*, 1993), der einen begrenzten Schutz bei Infektion mit einem avirulenten *T. gondii* Stamm bot (Hunter *et al.*, 1994). Reaktionen des angeborenen Immunsystems sind zwar wichtig für die frühe Kontrolle der Parasitenvermehrung während der akuten Phase der Infektion, aber nicht ausreichend während der chronischen Phase der Infektion. In dieser Phase sind T-Zellen essentiell für das Überleben infizierter Mäuse. SCID-Mäuse

sterben innerhalb von 20 Tagen nach Infektion, wenn ihnen nicht vor der Infektion T-Zellen transplantiert worden (Beaman *et al.*, 1994). Weitere Befunde zeigten, dass sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aufgrund ihrer Fähigkeit IFN $\gamma$  zu produzieren, notwendig sind für die Resistenz in der akuten und chronischen Phase einer *T. gondii* Infektion (Gazzinelli *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1991).

### 1.3.1.1 Rolle von Interleukin-12

Interleukin (IL)-12 ist das Schlüsselzytokin während der Induktion der zellvermittelten Immunität gegen intrazelluläre Pathogene. Bei der Antwort des angeborenen Immunsystems auf diese Pathogene induziert IL12 in NK- und T-Zellen die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Gleichzeitig fördert IL12 die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) des Typs 1, die IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach Antigenstimulation sezernieren. Die frühe Produktion von IL12 ist einerseits der zentrale Vorgang in der Antwort des angeborenen Immunsystems auf das Pathogen und prägt andererseits die darauf aufbauende adaptive Immunantwort (Trinchieri, 1995). Damit ist IL12 essentiell während der akuten Phase der Infektion und für die Erhaltung von Langzeit-Abwehrmechanismen und parasitspezifischer T-Zellantwort. Eine Neutralisierung von IL12 mit anti-IL12-Antikörpern während der akuten Phase der Infektion mit *T. gondii* resultiert in 100% Mortalität in Mäusen, die mit einem avirulenten Stamm infiziert worden sind. Damit korreliert eine reduzierte Produktion von IFN $\gamma$ . Die Neutralisierung von IL12 während der chronischen Phase der Infektion hat hingegen keine erhöhte Mortalität zur Folge (Gazzinelli *et al.*, 1994). Dagegen zeigten Studien, in denen *IL12*-defiziente Mäuse zu Beginn der Infektion mit IL12 behandelt wurden, dass die Mäuse sehr wohl eine schützende T-Zell Antwort ausbilden können. Nach Beendigung der IL12-Behandlung entwickeln diese Mäuse eine letale Toxoplasma-Enzephalitis, die mit einer verminderten IFN $\gamma$ -Antwort assoziiert ist (Yap *et al.*, 2000). Interleukin-12 ist somit sowohl notwendig für die Kontrolle der akuten als auch der chronischen Infektion.

### 1.3.1.2 Dendritische Zellen als IL12-Produzenten

Neben neutrophilen Granulozyten sind DC eine Quelle von IL12 während einer Infektion von Mäusen mit *T. gondii* (Bliss *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 1997). Nach Injektion von löslichen *T. gondii*-Extrakten wurden IL12-exprimierende Zellen in den T-Zell Gebieten der Milz gefunden. Diese DC sind durch die Expression von CD8 $\alpha$ , CD11c und DEC205 charakterisiert. Der Chemokinrezeptor (CCR) 5, der auf der Oberfläche von DC exprimiert ist, induziert eine Wanderung dieser Zellen zu den T-Zell-Arealen der Milz als Reaktion auf die Injektion von Toxoplasmaextrakt (Sousa *et al.*, 1997). Die Signalübertragung mittels CCR5 spielt eine wichtige Rolle bei der IL12-Antwort in Mäusen, die mit *T. gondii* infiziert wurden (Aliberti *et al.*, 2000). CCR5-defiziente Mäuse sind hoch-suszeptibel gegenüber einer *T. gondii* Infektion, wobei die IL12-Produktion von DC beeinträchtigt ist (Aliberti *et al.*, 2000).

Während der chronischen Phase der Infektion findet man Zellen, die die DC-Marker CD11c und 33D1 exprimieren, an den Entzündungsherden im Gehirn der Maus (Fischer *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Expression von MHCII, CD40, CD54, CD80 und CD86 Molekülen auf der Zelloberfläche und der Fähigkeit, eine antigenspezifische T-Zellantwort zu induzieren, zeigen diese DC aus dem Hirn einen reifen Phänotyp. DC sind die Hauptproduzenten von IL12 in der Leukozytenpopulation, die aus dem Gehirn infizierter Mäuse isoliert worden ist (Fischer *et al.*, 2000). Da IL12 die Aufrechterhaltung der T-Zell-vermittelten IFN $\gamma$ -Produktion während der chronischen Infektion fördert (Yap *et al.*, 2000), könnten DC im Hirn von infizierten Mäusen eine wichtige Rolle für eine protektive T-Zellantwort im Hirn spielen.

### 1.3.2 IL12-abhängige Produktion von IFN $\gamma$

Wie im vorhergehenden Abschnitt (1.3.1) beschrieben, ist IL12 das Schlüsselzytokin der Immunabwehr in der akuten Phase der Infektion gegen intrazelluläre Pathogene. Durch IL12 werden weitere Zellen des Immunsystems stimuliert, IFN $\gamma$  zu produzieren. Durch IFN $\gamma$  werden verschiedene Abwehrmechanismen in anderen Zellen induziert, die die Resistenz gegen *T. gondii* ermöglichen (Suzuki, 2002). Im Folgenden werden die verschiedenen IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen vorgestellt.

T-Zellen: CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind notwendig für die Resistenz gegen *T. gondii*. T-Zell-defiziente Nackt- und Lymphozyten-defiziente SCID-Mäuse, die keine T-Zellen haben, erliegen einer akuten Infektion mit *T. gondii* (Johnson, 1992). Die Mortalität dieser Mäuse geht einher mit einer übermäßigen Vermehrung von Tachyzoiten in verschiedenen Organen, inklusive des Hirns (Suzuki, 2002). CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind das wichtigste Element der protektiven zellulären Immunantwort, obwohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls involviert sind. Die schützende Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird primär durch IFN $\gamma$  vermittelt. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheinen die Hauptproduzenten von IFN $\gamma$  während der akuten Phase der Infektion zu sein (Suzuki und Remington, 1988). Sowohl CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von infizierten Mäusen können nach Antigenstimulation mit Tachyzoitenlysat *in vitro* IFN $\gamma$  produzieren. IFN $\gamma$  spielt ebenfalls eine sehr wichtige Rolle bei der Prävention einer Toxoplasma-Enzephalitis während der chronischen Phase der Infektion (Gazzinelli *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1989). Die Neutralisation von IFN $\gamma$  durch Behandlung infizierter Tiere mit anti-IFN $\gamma$ -Antikörpern resultiert in einer massiven Enzephalitis und der Entwicklung großer nekrotischer Herde im Hirn (Suzuki *et al.*, 1989). In diesen Arealen wurden viele Tachyzoiten gefunden, was darauf hinweist, dass die lokale Entzündung auf eine unkontrollierte Vermehrung von Tachyzoiten zurückzuführen ist (Gazzinelli *et al.*, 1993). CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wandern nach einer Infektion ins Hirn ein. Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen synergistisch wirken, um der Entwicklung einer Toxoplasma-Enzephalitis vorzubeugen (Gazzinelli *et al.*, 1992).

NK-Zellen: NK-Zellen sind eine wichtige Quelle für IFN $\gamma$  bei der Immunabwehr gegen *T. gondii* während der akuten Infektionsphase. Die Depletion von NK-Zellen resultiert in einer frühen bzw. erhöhten Mortalität in SCID- und Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz zur akuten Infektion, sind NK-Zellen an der Abwehr einer Toxoplasma-Enzephalitis während der chronischen Phase der Infektion kaum beteiligt. Neuere Studien zeigen, dass SCID-Mäuse, denen T-Zellen adoptiv übertragen wurden, die Entwicklung einer Toxoplasma-Enzephalitis verhindern konnten. Auch nach Depletion von NK-Zellen sind diese Mäuse in der Lage die Infektion zu kontrollieren (Kang und Suzuki, 2001).

Andere, noch nicht identifizierte, IFN $\gamma$ -produzierende Zellen: Im Mausmodell wurde gezeigt, dass IFN $\gamma$ -produzierende Zellen, die nicht T-Zellen und nicht NK-Zellen sind, im Hirn notwendig sind für den Schutz vor einer Reaktivierung einer *T. gondii*

Infektion (Kang und Suzuki, 2001). Nackt-, SCID- und  $IFN\gamma$ -defiziente Mäuse wurden mit *T. gondii* infiziert und mit Sulfadiazin behandelt, so dass diese Tiere die akute Phase der Infektion überleben. Nach Abbruch der Sulfadiazinbehandlung entwickeln die Tiere eine schwere Toxoplasma-Enzephalitis, die zum Tod der Tiere führt. Wenn die T-Zell-defizienten Tiere vor Beendigung der Sulfadiazinbehandlung durch adoptive Übertragung von Milz- oder T-Zellen rekonstituiert worden sind, so entwickeln sie keine Enzephalitis und überleben.  $IFN\gamma$ -defiziente Mäuse hingegen sterben trotz der Transplantation der Zellen (Kang und Suzuki, 2001). Vor der Zellübertragung wurde  $IFN\gamma$  mRNA in den Hirnen der infizierten Mäuse gefunden, nicht jedoch in  $IFN\gamma$ -defizienten Mäusen.  $IFN\gamma$  mRNA wurde auch in SCID-Mäusen nachgewiesen, denen zuvor NK-Zellen depletiert worden waren. Diese Tiere entwickeln nach T-Zelltransfer ebenfalls keine Toxoplasma-Enzephalitis (Kang und Suzuki, 2001). Demnach gibt es neben T-Zellen und NK-Zellen andere Zellen im Hirn, die  $IFN\gamma$  produzieren und benötigt werden, um eine Reaktivierung der Infektion zu verhindern.

### 1.3.3 $IFN\gamma$ -abhängige Effektormechanismen

$IFN\gamma$  ist absolut notwendig für die Immunabwehr einer akuten Infektion durch *T. gondii* und den Schutz vor einer Toxoplasma-Enzephalitis während der chronischen Phase. Verschiedene Populationen von T-Zellen und Nicht-T-Zellen sind wichtige Quellen von  $IFN\gamma$ . In Abwesenheit von  $IFN\gamma$  können T-Zellen eine Toxoplasma-Enzephalitis nicht verhindern (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). Verschiedene  $IFN\gamma$ -vermittelte Abwehrmechanismen kontrollieren den Parasiten in Phagozyten und in nicht phagozytierenden Zellen (Suzuki, 2002).

#### 1.3.3.1 Produktion von Stickstoffmonoxid

Aktiviert Makrophagen können intrazelluläre Tachyzoiten abtöten. Dass diese Aktivierung  $IFN\gamma$ -abhängig ist, wurde durch Neutralisierungsexperimente mit anti- $IFN\gamma$ -Antikörpern gezeigt. Isolierte Makrophagen werden durch Inkubation mit  $IFN\gamma$

und  $\text{TNF}\alpha$  aktiviert und hemmen dann die intrazelluläre Proliferation von Tachyzoiten. Diese Hemmung beruht auf der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Ding *et al.*, 1988). Analysen in der Maus zeigten dagegen eine relativ geringe Bedeutung der NO-Produktion für die Abwehr während der akuten Phase. Mäuse, die keinen TNF-Rezeptor 1 und 2 (Yap *et al.*, 1998) bzw. keine iNOS exprimieren (Scharton-Kersten *et al.*, 1997), kontrollieren das Parasitenwachstum in der Bauchhöhle nach intraperitonealer Infektion. Übereinstimmend dazu gibt es Befunde mit Mäusen, denen der  $\text{IFN}\gamma$ -regulatorischer Faktor 1 (IRF-1) fehlt, der essentiell für die iNOS-Induktion durch  $\text{IFN}\gamma$  ist (Khan *et al.*, 1996). *IRF-1*-defiziente Mäuse überleben ähnlich wie TNF-Rezeptor 1 und 2- und *iNOS*-defiziente Mäuse die akute Phase der Infektion wegen eines iNOS-unabhängigen antiparasitären Mechanismus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass schützende Mechanismen während der akuten Phase zwar  $\text{IFN}\gamma$ -nicht aber  $\text{TNF}\alpha$ - oder iNOS-abhängig sind. Im Gegensatz zur Situation während der akuten Phase sind *iNOS*<sup>-/-</sup> Mäuse hochsuszeptibel für die chronische Infektion. Dieser Befund unterstreicht, dass NO notwendig ist, um die Proliferation von Tachyzoiten im Gehirn zu unterbinden. NO produzierende Zellen im Gehirn sind sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten. Murine Mikrogliazellen inhibieren *in vitro* die intrazelluläre Toxoplasma-Proliferation nach  $\text{IFN}\gamma$  und LPS Stimulation (Chao *et al.*, 1993). NO vermittelt diesen inhibitorischen Effekt. Dies wurde durch die Behandlung der Zellen mit N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginin, das als Substratanalog die iNOS hemmt, gezeigt. Nach einer solchen Behandlung wurde keine Hemmung des intrazellulären Wachstums der Toxoplasmen in aktivierten Mikrogliazellen mehr beobachtet. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Toxoplasmenhemmung durch  $\text{IFN}\gamma$ - und  $\text{TNF}\alpha$ -aktivierte Mikrogliazellen sowohl mittels NO-abhängiger als auch NO-unabhängiger Mechanismen erfolgt (Freund *et al.*, 2001).

### 1.3.3.2 Selektiver Tryptophanverbrauch

Die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) ist ein Enzym, das den ersten Schritt des Tryptophan-Katabolismus zu N-Formylkynurenin und Kynurenin katalysiert. Die Verringerung der intrazellulären Tryptophankonzentration durch IDO ist ein  $\text{IFN}\gamma$ -abhängiger antimikrobieller Effektormechanismus, über den die intrazelluläre

Proliferation von *T. gondii* Tachyzoiten in verschiedenen humanen Zelltypen kontrolliert wird (Suzuki, 2002). Die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion derIDO scheint im Menschen ein wichtiger Mechanismus bei der Kontrolle von *T. gondii* im Hirn zu sein. In humanen Astrozyten, Glioblastomzelllinien und mikrovaskulären Endothelzellen wirken TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  synergistisch bei der Aktivierung derIDO (Däubener *et al.*, 1996; Däubener *et al.*, 2001). Die IDO-Aktivität resultiert in einem stark toxoplasmastatischen Effekt. Durch Zugabe von Tryptophan zu den Endothelzellkulturen wurde die IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -vermittelte Toxoplasmastase vollständig aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die schützende Aktivität durch die IDO vermittelt wird. Im Gegensatz zur Situation im Menschen ist die Rolle der IDO für die Abwehr einer *T. gondii* Infektion in der Maus unklar. IFN $\gamma$  induziert in der Maus keine IDO und die Kontrolle des *T. gondii* Wachstums in Astrozyten ist Tryptophan-unabhängig (Halonen *et al.*, 2001). Zwei Gruppen zeigten kürzlich in Mäusen eine IFN $\gamma$ -abhängige Expression von IDO während der akuten Phase der Infektion Hirn und Lunge (Fujigaki *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002). Die Relevanz dieser IDO-Expression für die Immunabwehr gegen *T. gondii* ist allerdings noch ungeklärt.

### 1.3.3.3 Produktion reaktiver Sauerstoff-Intermediate

Reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI) wurden ebenfalls als Effektormoleküle der Immunabwehr gegen eine Toxoplasma-Infektion in humanen Monozyten und IFN $\gamma$ -aktivierten humanen Makrophagen identifiziert (Murray *et al.*, 1985; Wilson und Remington, 1979). Die Beteiligung von ROI an der antimikrobiellen Aktivität der Zellen wurde durch Experimente gezeigt, bei denen die Bildung von ROI unterbunden wurde. Dies hatte eine Aufhebung der anti-Toxoplasma Aktivität um mehr als 80% zur Folge (Murray *et al.*, 1985). Bei den ROI handelt es sich um die Zwischenprodukte, die bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehen können. Als Zwischenprodukte findet man das Superoxid-Anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und das Hydroxidradikal ( $\cdot\text{OH}$ ). ROI werden durch Superoxid-Dismutase, Catalase und Mannitol inaktiviert (Gallin *et al.*, 1992). Die physiologische Relevanz von ROI, vor allem in der Maus, ist bis heute unklar. Es wurde gezeigt, dass *T. gondii* in murinen Makrophagen resistent gegen Sauerstoffmetabolite ist (Chang und Pechère, 1989). Eine Mutation im *p47phox* Gen

führt beim Menschen zur ‚chronic granulomatous disease‘ (CGD). Phagozyten aus Patienten mit dieser Krankheit zeigen eine reduzierte Produktion von NADPH-Oxidase, so dass Superoxid und ähnliche Moleküle nicht gebildet werden können. Auch Leukozyten aus *p47phox*-defizienten Mäusen bilden kein Superoxid (Jackson *et al.*, 1995). Es wurde jedoch gezeigt, dass *p47phox*-defiziente Mäuse, in deren Zellen kein oxidativer Stress induziert wird, sowohl die akute als auch die chronische Phase einer *T. gondii* Infektion überleben (Scharton-Kersten *et al.*, 1997).

#### 1.3.3.4 Selektiver Eisenverbrauch

Die Aktivierung von Enterozyten der Ratte mit  $\text{IFN}\gamma$  nach Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten führt zu einer Hemmung der intrazellulären Parasiten-Replikation (Dimier und Bout, 1998). Weder reaktiver Stickstoff oder Sauerstoffmetabolite noch eine Tryptophanverknappung war die Ursache für diesen inhibitorischen Effekt. Experimente, in denen zweiwertige Eisensalze zu den Zellen gegeben wurden, zeigten eine Aufhebung der Hemmung. Andererseits wurde durch Zugabe von Eisen-Chelatoren zu infizierten Enterozyten ebenfalls eine Hemmung der *T. gondii* Proliferation verursacht. Intrazelluläres Eisen ist somit notwendig für das *T. gondii* Wachstum in Enterozyten (Dimier und Bout, 1998). Bisher wurde dieser Abwehrmechanismus allerdings nur an Enterozyten der Ratte beschrieben, ob er auch bei anderen  $\text{IFN}\gamma$ -aktivierten Zellen eine Rolle spielt, ist unbekannt.

#### 1.3.3.5 IGTP-vermittelte Mechanismen

Kürzlich wurde eine neue Familie  $\text{IFN}\gamma$ -induzierter Gene identifiziert, die nach Infektion mit verschiedenen intrazellulären Pathogenen verstärkt exprimiert werden. Diese Familie enthält mindestens sechs Mitglieder, die in zwei Gruppen unterteilt werden können. Gruppe I umfasst die Proteine IGTP (Taylor *et al.*, 1996), LRG-47 (Sorace *et al.*, 1995) und GTPI (Boehm *et al.*, 1998). Zur Gruppe II zählen die Proteine IRG-47 (Gilly und Wall, 1992), TGTP/Mg21 (Carlow *et al.*, 1995) und IIGP (Boehm *et al.*, 1998). Alle Proteine sind 47 bis 48 kDa große, GTP-bindende Moleküle. Die Funktion dieser Proteine ist bisher unbekannt. Sie werden jedoch in

großen Mengen von Immun- und Nicht-Immunzellen nach Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  exprimiert (Taylor *et al.*, 1996). Einige dieser Proteine, IGTP eingeschlossen, sind am endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert, was vermuten lässt, dass sie beim Prozessieren und Transportieren anderer immunologisch relevanter Proteine wie Antigenen oder Zytokinen beteiligt sind (Taylor *et al.*, 1997). Kürzlich generierte *IGTP*-defiziente Mäuse zeigten, dass trotz normaler Entwicklung der Immunzellen diese Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Mortalität nach akuter Infektion mit *T. gondii* aufweisen (Taylor *et al.*, 2000). IGTP ist folglich essentiell für die Vermittlung der antiparasitären Aktivität durch  $\text{IFN}\gamma$ . *In vitro* Studien zeigten ebenfalls eine Beteiligung von IGTP bei der Abwehr von *T. gondii* in murinen Astrozyten (Halonen *et al.*, 2001). Nach Inkubation der Zellen mit  $\text{IFN}\gamma$  oder zusätzlich mit  $\text{TNF}\alpha$ , IL1 oder IL6 war die Proliferation von *T. gondii* gehemmt. Der inhibitorische Effekt ließ sich weder auf Tryptophan- oder Eisenmangel oder eine Generierung von NO bzw. ROI zurückführen. Die Hemmung des intrazellulären Parasitenwachstums ist in Astrozyten aus *IGTP*-defizienten Mäusen nahezu aufgehoben (Halonen *et al.*, 2001).

Neben IGTP wurde auch eine mögliche Beteiligung anderer Mitglieder dieser Genfamilie untersucht. Dazu wurden LRG-47 und IRG-47 ‚knock out‘ Mäuse generiert (Collazo *et al.*, 2001). *LRG-47*-defiziente Mäuse sterben in der akuten Phase der Infektion mit *T. gondii*, wohingegen *IRG-47*-defiziente Mäuse erst in der chronischen Phase der Infektion zum Opfer fallen. LRG-47 und IRG-47 spielen demnach ebenfalls eine essentielle Rolle bei der Immunabwehr gegen *T. gondii*.

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

Bei Untersuchungen des Gehirns chronisch infizierter Mäuse wurden in unserer Arbeitsgruppe an Entzündungsherden neben T-Zellen DC gefunden (Fischer *et al.*, 2000). Da DC-ähnliche Mikrogliazellen *in vitro* das Toxoplasma-Wachstum hemmen (Fischer *et al.*, 1993) und aus dem Hirn isolierte DC phänotypisch solchen Mikrogliazellen entsprechen (Fischer und Reichmann, 2001), wurde eine vergleichbare Aktivität in DC vermutet. Eine anti-*T. gondii* Aktivität Dendritischer Zellen gegenüber anderen infizierten Zellen, ist bislang nicht beschrieben.

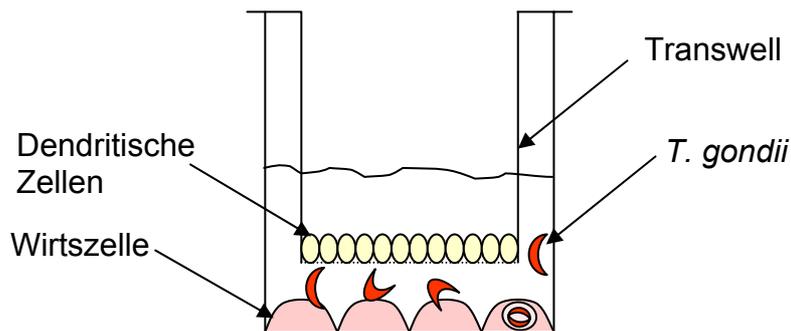
Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war daher: Sind DC in der Lage, das *Toxoplasma*-Wachstum in anderen Wirtszellen zu hemmen und wie wird diese Hemmung molekular vermittelt? Dazu wurde ein Doppelkammer-Kokultursystem etabliert, in dem infizierte Wirtszellen und DC durch eine permeable Membran voneinander getrennt sind. Eine Infektion der DC ist somit ausgeschlossen. Dieses System vereinfacht die Untersuchung von antiparasitären Mechanismen, da an jeder der beteiligten Zellpopulationen funktionelle Parameter mit FACS- oder RT-PCR-Analysen getrennt gemessen werden können. Für andere Zelltypen sind bereits Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* bekannt. Inwiefern DC über einen der beschriebenen Abwehrmechanismen *T. gondii* hemmen, war eine weitere Frage in diesem Teil der Arbeit. Dazu sollten die Faktoren, die für die Hemmung notwendig sind bzw. durch die die Hemmung vermittelt wird, molekular charakterisiert werden.

Ein zweiter Aspekt, der in dieser Arbeit geprüft werden sollte, ist die Mimikry eines Zytokins durch den Parasiten, worüber dieser möglicherweise in die Immunabwehr seines Wirts eingreift. Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass Antikörper gegen das murine IL4 mit *T. gondii*-Tachyzoitenlysat reagieren. Ein IL4-ähnliches parasitäres Molekül könnte nicht nur ein Reifungssignal für DC sein, sondern möglicherweise auch eine wichtige Rolle bei der Balance zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort spielen. Ob *T. gondii* ein IL4-ähnliches Protein exprimiert und ob dieses auch funktionell das murine IL4 imitiert, sollte mit IL4-spezifischen Indikatorzellen und mit IL4- und IL4-Rezeptor ‚knock out‘ Mäusen geprüft werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Eine parakrine toxoplasmastatische Aktivität von Dendritischen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig beschrieben, dass DC auch eine antiparasitäre Funktion besitzen, ohne selbst infiziert zu sein. Dies wurde an einem *in vitro* Doppelkammer-Kokultursystem gezeigt (Abb. 2.1.1). Dabei wurden Wirtszellen mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert und die DC getrennt kokultiviert, was einerseits eine Infektion der DC ausschließt und andererseits die Analyse der Wirkungsweise dieser Effektorfunktion vereinfacht.

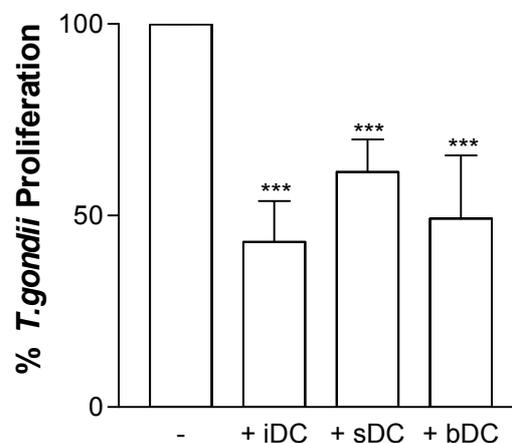


**Abb. 2.1.1:** *In vitro* Doppelkammer-Kokultursystem: In 24-well Platten wurden  $2 \times 10^5$  Wirtszellen ausgesät und mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten infiziert. Simultan erfolgte die Zugabe des Transwells, in das  $4 \times 10^5$  DC gegeben wurden. Die DC sind von den infizierten Wirtszellen durch eine permeable Membran mit einer Porengröße von  $0,4 \mu\text{m}$  getrennt. Die Testdauer betrug 48 Stunden.

#### 2.1.1 Verschiedene Populationen Dendritischer Zellen hemmen *T. gondii* in Hirnzellkulturen

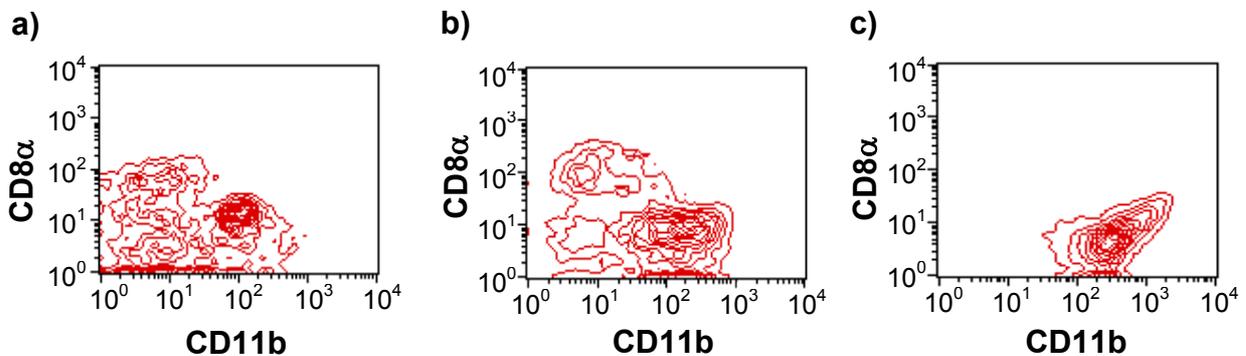
Zur Analyse einer anti-*T. gondii* Effektorfunktion Dendritischer Zellen wurden verschiedene DC-Populationen untersucht. DC lassen sich für *in vitro* Analysen aus der Milz isolieren oder aus Knochenmarkszellen differenzieren. Da bei einer chronischen Toxoplasma-Enzephalitis DC im Hirn zu finden sind (Fischer *et al.*, 2000), wurden auch DC aus dem Hirn isoliert und analysiert. Die Wirtszellen für den

Parasiten waren primäre Hirnzellkulturen aus der Maus. Die primären Hirnzellkulturen wurden in einem Parasit/Wirtszellverhältnis von 2,5 zu 1 mit Tachyzoiten infiziert. Simultan erfolgte, wie in Abb. 2.1.1 dargestellt, eine getrennte Kokultivierung von  $4 \times 10^5$  DC. Nach 24 Stunden erfolgte die Markierung des Testansatzes mit  $^3\text{H}$ -Uracil. Das  $^3\text{H}$ -Uracil wird spezifisch in die Nukleinsäure von *T. gondii* eingebaut und der Einbau korreliert mit der Wachstumsrate des Parasiten (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977). Nach 48 Stunden wurde die inkorporierte Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationsmessgerätes bestimmt. In Abb. 2.1.2 ist das Toxoplasma-Wachstum ohne und mit DC dargestellt. Für diesen Testansatz wurden sowohl DC aus der Milz (sDC) und dem infizierten Hirn (bDC) einer Maus als auch unreife DC, differenziert aus dem Knochenmark, verwendet. Im Vergleich zu der infizierten primären Hirnzellkultur ohne DC zeigten die Ansätze mit den verschiedenen DC-Populationen eine reduzierte Proliferation von *T. gondii*. Alle DC-Populationen sind in der Lage, durch sezernierte Faktoren die Toxoplasma-Proliferation zu reduzieren. Hierbei muss es sich um ein sezerniertes Molekül handeln, da sich die DC im Transwell und somit nicht im direkten Zell-Zell Kontakt zu den infizierten Zellen befinden.



**Abb. 2.1.2:** Toxoplasmen-Proliferationstest mit DC-Populationen aus verschiedenen Organen. Infektion von  $2 \times 10^5$  Hirnzellen mit  $2 \times 10^5$  Tachyzoiten und simultane Zugabe von  $4 \times 10^5$  DC im Transwell. Nach 24 h erfolgte die Markierung mit  $^3\text{H}$ -Uracil und nach 48 h der Stopp des Tests durch Einfrieren. - = ohne DC; iDC = unreife Knochenmark-DC; sDC = DC aus der Milz; bDC = DC aus dem Hirn einer mit *T. gondii* chronisch infizierten Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden nach dem students t-test beurteilt. \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Bei allen im Proliferationsansatz verwendeten DC-Populationen, wurden die Oberflächenmarker der Zellen im Durchflusszytometer analysiert, um die Heterogenität der verschiedenen DC-Präparationen zu bestimmen. Bei der Analyse der isolierten Zellen wurde die Reinheit der Populationen mit dem pan-DC Marker CD11c untersucht. CD11c wurde von durchschnittlich 95% der isolierten Knochenmark-DC und mindestens 70% von den isolierten Hirn-DC und Milz-DC exprimiert. Außerdem wurde die Expression von MHCII, des Reifungsmarkers CD40, des lymphoiden Markers CD8 $\alpha$  und des myeloiden Markers CD11b bestimmt. Die Charakterisierung der verschiedenen DC im FACS zeigte, dass die Hauptpopulation in den unterschiedlichen DC-Populationen von myeloider Abstammung (CD11b<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) sind (Abb. 2.1.3a-c).



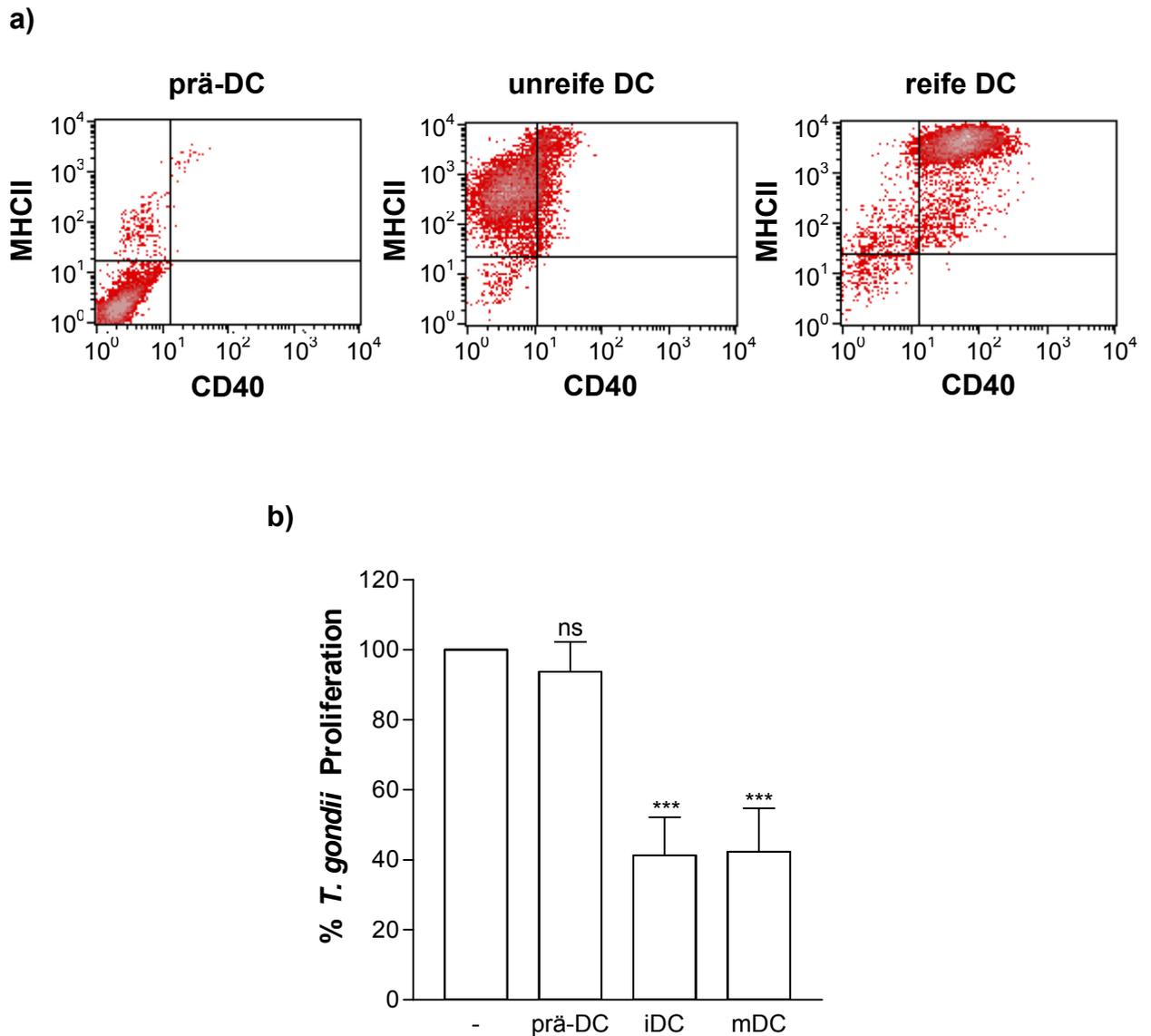
**Abb. 2.1.3:** FACS-Analyse von Hirn-DC, Milz-DC und Knochenmark-DC. Alle DC-Populationen wurden als CD11c<sup>+</sup> Zellen isoliert und die Expression von CD11b und CD8 $\alpha$  auf der Oberfläche untersucht. a) DC isoliert aus dem Hirn *T. gondii*-infizierter Mäuse, b) DC isoliert aus der Milz uninfizierter Mäuse, c) DC differenziert aus dem Knochenmark einer uninfizierten Maus. Exemplarisch dargestellt ist jeweils eine Analyse von mindestens drei unabhängigen Präparationen.

Für die weitere Analyse der antiparasitären Funktion der DC wurden Knochenmark-DC verwendet. Diese lassen sich einfach und in großen Mengen generieren und weisen eine homogene myeloide Population auf.

### 2.1.2 Die antiparasitäre Aktivität Dendritischer Zellen ist unabhängig von ihrem Reifezustand

Der Reifungszustand der DC aus Hirn, Milz und Knochenmarkskulturen unterscheidet sich deutlich. Die DC aus Hirn und Milz zeigen in FACS-Analysen einen hohen Anteil an reifen DC (MHCII<sup>high</sup>, CD40<sup>+</sup>). Bei den Milz-DC entspricht diese Population ca. 50% der Gesamt-DC und bei den Hirn-DC zeigen alle DC einen reifen Phänotyp (Fischer *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wiesen Knochenmark-DC hauptsächlich (95%) einen unreifen Phänotyp auf (MHCII<sup>low</sup>, CD40<sup>-</sup>). Alle drei DC-Populationen reduzieren die *T. gondii* Proliferation in primärer Hirnzellkultur (2.1.1, Abb. 2.1.2). Um zu prüfen, inwieweit der Reifungsstatus der DC relevant für diese antiparasitäre Effektorfunktion ist, wurden unreife und reife DC aus Knochenmarkskulturen verglichen. Frisch präparierte Knochenmarkszellen wurden mittels GM-CSF in acht Tagen zu unreifen DC differenziert. Durch Zugabe von 1 µg/ml LPS für 48 h differenzierten unreife DC zu reifen DC. Aus den LPS-behandelten und -unbehandelten Knochenmarkskulturen trennte man die CD11c<sup>+</sup> von den CD11c<sup>-</sup> Zellen, so dass eine reine unreife, eine reine reife DC-Population und eine DC-Vorläufer-Population isoliert vorlagen. In Abb. 2.1.4a sind die einzelnen Populationen dargestellt. Charakteristisch für unreife DC sind eine schwache Expression von MHCII und das Fehlen von CD40 auf ihrer Oberfläche, während die reifen DC eine hohe Expression von MHCII und CD40 aufweisen. Als Kontrollzellen wurden DC-Vorläufer (prä-DC) verwendet. Prä-DC sind durch das Fehlen von CD11c, MHCII und CD40 auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet (Abb. 2.1.4a). Durch die Differenzierung dieser Zellen mit GM-CSF in unreife DC ließ sich zeigen, dass es sich bei diesen Zellen tatsächlich um DC-Vorläufer handelt.

Ein Vergleich der drei Zellpopulationen in der Kokultur mit Toxoplasmen ergab, dass prä-DC das Parasitenwachstum nicht hemmten, wohingegen sowohl unreife als auch reife DC die Wachstumsrate des Parasiten reduzierten (Abb. 2.1.4b). Die antiparasitäre Aktivität ist somit unabhängig vom Reifungszustand der DC und Vorläufer-DC weisen keine antiparasitäre Aktivität auf.

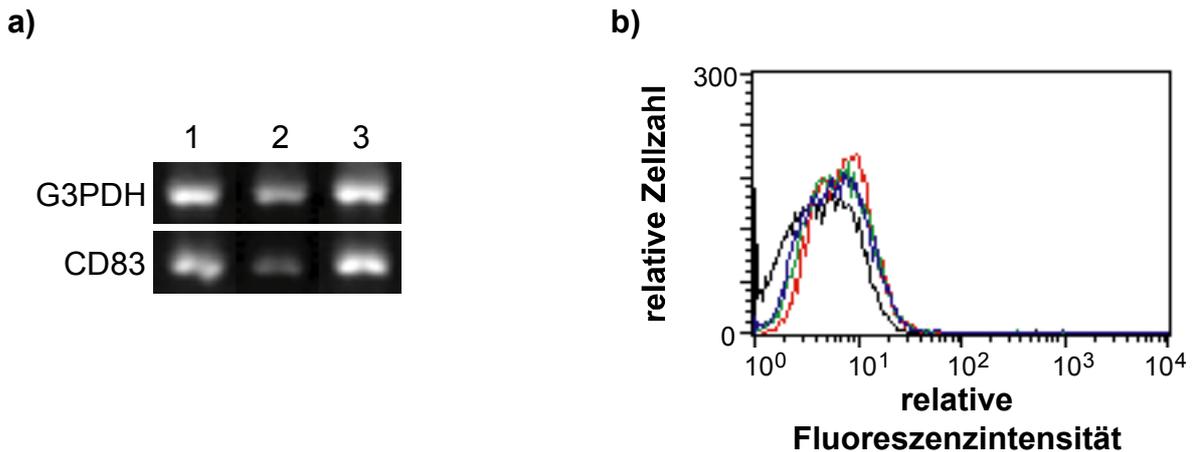


**Abb. 2.1.4:** FACS-Analyse und Toxoplasmen-Proliferationstest mit DC-Vorläufern, unreifen DC und reifen DC. a) Exemplarische FACS-Analyse der verschiedenen Zellpopulationen. b) Toxoplasmen-Proliferationstest mit primären Hirnzellkulturen infiziert mit *T. gondii* und simultaner Zugabe von DC-Vorläufern (prä-DC), unreifen DC (iDC) und reifen DC (mDC) im Transwell. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mit dem students t-test beurteilt, ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Da sowohl unreife als auch reife DC das Toxoplasma-Wachstum hemmen, stellte sich die Frage, ob unreife DC während des Tests zu reifen DC differenzieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden DC aus dem Transwell nach 48 Stunden Testdauer sowohl im FACS bezüglich der Expression der Reifungsmarker analysiert und auch in der RT-PCR (5.4.4) untersucht (Abb. 2.1.5).

Ein weiterer Reifungsmarker der DC ist CD83, ein Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie. Es ist bekannt, dass die Expression dieses Proteins während der

Reifung von DC verstärkt wird (Berchtold *et al.*, 1999). Die CD83 mRNA-Expression von DC nach Kokultivierung mit infizierter und nicht infizierter Hirnzellkultur waren vergleichbar (Abb. 2.1.5a). Bei der durchflusszytometrischen Analyse der CD83-Expression auf DC nach Kokultur wurde ebenfalls keine Erhöhung der CD83-Expression gefunden. Folglich ist eine Reifung der DC im Testansatz nicht nachweisbar.



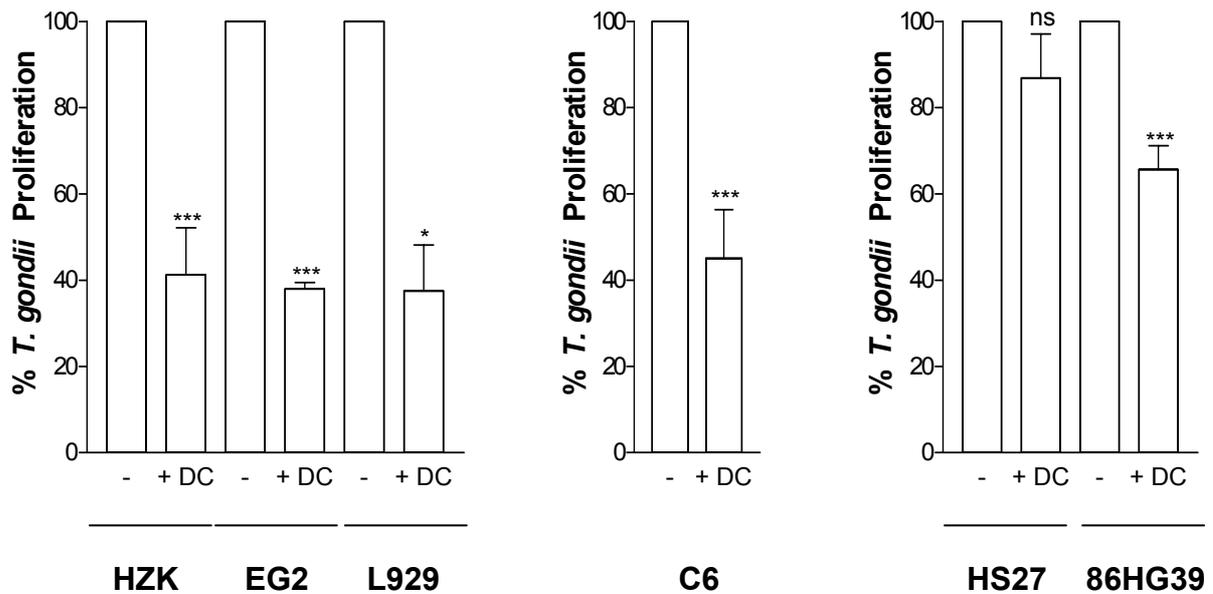
**Abb. 2.1.5:** RT-PCR und FACS Analyse der Reifungsmarker von DC während des *Toxoplasma*-Proliferationstests. Analyse Dendritischer Zellen nach 48 h Inkubation im Transwell im Medium (1, rot), im Transwell über einer primären Hirnzellkultur (2, grün) und im Transwell über einer mit *T. gondii* Tachyzoiten infizierten primären Hirnzellkultur (3, blau). a) RT-PCR Analyse der DC-mRNA mit CD83 Primern, b) FACS-Analyse der DC mit anti-CD83 Antikörpern.

### 2.1.3 Die Rolle der infizierten Wirtszelle

Da Dendritische Zellen eine Reduktion des *Toxoplasma*-Wachstums verursachen, sollte die Wirkungsweise dieser DC-Aktivität untersucht werden. Mit Hilfe des Doppelkammer-Kokultursystems (Abb. 2.1.1) ist es möglich, die Beteiligung der Wirtszellen an diesem antiparasitären Effekt sowie die Wirkung der DC-Aktivität auf den Parasiten zu erforschen. Die Charakterisierung der sezernierten Aktivität war ein weiteres Ziel.

### 2.1.3.1 Die Wirtszelle ist beteiligt an der antiparasitären Aktivität

Für die detaillierte Charakterisierung der Wirkungsweise der antiparasitären Aktivität dendritischer Zellen ist die Beteiligung der Wirtszelle an diesem Effekt von Interesse. Es ist zu klären, ob DC ein Molekül produzieren, das direkt auf das Toxoplasmen-Wachstum einwirkt, oder ob die Wirtszellen durch dieses Molekül aktiviert werden und dann selbst einen antiparasitären Mechanismus induzieren. Wenn DC ein Molekül sezernieren, das direkt auf das Parasitenwachstum wirkt, dann sollte der antiparasitäre Effekt in jeder beliebigen Wirtszelle zu beobachten sein. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden Toxoplasmen-Proliferationstests durchgeführt, in denen die Art der Wirtszellen variierte. Die Infektionsrate, Menge und Art der DC blieben dabei konstant. Die Wirtszellen wurden mit einem Parasit/Wirtszell-Verhältnis von 2,5 zu 1 mit Tachyzoiten infiziert und gleichzeitig erfolgte eine Zugabe von DC im Transwell. Wie zuvor beschrieben, wurde der Test nach 24 Stunden radioaktiv markiert, nach 48 Stunden gestoppt und ausgewertet. In Abb. 2.1.6 sind die Ergebnisse der Toxoplasmen-Proliferationstests mit sechs verschiedenen Wirtszellen aus drei unterschiedlichen Spezies dargestellt. Bei den Wirtszellen handelt es sich einerseits um Hirnzellen (primäre Hirnzellkultur, EG2, C6 und 86HG39) und andererseits um Fibroblasten (L929, HS27). Das Toxoplasmen-Wachstum wird durch DC in allen Wirtszellen aus der Maus (primäre Hirnzellkultur, EG2, L929) und der Ratte (C6) gehemmt (Abb. 2.1.1). Dabei war es unerheblich, ob es sich um Hirnzellen oder Fibroblasten handelte. In humanen Fibroblasten hingegen ließ sich in sechs voneinander unabhängigen Experimenten keinerlei Hemmung der Toxoplasmen durch DC beobachten. Das Wachstum der Parasiten in der humanen Gliomazelllinie 86HG39, untersucht in drei voneinander unabhängigen Experimenten, wurde durch DC im Durchschnitt nur um 30% gehemmt. Die Hemmung des Parasitenwachstums in primärer Hirnzellkultur lag hingegen im Durchschnitt bei 60%. Die Wirkung der antiparasitären Aktivität der DC auf Tachyzoiten ist in der infizierten primären Hirnzellkultur im Vergleich zur infizierten Glioblastomzelllinie signifikant stärker ( $p < 0,01$ ).

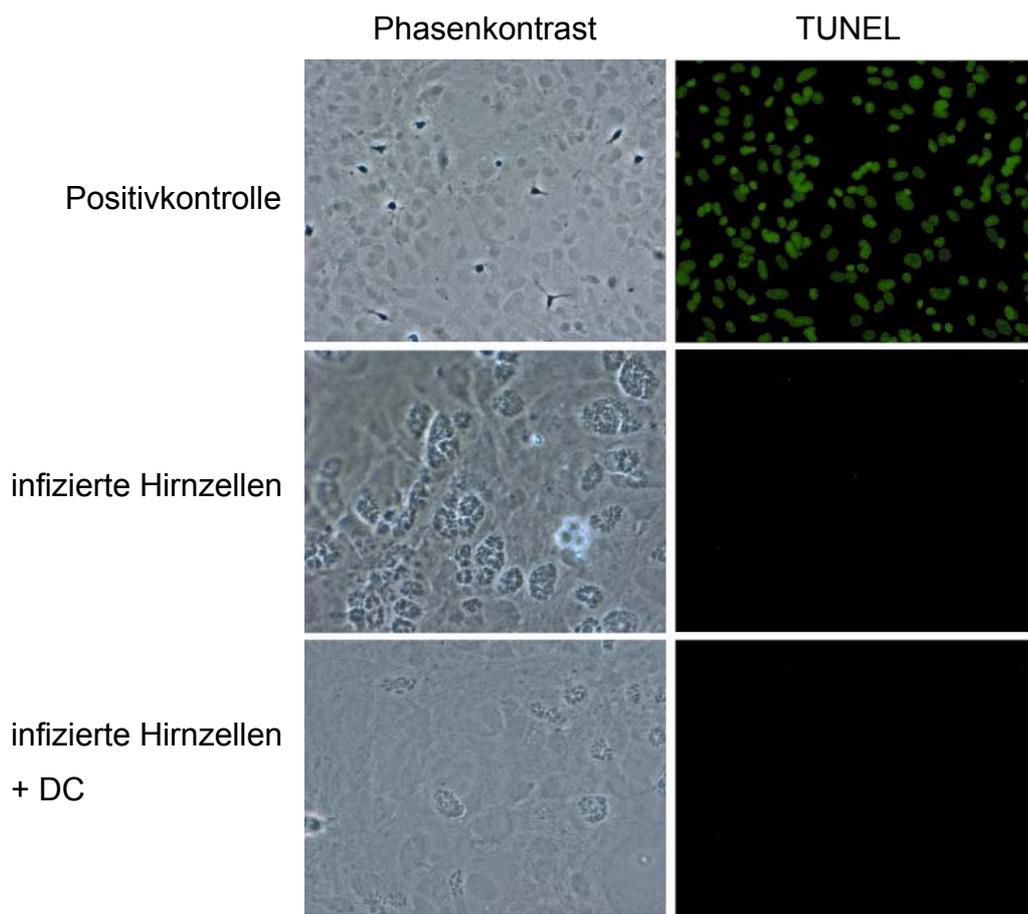


**Abb. 2.1.6:** *Toxoplasmen-Proliferationstest mit Fibroblasten und Hirnzellen aus verschiedenen Spezies.*  $2 \times 10^5$  Wirtszellen wurden mit  $0,5 \times 10^6$  Tachyzoiten infiziert. Das Parasitenwachstum, gemessen durch  $^3\text{H}$ -Uracil Inkorporation, wurde vergleichend mit und ohne DC bestimmt. Die Wirtszellen stammen aus folgenden Spezies: Maus: HVK = primäre Hirnzellkultur, EG2 = O2-A Hirnzelllinie, L929 = Fibroblasten; Ratte: C6 = Glioma Zelllinie; Mensch: HS27 = Fibroblasten, 86HG39 = Glioma Zelllinie. Signifikanzen wurden mit dem students t-test beurteilt, \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Der antiparasitäre Effekt der kokultivierten DC ist nicht in allen Wirtszellen zu finden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Wirtszelle an dem Effekt beteiligt ist. Da in den humanen Fibroblasten keine Hemmung des Parasiten zu finden war, liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivität nicht direkt auf den Parasiten wirkt. In allen weiteren fünf getesteten Wirtszellen ist eine Hemmung durch DC zu beobachten. Bei einer Beteiligung der Wirtszellen an der antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen gibt es folgende Möglichkeiten: 1) Die Stimulation der Wirtszelle und darauf folgend die Produktion von Effektormolekülen, 2) Das Weiterleiten eines Effektormoleküls zur Infektionsstelle durch die Wirtszelle oder aber 3) Das Einleiten einer Apoptose in den Wirtszellen.

### 2.1.3.2 Dendritische Zellen induzieren keine Apoptose in infizierten Wirtszellen

Der programmierte Zelltod (Apoptose) spielt sowohl während der Entwicklung in mehrzelligen Organismen als auch bei der Regulation der Wirtsantwort im Fall der Infektion mit Viren, Bakterien und Parasiten eine wichtige Rolle (Liles, 1997; Williams, 1994). Für *Mycobacterium avium* ist beschrieben, dass die Apoptose der Wirtszellen eine Vermehrung dieser Bakterien und die Übertragung auf nicht infizierte Zellen verhindert (Fratazzi *et al.*, 1997). Das ist möglicherweise auch bei der hier untersuchten antiparasitären Effektorfunktion Dendritischer Zellen der Fall. Die DC könnten bei infizierten Wirtszellen Apoptose induzieren, wodurch die Proliferation von *T. gondii* gehemmt wird.



**Abb. 2.1.7:** TUNEL-Analyse von infizierten primären Hirnzellkulturen. Positivkontrolle: Primäre Hirnzellkultur mit künstlich hervorgerufenen DNA-Strangbrüchen durch DNaseI und anschließender TUNEL-Reaktion. Infizierte primäre Hirnzellkultur inkubiert, ohne und mit DC, für jeweils 40 Stunden und nachfolgender TUNEL-Reaktion.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden infizierte Zellen mit und ohne DC 40 Stunden inkubiert und dann fixiert. Bei Zellen, die in Apoptose gehen und somit DNA-Strangbrüche aufweisen, wird der Zellkern im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Als Positivkontrolle für die TUNEL-Reaktion diente die Inkubation primärer Hirnzellkulturen mit DNase. Dabei entstehen ebenfalls DNA-Strangbrüche, die durch die TUNEL-Reaktion sichtbar gemacht werden (Abb. 2.1.7). Die Untersuchungen ergaben, dass in dem Toxoplasmen-Proliferationstest mit und ohne DC keine apoptotischen Zellen zu finden waren, wohingegen eine Hemmung der *T. gondii* Proliferation durch DC in den Phasenkontrast-Aufnahmen deutlich zu erkennen war (Abb. 2.1.7). Uninfizierte Hirnzellkulturen zeigten ebenfalls keine Apoptose (Daten nicht gezeigt).

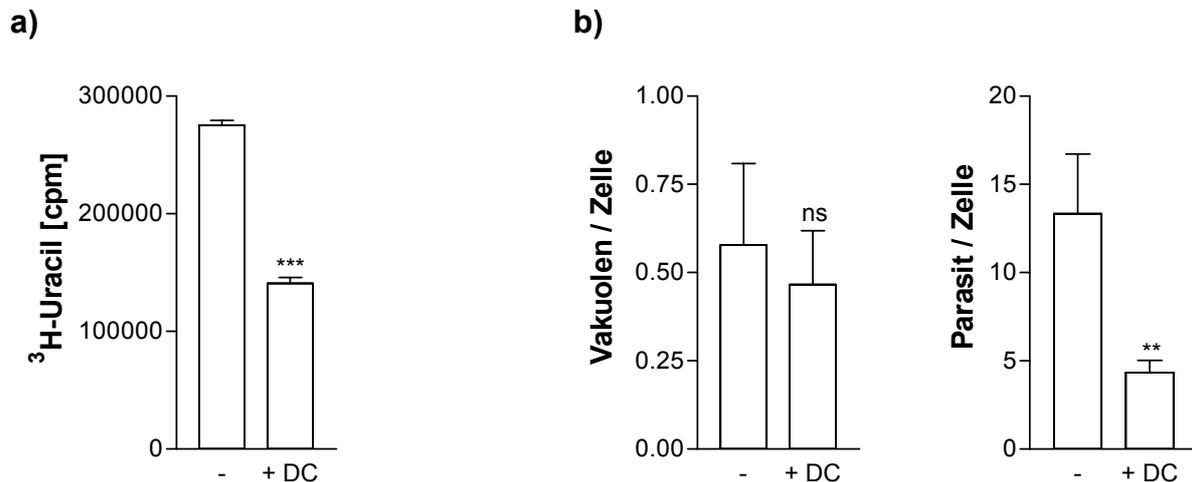
## **2.1.4 Die Wirkung der antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen**

Bisher wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen ohne direkten Zellkontakt die Proliferation von *T. gondii* in den Wirtszellen hemmten (2.1.1) und dass die Wirtszelle in diesen Effekt involviert waren (2.1.3). Für die Wirkung der Aktivität auf den Parasiten bieten sich ebenfalls diverse Möglichkeiten der Analyse an. In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob die intrazelluläre Proliferation oder die Invasion des Parasiten gehemmt wird. Wirkt der Effekt zytostatisch oder zytotoxisch? Konvertiert der Parasit aufgrund des ‚immunologischen Drucks‘ in das nicht-proliferative Zystenstadium?

### **2.1.4.1 Die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* wird durch Dendritische Zellen gehemmt**

Bei den vorhergehenden Experimenten erfolgten die Infektion der Wirtszellen und die Zugabe der DC im Transwell simultan. Aus diesem Grund kann nicht unterschieden werden, ob die intrazelluläre Proliferation oder die Invasion von *T. gondii* gehemmt wird. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden zwei Ansätze gewählt: Im ersten Ansatz erfolgten die Infektion und die Zugabe der DC nicht gleichzeitig. Die DC wurden erst nach einer Vorinfektion hinzugegeben. Alle Toxoplasmen waren bereits

intrazellulär bis die DC zum Test hinzugefügt wurden. Der Proliferationstest erfolgte ansonsten, wie bisher beschrieben, mit radioaktiver Markierung nach 24 Stunden und Stopp des Tests nach 48 Stunden. In Abb. 2.1.8a ist zu sehen, dass die DC trotz Vorinfektion das Toxoplasma-Wachstum hemmten. Offensichtlich wird nicht die Invasion, sondern die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen gehemmt.



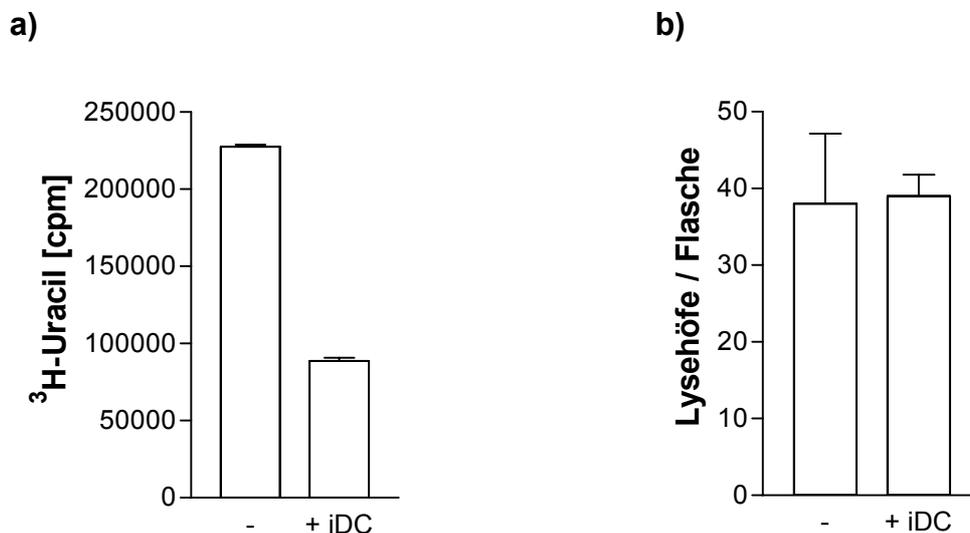
**Abb. 2.1.8:** Toxoplasmen-Proliferationstests mit Wirtszellen, die vor oder simultan zur DC-Zugabe infiziert wurden. a) Vorinfektion der primären Hirnzellen mit *T. gondii*, danach Zugabe von DC im Transwell. Nachweis der Proliferation über <sup>3</sup>H-Uracil Einbau. b) Simultane Infektion der primären Hirnzellen und Zugabe der iDC im Transwell, mikroskopische Auszählung der Vakuolen pro Wirtszelle und Parasiten pro Wirtszelle. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mit dem students t-test beurteilt. ns:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Diese Beobachtung ließ sich in einem weiteren Testansatz bestätigen. Dabei erfolgten die Infektion der Wirtszelle mit *T. gondii* Tachyzoiten und die Zugabe der DC im Transwell simultan. Diesmal wurde der Toxoplasma-Proliferationstest nicht radioaktiv markiert, sondern die infizierte Hirnzellkultur mittels Immunfluoreszenz (5.5.4) bzw. Diff Quick-Färbung (5.1.2.3) gefärbt und die Infektionsrate anschließend mikroskopisch ausgezählt. Dazu wurde die Anzahl der Vakuolen pro Zelle und die Zahl der Parasiten pro Wirtszelle bestimmt (Abb. 2.1.8b). Aus Anzahl der Vakuolen pro Zelle lässt sich die Infektionsrate bestimmen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Vakuolen pro Zelle beim Vergleich zwischen infizierter primärer Hirnzellkultur mit und ohne DC ähnlich war. Damit war auch die Infektionsrate vergleichbar. Folglich beeinflussen DC die Invasion der Toxoplasmen in die Wirtszelle. Bei der Auszählung der Parasiten pro Zelle hingegen wurde sichtbar, dass in Gegenwart von DC weniger

Toxoplasmen pro Zelle zu finden waren. Bei gleicher Anzahl von Vakuolen pro Zelle lagen weniger Toxoplasmen pro Zelle vor. Demzufolge ist die intrazelluläre Proliferation und nicht die Invasion der Toxoplasmen durch DC gehemmt.

### 2.1.4.2 Die antiparasitäre Aktivität wirkt zytostatisch

Es kann verschiedene Gründe für die Hemmung der intrazellulären Proliferation von *T. gondii* durch DC geben. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob es sich bei der Hemmung um einen zytostatischen oder einen zytotoxischen Effekt handelt. In einem Proliferationstest wurden infizierte primäre Hirnzellkulturen mit und ohne DC nicht wie zuvor mit radioaktiv markiertem Uracil versetzt sondern nach 48 Stunden aus dem 24-well aus infizierten Wirtszellen isoliert. Ein Grossteil der Toxoplasmen befand sich zu diesem Zeitpunkt noch intrazellulär. In einem Kontrollansatz wurde die Hemmung der Toxoplasmen durch DC mittels radioaktiver Markierung geprüft (Abb. 2.1.9a).



**Abb. 2.1.9:** Plaqueassay der intrazellulären Toxoplasmen. a) Infektion von  $2 \times 10^5$  Hirnzellen mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten bei gleichzeitiger Zugabe von DC im Transwell. Nach 24 h erfolgte die Markierung mit <sup>3</sup>H-Uracil und nach 48 h der Stopp des Tests bei  $-20^\circ\text{C}$ . b) Plaqueassay: Paralleler Ansatz zu a) ohne radioaktive Markierung; nach 48 h wurden die intrazellulären Toxoplasmen isoliert und je 100 Tachyzoiten auf Fibroblasten (HS27) gegeben. Nach 9 Tagen wurde die Anzahl der Lysehöfe bestimmt.

Die Toxoplasmen lassen sich mit Hilfe einer Kanüle aus den infizierten Zellen lysieren. Alle Toxoplasmen wurden gezählt und je 100 Parasiten in einen Plaquesassay eingesetzt (5.1.2.3). Dieser Test gestattet eine Aussage darüber, ob die Toxoplasmen tot oder lebendig in den Vakuolen der Wirtszellen vorlagen. Die Zahl der isolierten Toxoplasmen aus dem Proliferationstest mit DC war bei Toxoplasma-Proliferationstests, die mit DC kokultiviert wurden, reduziert. Die Anzahl der Lysehöfe war im Plaquesassay für die Toxoplasmen, die mit DC, und für die Toxoplasmen, die ohne DC inkubiert wurden, gleich (Abb. 2.1.9b). Das bedeutet, DC hemmen die intrazelluläre Proliferation der Parasiten (Abb. 2.1.9a) und töten diese nicht ab. Die Parasiten sind nach Entfernen der DC immer noch genauso infektiös wie die Parasiten, die nicht durch DC gehemmt wurden. Die Aktivität wirkt somit zytostatisch und nicht zytotoxisch auf den Parasiten.

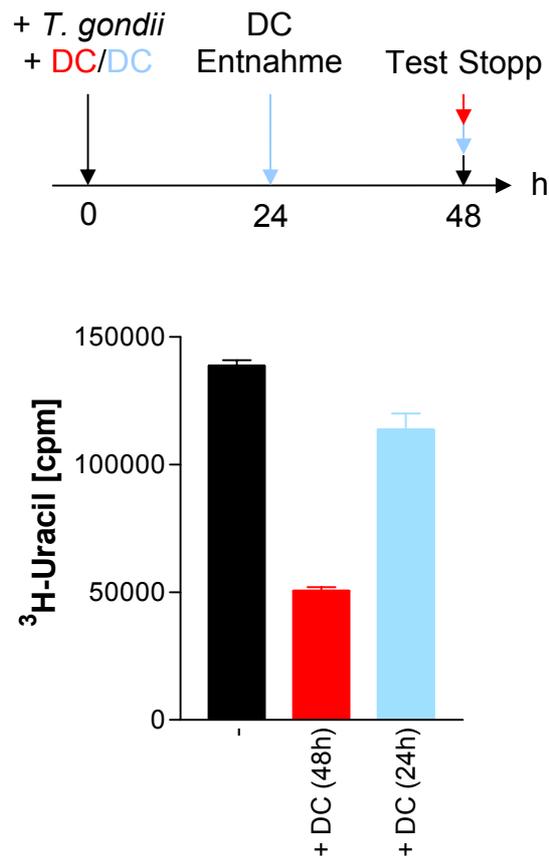
#### **2.1.4.3 Der Effekt ist transient und die Parasiten konvertieren nicht ins Zystenstadium**

Die antiparasitäre Aktivität Dendritischer Zellen hemmt die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii*, dabei wird der Parasit nicht getötet, sondern das Parasitenwachstum gehemmt (siehe 2.1.4.1). Bei einem Toxoplasmen-Proliferationsansatz von 24 Stunden Dauer wurde dieselbe Hemmung durch DC beobachtet wie bei einer Testdauer von 48 Stunden. Wie sieht es aber aus, wenn die DC nur die ersten 24 Stunden von einem 48 Stunden Proliferationstest zugegen sind? Ist der Effekt vorübergehend oder wird durch die DC ein permanenter Abwehrmechanismus vermittelt?

Durch die Verwendung des Doppelkammer-Kokultursystems ließ sich diese Frage experimentell einfach beantworten. Es wurde ein Proliferationstest mit primären Hirnzellkulturen angesetzt. Die Infektion und die Zugabe der DC im Transwell erfolgten simultan. Als Kontrolle verblieben die DC in einem Testansatz 48 Stunden über den infizierten Zellen. In einem Parallelansatz wurden die DC bereits nach 24 Stunden entfernt. Beide Proliferationsansätze wurden nach 24 Stunden radioaktiv markiert und nach 48 Stunden bei -20°C gestoppt. In Abb. 2.1.10 ist zu sehen, dass bei Entnahme der DC aus dem Proliferationstest nach 24 Stunden die Hemmung weitestgehend aufgehoben ist, während im Kontrollansatz, in dem die DC 48

Stunden vorlagen, eine kontinuierliche Hemmung der Toxoplasmen zu beobachten ist.

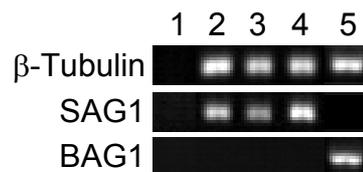
Das bedeutet, dass in dem Zeitraum, in dem die DC in der Kokultur vorlagen, eine Hemmung der Toxoplasmen erfolgte. Die DC vermitteln ihre hemmende Wirkung also stetig und die Halbwertszeit der Wirkung ist gering. Folglich ist der Effekt transient.



**Abb. 2.1.10:** Toxoplasmen-Proliferationstest mit DC, die für 24h bzw. mit 48h kokultiviert wurden.  $2 \times 10^5$  Hirnzellen wurden mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten infiziert und gleichzeitig erfolgte die Zugabe von DC im Transwell. Beide Testansätze wurden nach 24 h mit <sup>3</sup>H-Uracil markiert, in einem Testansatz wurden die DC nach 24 h entfernt, wohingegen in einem Kontrollansatz die DC für 48 h im Test verblieben. Nach 24 h erfolgte die radioaktive Markierung der Proliferationsansätze und nach 48 h wurden die Proliferationsansätze bei  $-20^\circ\text{C}$  gestoppt. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Der Befund der DC-induzierten Toxoplasmastase wird durch dieses Experiment untermauert. Die Aufhebung der Hemmung nach Entfernen der DC ist mit einem Abtöten der Toxoplasmen durch DC nicht vereinbar.

In den Toxoplasmen-Proliferationstests wurde das Isolat ME49 der Stammgruppe II verwendet. Parasiten der Stammgruppe II können zwischen dem Tachyzoiten- und Bradyzoiten-Stadium konvertieren. Der sich schnell teilende Tachyzoit ist in der akuten Phase der *in vivo* Infektion präsent, konvertiert zum Bradyzoiten mit dem Beginn der zellularen Immunantwort und persistiert im Hirn für das gesamte Leben des Wirts. In den Proliferationstests wurden ausschließlich Tachyzoiten verwendet. Demzufolge wäre es denkbar, dass die Tachyzoiten in einem Proliferationstest mit DC zu Bradyzoiten konvertieren und aus diesem Grund nicht mehr oder nur sehr langsam proliferieren. Die DC könnten derart auf die Toxoplasmen wirken, dass sie zu Bradyzoiten konvertieren. Um diese Frage zu untersuchen, wurden spezifische Marker für jeweils das Bradyzoiten- und Tachyzoiten-Stadium benötigt. Ein spezifischer Marker für Bradyzoiten ist das BAG1. Dies ist ein zytoplasmatisches Antigen, das kleinen ‚heat shock‘ Proteinen in Pflanzen ähnelt (Bohne *et al.*, 1995). SAG1 hingegen ist ein Oberflächenantigen, das ausschließlich von Tachyzoiten exprimiert wird (Kasper *et al.*, 1985). Für die Analyse der Toxoplasmen während des Proliferationstests wurde ein Test durchgeführt, in dem  $2 \times 10^5$  Hirnzellen mit  $5 \times 10^5$  ME49-Tachyzoiten infiziert und für 48 Stunden mit und ohne DC inkubiert wurden. Nach 48 Stunden erfolgte die Präparation der RNA sowohl aus den Infektionen mit als auch ohne DC. Zur Kontrolle der Stadienkonversion durch DC schloss sich eine Prüfung mittels RT-PCR (5.4.4) und Primern für SAG1 und BAG1 an.



**Abb. 2.1.11:** RT-PCR-Analyse von infizierten Hirnzellen. RT-PCR Analyse von cDNA aus 1: primärer Hirnzellkultur, 2: ME49-Tachyzoiten, 3: primärer Hirnzellkultur infiziert mit ME49-Tachyzoiten, 4: primärer Hirnzellkultur infiziert mit ME49-Tachyzoiten und DC im Transwell, 5: DX-Bradyzoiten. 3 und 4 stammen aus einem 48 h Toxoplasmen-Proliferationstest.

Für die Beladungskontrolle wurde *T. gondii* β-Tubulin nachgewiesen. Als Kontrollen der SAG1- und BAG1-Expression dienten cDNA von uninfizierten Hirnzellen, isolierten ME49-Tachyzoiten und isolierten DX-Bradyzoiten. Primäre Hirnzellkulturen zeigten keine unspezifische PCR-Reaktion mit den einzelnen Primern (Abb. 2.1.11).

Isolierte ME49-Tachyzoiten exprimierten nur SAG1 und kein BAG1, während aus dem Hirn einer chronisch infizierten Maus isolierte DX-Bradyzoiten BAG1 und kein SAG1 exprimierten. Infizierte primäre Hirnzellkulturen zeigten weder mit noch ohne DC das Bradyzoiten-spezifische BAG1 Signal. DC induzieren folglich keine Stadienkonversion der Tachyzoiten zu Bradyzoiten während des Toxoplasma-Proliferationstests.

### **2.1.5 Charakteristika der anti-*T. gondii* Aktivität Dendritischer Zellen**

In diesem Kapitel wird die antiparasitäre Aktivität Dendritischer Zellen molekular charakterisiert. Das beinhaltet sowohl die Suche einerseits nach speziell einem durch DC induzierten Abwehrmechanismus als auch die Charakterisierung des sezernierten Faktors der DC, der eine antiparasitäre Wirkung aufweist.

#### **2.1.5.1 Der Effekt wird nicht durch NO, ROI oder Tryptophan verursacht**

Es werden fünf verschiedene Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* beschrieben, die alle IFN $\gamma$ -abhängig sind (Suzuki, 2002). IFN $\gamma$  ist unverzichtbar für die Resistenz gegen die akute Phase der Infektion mit *T. gondii* und gegen das erneute Ausbrechen der Enzephalitis während der chronischen Phase der Infektion (Suzuki, 2002). Demzufolge wurde im Doppelkammer-Kokultursystem, in dem DC das Toxoplasma-Wachstum hemmen, zuerst nach IFN $\gamma$  gesucht. Weder in der infizierten primären Hirnzellkultur noch in den DC ließ sich IFN $\gamma$ -mRNA nachweisen. Im Überstand war ebenfalls kein IFN $\gamma$ -Protein mittels ELISA zu detektieren. Aber es ist nicht auszuschließen, dass die beschriebenen antiparasitären Effektormechanismen auch durch andere Faktoren induziert werden können.

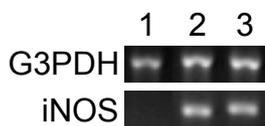
Bei den bekannten Abwehrmechanismen handelt es sich um die Produktion von Stickstoffmonoxid durch die induzierbare NO Synthase, den selektiven Tryptophanabbau durch die Indolamine 2,3-dioxygenase, die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten, den limitierten Zugang von intrazellulärem Eisen

für den Parasiten sowie einen undefinierten Mechanismus, der durch 47 bis 48 kDa Proteine vermittelt wird.

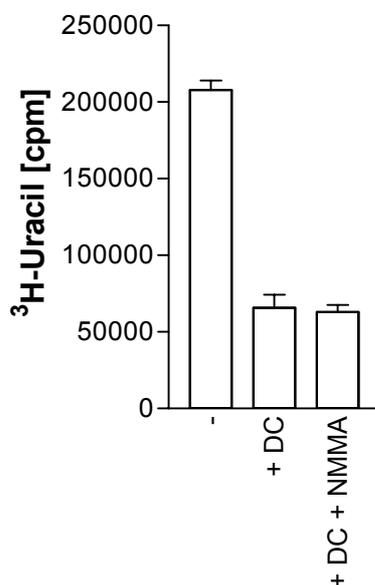
### NO Produktion durch die induzierbare NO Synthase (iNOS):

Ist NO an der Hemmung der Proliferation der Toxoplasmen durch die DC beteiligt? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Toxoplasma-Proliferationstest angesetzt, in dem  $2 \times 10^5$  Hirnzellen mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten infiziert und gleichzeitig  $4 \times 10^5$  DC im Transwell hinzu gegeben wurden. Nach 48 Stunden erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA aus infizierten Hirnzellen mit und ohne DC und nach cDNA-Synthese wurde eine RT-PCR mit spezifischen iNOS Primern durchgeführt (Abb. 2.1.12a).

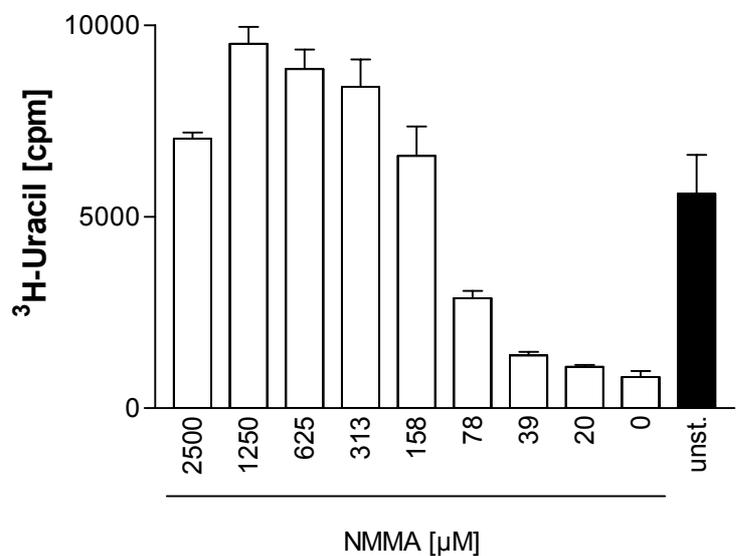
a)



b)



c)

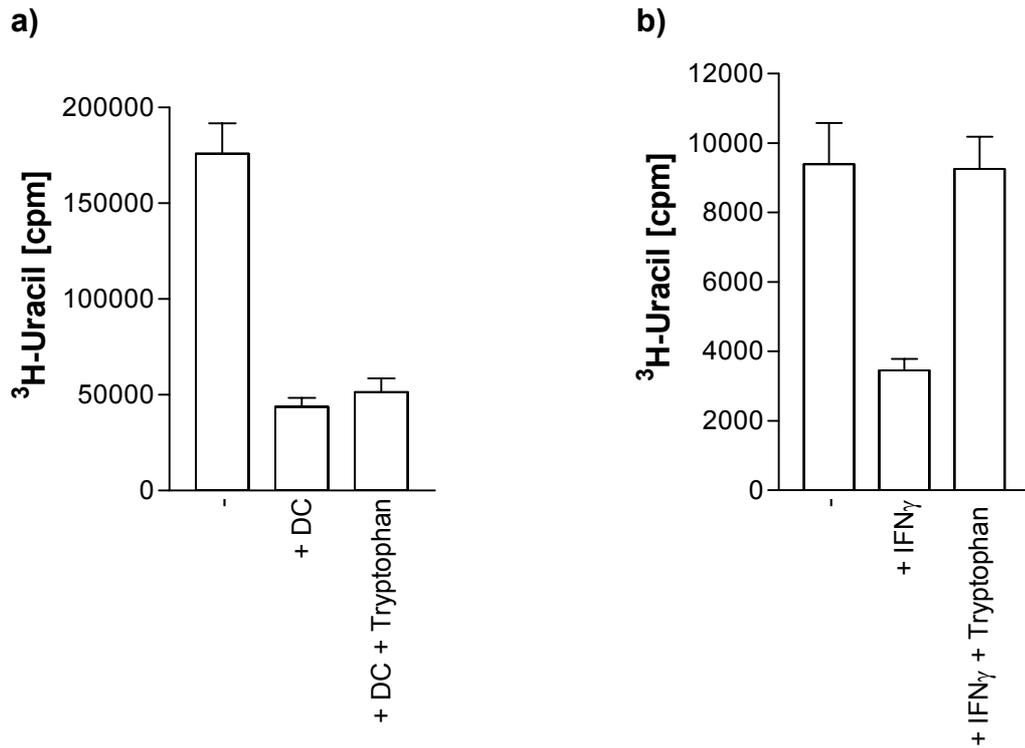


**Abb. 2.1.12:** Nachweis von iNOS-Transkripten sowie Toxoplasmen-Proliferationstests unter Zugabe von NMMA. a) RT-PCR mit iNOS- und G3PDH-Primern mit cDNA von: 1: primärer Hirnzellkultur, 2: primärer Hirnzellkultur infiziert mit Tachyzoiten, 3: primärer Hirnzellkultur infiziert mit Tachyzoiten in Kokultur mit DC; b) Toxoplasmen-Proliferationstest: Zugabe von 1250  $\mu\text{M}$  NMMA; Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens sechs voneinander unabhängigen Experimenten. c)  $10^5$  Peritonealexsudat-Makrophagen stimuliert mit 1000 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  und 100 ng/ml LPS, Infektion mit  $10^5$  Tachyzoiten und Titration von NMMA, unst.: unstimulierte infizierte Makrophagen.

Sowohl in der infizierten primären Hirnzellkultur mit als auch ohne DC war iNOS-mRNA zu finden. Die uninfizierten Hirnzellen zeigten keine iNOS-mRNA Expression (Abb. 2.1.12a). Da in Gegenwart von DC die iNOS-mRNA-Expression in den infizierten Hirnzellen nicht erhöht war, ist es unwahrscheinlich, dass die Hemmung der Toxoplasmen-Proliferation auf NO zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden Toxoplasmen-Proliferationstests unter Zugabe des iNOS Hemmers NMMA angesetzt (Abb. 2.1.12b). Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit des NMMA wurden Peritonealexsudat-Makrophagen mit LPS und IFN $\gamma$  aktiviert und mit *T. gondii* infiziert. Aktivierte Peritonealexsudat-Makrophagen hemmten wie beschrieben (Ding *et al.*, 1988; Langermans *et al.*, 1992) die Toxoplasmen-Proliferation. Diese Hemmung ließ sich durch Zugabe von NMMA aufheben (Abb. 2.1.12c). Damit war die Hemmung der Peritonealexsudat-Makrophagen auf die Produktion von NO zurückzuführen. Aus Abb. 2.1.12b geht hervor, dass durch Zugabe von NMMA die Hemmung der Toxoplasmen durch DC nicht aufgehoben wird. Die NO-Konzentration im Überstand des Proliferationsansatzes lag unter 1  $\mu$ M. Die aktivierten Peritonealexsudat-Makrophagen produzierten ca. 30 $\mu$ M NO (Daten nicht gezeigt). Demzufolge scheint die Hemmung der intrazellulären Toxoplasmen-Proliferation durch DC nicht durch die Produktion von NO hervorgerufen zu werden.

#### Tryptophan Degradation durch IDO:

Um zu prüfen, inwieweit ein selektiver Tryptophanabbau im vorliegenden Doppelkammer-Kokultursystem eine Rolle spielt, wurde der Toxoplasmen-Proliferationstest unter Verwendung primärer Hirnzellkulturen mit Tryptophan supplementiert (Abb. 2.1.13a). Zur Kontrolle wurden humane Glioblastomzellen (86HG39) drei Tage mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* infiziert. Die stimulierten Glioblastomzellen wiesen eine toxoplasmostatische Aktivität auf, die durch Zugabe von Tryptophan wie beschrieben (Däubener *et al.*, 1996) aufgehoben wurde (Abb. 2.1.13b), während die Supplementation von Tryptophan im Toxoplasmen-Proliferationstest mit kokultivierten DC keine Aufhebung der toxoplasmostatischen Aktivität erzeugte.

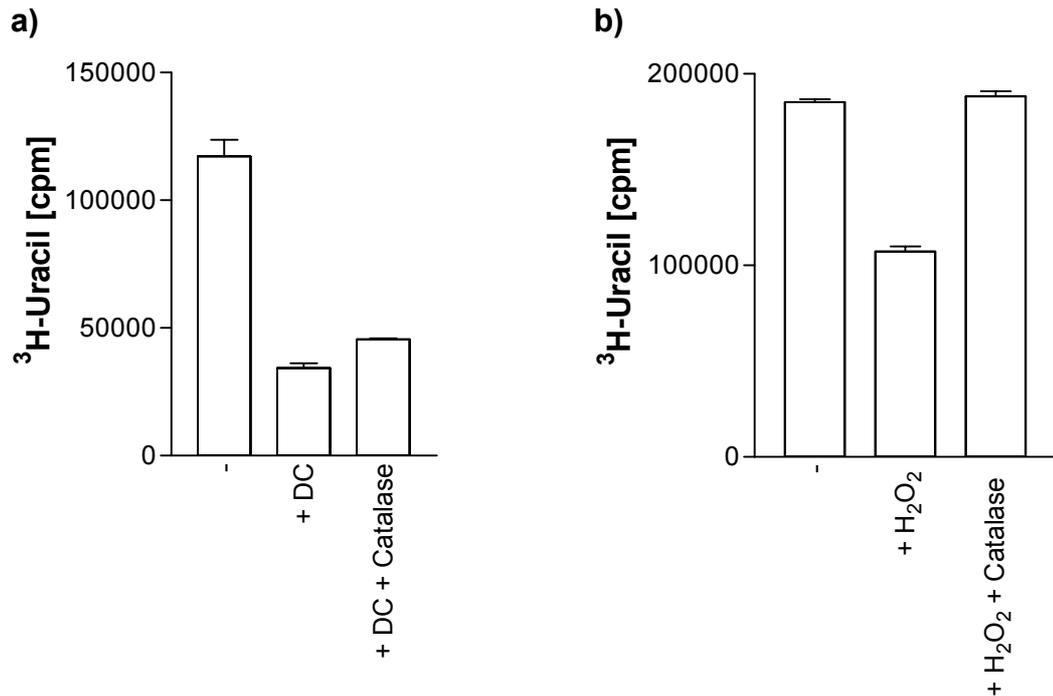


**Abb. 2.1.13:** *Toxoplasma*-Proliferationstest bei Zugabe von Tryptophan. a)  $2 \times 10^5$  primäre Hirnzellkulturen infiziert mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten mit/ohne DC und 100  $\mu\text{g/ml}$  Tryptophan. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens fünf voneinander unabhängigen Experimenten. b)  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen 3 Tage stimuliert mit 1000 U hu-IFN $\gamma$ , danach Infektion mit  $2 \times 10^4$  Tachyzoiten in Tryptophan-freiem Medium +/- 100  $\mu\text{g/ml}$  Tryptophan, Stopp nach weiteren 3 Tagen bei  $-20^\circ\text{C}$ .

#### Reaktive Sauerstoff-Intermediate:

ROI-abhängige Effektormechanismen sind auch bei der Hemmung von *T. gondii* in DC beschrieben (Aline *et al.*, 2002). Murine Milz DC wurden mit IFN $\gamma$  stimuliert und nachträglich mit *T. gondii* infiziert. Die Proliferation der Parasiten war in diesen DC gehemmt.

Als antiparasitärer Faktor der DC im Doppelkammer-Kokultursystem käme nur Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in Frage, da länger aufbewahrter DC-Überstand (bei  $-20^\circ\text{C}$ ) auch eine Hemmung von *T. gondii* verursacht (siehe Kapitel 2.1.5.2). Andere reaktive Sauerstoffmoleküle wie  $\text{O}_2^-$  oder  $\text{OH}^-$  sind so instabil, dass sie nach kurzer Zeit abreagieren.

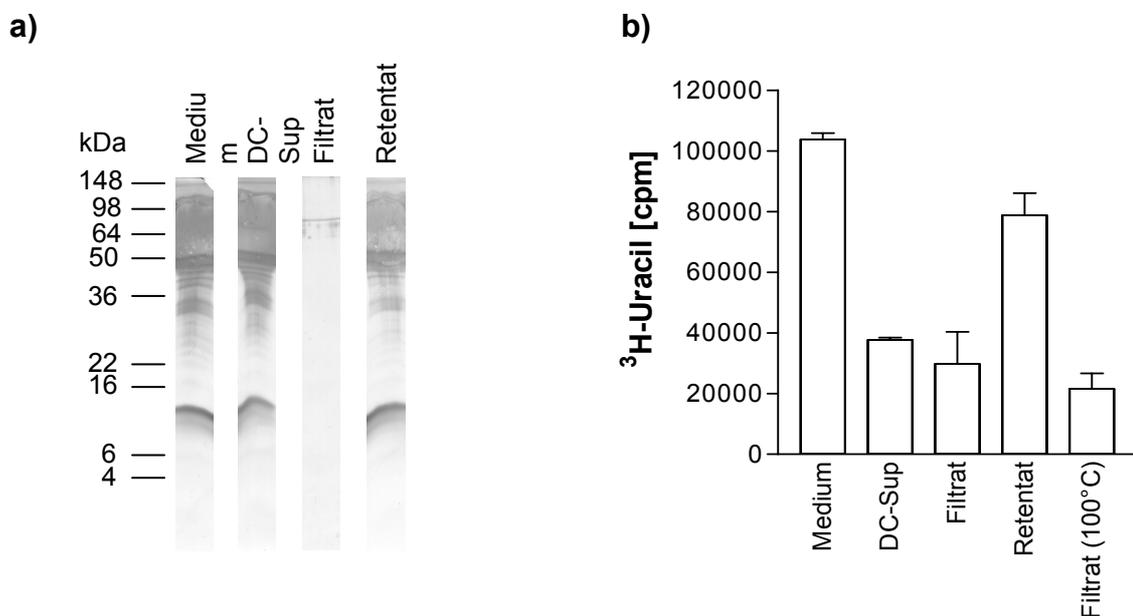


**Abb. 2.1.14:** *Toxoplasmen-Proliferationstest mit Zusatz von Catalase.* a) Primäre Hirnzellkulturen infiziert mit Tachyzoiten mit und ohne DC +/- 100 Units Catalase. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens vier voneinander unabhängigen Experimenten. b) Primäre Hirnzellkulturen infiziert mit Tachyzoiten + 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit und ohne 100 Units Catalase. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Durch Zugabe von Catalase, eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spaltendes Enzym, in den Toxoplasmen-Proliferationstest sollte geprüft werden, ob H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Ursache für die Hemmung von *T. gondii* durch DC ist. Dazu wurden primäre Hirnzellkulturen mit Tachyzoiten infiziert und mit DC und Catalase inkubiert. Eine Aufhebung der Hemmung ließ sich dadurch nicht erzielen (Abb. 2.1.14a). Zur Kontrolle der Catalase wurden infizierte primäre Hirnzellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt, was eine Hemmung von *T. gondii* zur Folge hatte. Der Zusatz von Catalase hob diese Hemmung vollständig auf (Abb. 2.1.14b). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte ebenfalls nicht im Überstand des Testansatzes nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Demzufolge scheinen reaktive Sauerstoff-Intermediate nicht die Ursache der Hemmung von *T. gondii* in primären Hirnzellkulturen durch DC zu sein.

### 2.1.5.2 Die toxoplasmastatische Aktivität wird sezerniert, ist hitzestabil, Proteinase K resistent und kleiner als 5 kDa

Dendritische Zellen hemmen *T. gondii* in verschiedenen Wirtszellen. Aufgrund der Verwendung von Transwells im Doppelkammer-Kokultursystem, das die Diffusion von kleinen Molekülen ( $< 0,4 \mu\text{m}$ ) durch die Membran erlaubt, ließ sich schlussfolgern, dass es sich um ein sezerniertes Molekül handelt, welches die Hemmung von *T. gondii* verursacht. Um Aufschluss über die Eigenschaften des sezernierten Moleküls zu bekommen, wurde Überstand von kultivierten DC hergestellt. Dazu wurden unreife DC aus dem Knochenmark mit einer Dichte von  $1,6 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Hirnzell-Medium in 6-well-Platten für 48 Stunden kultiviert. Die DC wurden durch differentielle Zentrifugation aus dem Überstand entfernt. Primäre Hirnzellkulturen wurden mit Tachyzoiten infiziert und 48 Stunden in dem DC-Überstand kultiviert. Als Kontrolle dienten mit Tachyzoiten infizierte primäre Hirnzellkulturen, die die gleiche Zeit in Medium kultiviert wurden (Abb. 2.1.15b). Der DC-Überstand verursachte wie bei Kokultivierung mit DC eine Hemmung der Toxoplasma-Proliferation.

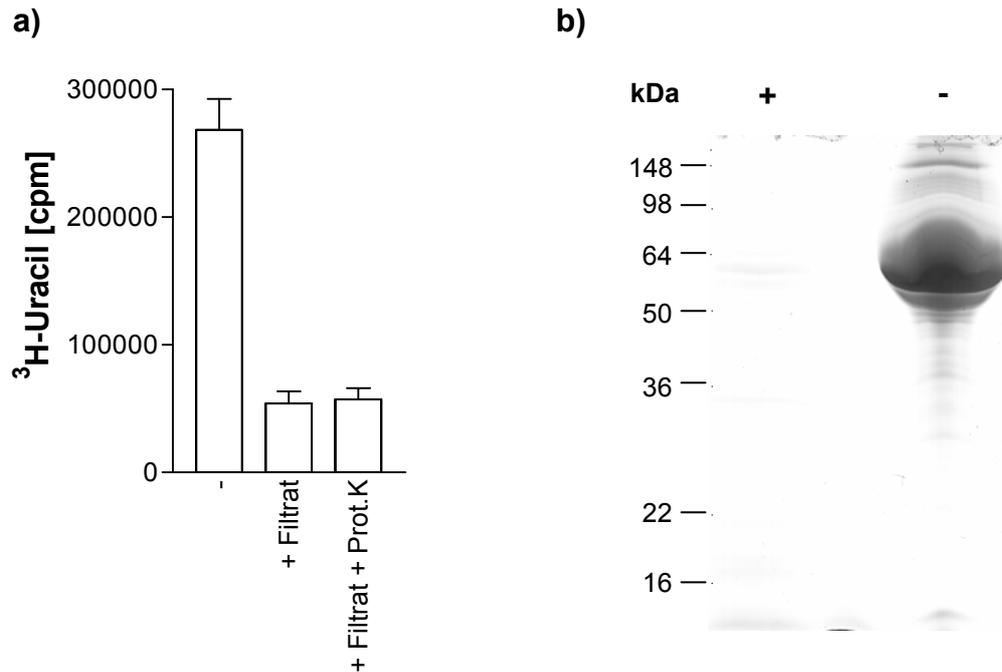


**Abb. 2.1.15:** Analyse von fraktioniertem DC-Überstand in der SDS-PAGE und im Toxoplasmen-Proliferationstest. DC-Überstand wurde über 5 kDa Ausschluss-Filter aufgetrennt a) Auftrennung des Mediums, DC-Überstandes (DC-Sup), Filtrat des DC-Überstandes, Retentat des DC Überstandes mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. b) Toxoplasmen-Proliferationstest je  $2 \times 10^5$  Hirnzellen infiziert mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten mit Zugabe der Fraktionen wie in a) beschrieben. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens acht unabhängigen Experimenten.

Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf den selektiven Verbrauch eines oder mehrere Nährstoffe des Mediums zurückzuführen ist, wurde der Überstand mit PBS verdünnt. Es zeigte sich, dass bei Verdünnung des DC-Überstandes die Hemmung der *T. gondii* Proliferation aufgehoben war, während eine Verdünnung des normalen Mediums keine Auswirkung auf die Proliferation hatte. Der Effekt ist somit auf ein sezerniertes Molekül der DC zurückzuführen und ein selektiver Nährstoffmangel als Ursache der Hemmung kann ausgeschlossen werden.

Für die nähere Charakterisierung des sezernierten Moleküls im DC Überstand wurde der Überstand mit Hilfe eines 5 kDa Ausschluss-Filters fraktioniert. Dabei enthielt das Filtrat alle Moleküle, die kleiner als 5 kDa sind (Abb. 2.1.15a). Das in den Proliferationstest eingesetzte Filtrat, wurde mit FCS supplementiert, da das FCS vollständig im Retentat verblieben war. Das Retentat wurde mit Medium ohne FCS wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Es enthielt alle Moleküle größer als 5 kDa (Abb. 2.1.15a). Beide Fraktionen wurden in den Toxoplasmen-Proliferationstest eingesetzt. Wie aus Abb. 2.1.15b ersichtlich, war die Hemmung der *T. gondii* Proliferation mit dem Retentat fast vollständig aufgehoben, während die Hemmung bei Verwendung des Filtrats bestehen blieb. Die antiparasitäre Aktivität ist folglich kleiner als 5 kDa. Durch 20minütiges Kochen des Filtrats konnte keine Aufhebung der Hemmung der Toxoplasma-Proliferation erzielt werden (Abb. 2.1.15b). Das sezernierte Molekül ist somit hitzestabil.

Eine weitere Analyse der von DC sezernierten Aktivität sollte zeigen, ob die Aktivität zur Klasse der Proteine gehört. Dazu wurde das Filtrat eine Stunde bei 37°C mit Proteinase K behandelt. Zur Kontrolle der Enzymaktivität der Proteinase K wurde parallel zum Filtrat auch DC-Überstand behandelt. In der SDS-PAGE Analyse in Abb. 2.1.16b ist gezeigt, dass das Rinderserumalbumin, der Hauptbestandteil des FCS, vollständig durch Proteinase K abgebaut wurde. Mit einem 5 kDa Ausschluss-Filter ließ sich die Proteinase K aus dem Filtrat oder DC-Überstand entfernen. Das Proteinase K-behandelte Filtrat wurde in einen Proliferationstest mit *T. gondii* infizierten Hirnzellen eingesetzt. Die Behandlung mit Proteinase K hob die Aktivität im DC-Überstand nicht auf (Abb. 2.1.16a).



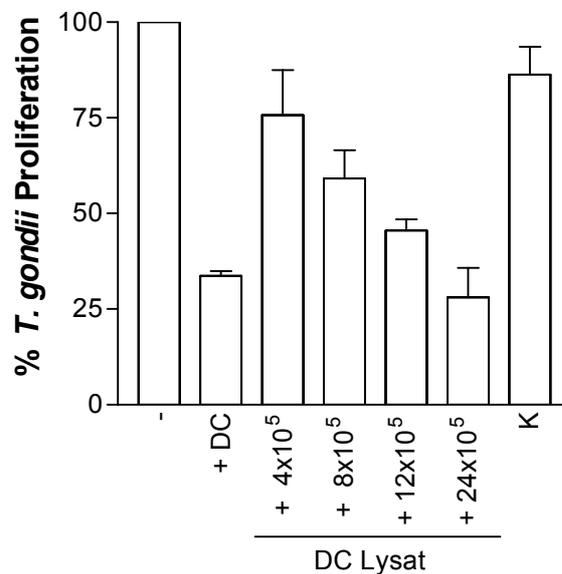
**Abb. 2.1.16:** *Toxoplasmen-Proliferationstest mit Proteinase K-behandeltem filtriertem DC-Überstand.*  
 a)  $2 \times 10^5$  Hirnzellen infiziert mit Tachyzoiten in Medium (-), in Filtrat des DC-Überstandes (+ Filtrat) oder in Filtrat des DC-Überstandes nach mit Proteinase K-Behandlung für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  (+ Filtrat + Prot.K). Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. b) Kontrolle der Enzymaktivität der Proteinase K. DC-Überstand wurde für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  ohne (-) und mit Proteinase K (+) inkubiert und danach im 12% SDS-Gel aufgetrennt.

Kontrollexperimente, in denen das Filtrat oder Medium ohne Proteinase K und Medium mit Proteinase K der gleichen Behandlung unterzogen wurde wie das behandelte Filtrat, ergaben keine Hemmung der *T. gondii* Proliferation. Eine stärkere zusätzliche Behandlung mit einem Cocktail aus Pronase E und Proteinase K, deren Inkubation 48 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  verlief, ergab ebenfalls keine Aufhebung des Proliferationswachstums von *T. gondii* durch das Filtrat. Auch eine Phenol/Chloroform Extraktion des filtrierten DC-Überstandes führte nicht zur Aufhebung der Hemmung der *T. gondii* Proliferation. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem sezernierten Molekül um ein Protein handelt.

### 2.1.5.3 Die anti-*T. gondii* Aktivität ist im DC-Lysat nachweisbar

Der Test ob DC-Lysat ebenfalls die *T. gondii*-Proliferation hemmt, lässt Rückschlüsse darüber zu, ob das sezernierte Molekül bereits in der Zelle vorliegt oder *de novo*

synthetisiert werden muss. Dazu wurden DC in drei Einfrier-/Auftauzyklen in 100  $\mu$ l Medium lysiert. Die kleinste Menge lysierter DC entsprach mit  $4 \times 10^5$  pro Transwell der Zellzahl, die auch für die Kokultivierung eingesetzt wurde.



**Abb. 2.1.17:** *Toxoplasmen-Proliferationstest mit DC-Lysat.*  $2 \times 10^5$  Hirnzellen wurden mit  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten infiziert unter Zugabe von:  $4 \times 10^5$  DC (DC) und DC-Lysat aus  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $12 \times 10^5$  und  $24 \times 10^5$  DC oder prä-DC-Lysat hergestellt aus  $24 \times 10^5$  prä-DC (K). Die Markierung des Tests erfolgte mit  $^3\text{H}$ -Uracil nach 24 h und der Tests wurde nach 48 h gestoppt.

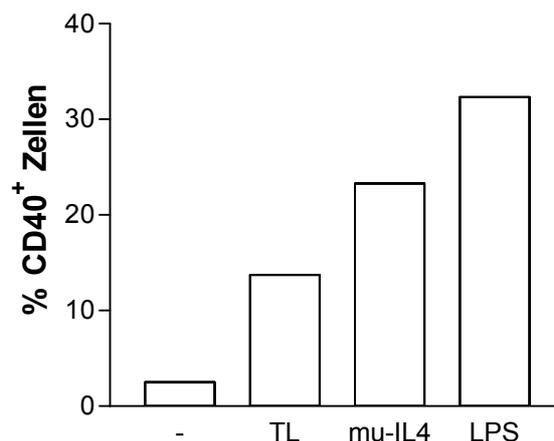
Das DC-Lysat wurde als Rohlysate in titrierten Dosen in den Toxoplasmen-Proliferationstest eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten lebendige DC im Transwell (Abb. 2.1.17) und als Negativkontrolle Prä-DC-Lysate (Abb. 2.1.17). Erst bei der drei- bis sechsfach höheren DC-Zahl war im Vergleich zu den lebendigen DC eine ähnliche Hemmung der *T. gondii* Proliferation mit DC-Lysate zu beobachten. Prä-DC-Lysate erzeugte keine Hemmung der Toxoplasma-Proliferation (Abb. 2.1.17).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass DC die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* hemmen. Die antiparasitäre Aktivität wirkt toxoplasmastatisch, wobei die Wirtszelle wahrscheinlich an diesem antiparasitären Effekt beteiligt ist. Die antiparasitäre Aktivität wird konstitutiv von DC sezerniert, ist kleiner als 5 kDa, hitzestabil und gehört nicht zur Klasse der Proteine. Der Faktor liegt bereits in der Zelle vor, wobei er für die antiparasitäre Wirkung stetig produziert werden muss.

## 2.2 *T. gondii* induziert eine Reifung muriner Dendritischer Zellen

### 2.2.1 *T. gondii* Lysat und murines IL4 induzieren in Dendritischen Zellen einen reifen Phänotyp

Es ist beschrieben, dass mikrobielle und immunologische Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS) und Interleukin-4 (IL4) unreife DC zur Reifung bringen (De Smedt *et al.*, 1996; Lutz *et al.*, 2000). Weiterhin wird gezeigt, dass auch Toxoplasma-Lysat die IL12 Produktion bei DC induziert (Sousa *et al.*, 1997). Nur reife DC sezernieren IL12. Damit liegt die Annahme nahe, dass Toxoplasma-Lysat Reifung von DC induzieren kann. Hier soll geprüft werden, ob unreife DC durch Stimulation mit Toxoplasma-Lysat zu reifen DC differenzieren. Dazu wurden unreife DC alternativ mit Toxoplasma-Lysat oder LPS oder IL4 stimuliert. Die Expression der Oberflächenmoleküle auf den DC und damit der Reifungsstatus der DC ließ sich mit Hilfe der Durchflusszytometrie (5.5.5) analysieren. Sowohl IL4 als auch LPS dienten als Kontrollstimuli für die Differenzierung der unreifen DC in reife DC. Als Markermolekül für den Reifungszustand der DC wurde das costimulatorische Molekül CD40 verwendet. In Abb. 2.2.1 ist die Expression von CD40 auf den DC nach Gabe der verschiedenen Stimuli dargestellt.

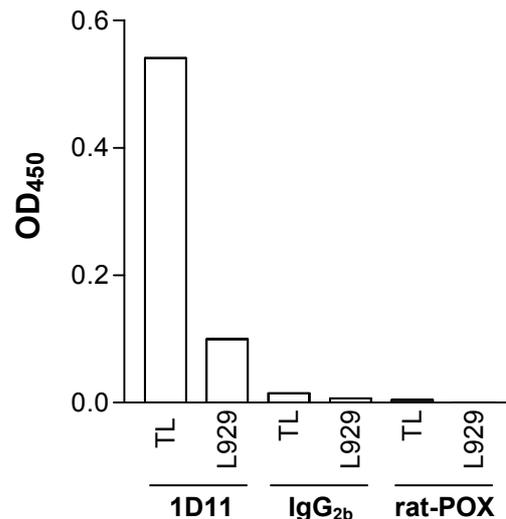


**Abb. 2.2.1:** FACS-Analyse der Expression von CD40 auf Dendritischen Zellen.  $4 \times 10^6$  CD11c<sup>+</sup> Knochenmark-DC wurden am Tag 6 ohne Stimulus (-), mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 100 ng/ml mu-IL4 oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Toxoplasma-Lysat (TL) in Knochenmarks-Medium gegeben. Nach zwei Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und die CD40-Expression auf der Oberfläche im FACS analysiert.

Während die Population unbehandelter DC nur einen kleinen Teil reifer DC enthalten (2,5% CD40<sup>+</sup> Zellen), zeigten mit LPS oder IL4 behandelte Zellen eine 13fache bzw. 9fache Erhöhung des Anteils an CD40<sup>+</sup> Zellen. Durch Toxoplasma-Lysat wurden weniger Zellen zur Reifung gebracht als durch LPS oder IL4. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stieg der Anteil der reifen DC um das 5,5fache auf 13,72%. Eine Kontamination des Toxoplasma-Lysats mit LPS könnte eine Differenzierung der unreifen DC in reife DC hervorrufen. Um dies auszuschließen, wurde das Lysat mittels LPS-Test untersucht. Das Toxoplasma-Lysat enthielt weniger als 0,1 ng/ml LPS. Diese Konzentration verursacht in DC noch keine Reifung. Folglich muss ein Molekül des Parasiten die DC-Reifung induzieren.

### 2.2.2 Nachweis einer anti-IL4 Reaktivität in Tachyzoiten-Lysat

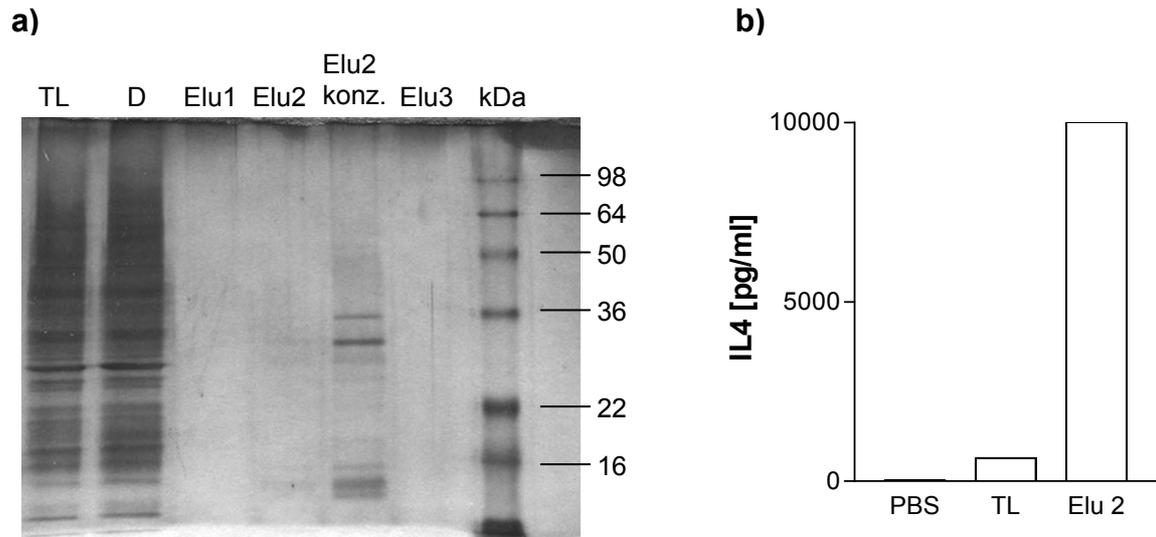
In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass Toxoplasma-Lysat mit verschiedenen anti-IL4-Antikörpern eine Reaktion im ELISA (5.5.3) zeigt. Eine Möglichkeit für die Reifung der DC durch Toxoplasma-Lysat ist ein IL4-homologes Molekül in *T. gondii* Tachyzoiten, das an den IL4 Rezeptor der DC binden kann und somit das Reifungssignal induziert. Die Analyse des Toxoplasma-Lysats wurde in einem IL4-Festphasen ELISA wiederholt. Dazu wurden 1,2 µg Toxoplasma-Lysat in einer 96-well-Platte angelagert und mit dem monoklonalen anti-IL4 Antikörper 1D11 inkubiert (Abb. 2.2.2). Um eine Kreuzreaktivität mit Wirtszellen oder unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, wurde neben Toxoplasma-Lysat auch Wirtszell-Lysat im Festphasen-ELISA untersucht. Das Toxoplasma-Lysat zeigte ein eindeutiges Signal mit dem anti-IL4 Antikörper (Abb. 2.2.2). Der Anteil an Wirtszellproteinen kann ein solches Signal nicht hervorrufen, da selbst das pure Kontroll-Lysat nur eine sehr geringe Kreuzreaktivität zeigte. Auch die Detektion mit dem Kontrollantikörper desselben Isotyps wie der anti-IL4 Antikörper (IgG<sub>2b</sub>) zeigte keine Reaktivität mit Toxoplasma-Lysat. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers (anti-rat-POX) kann ausgeschlossen werden, da bei alleiniger Verwendung des Sekundärantikörpers, keine Reaktion zu sehen war (Abb. 2.2.2). *T. gondii* besitzt demnach ein Protein, dass von anti-IL4 Antikörpern erkannt wird.



**Abb. 2.2.2:** *IL4-Festphasen-ELISA mit Toxoplasma-Lysat.* Anlagerung von 1,2 µg Toxoplasma-Lysat (TL) und Wirtszelllysat (L929) und anschließende Detektion mit dem monoklonalem murinen anti-IL4 Antikörper 1D11 und mit Kontrollantikörpern desselben Isotyps (IgG<sub>2b</sub>) und nur mit Sekundärantikörpern (anti-Ratte-POX).

### 2.2.3 Immunoaffinitätschromatographische Anreicherung anti-IL4-reaktiver Proteine

Zur weiteren Charakterisierung anti-IL4-reaktiver Proteine wurde Toxoplasma-Lysat aufgereinigt und angereichert. Für die Aufreinigung und die Anreicherung anti-IL4-reaktiver Proteine ist die Immunoaffinitätschromatographie geeignet (5.5.2). Dabei wurde ein monoklonaler anti-IL4 Antikörper kovalent an eine NHS-aktivierte Sepharose Säule gebunden. Das aufzureinigende Toxoplasma-Lysat wurde für eine Stunde bei 100000 x g zentrifugiert, um unlösliche Partikel abzutrennen. Danach wurde das partikelfreie Lysat über die mit anti-IL4 Antikörper beladene Säule gepumpt und die Säule anschließend gewaschen. Mit Glycin pH2 ließen sich die gebundenen Proteine eluieren. Es wurden 5 Elutionsfraktionen zu je 5 ml gesammelt, wobei die Elutionsfraktion 2 den Hauptanteil des gesuchten Proteins enthielt. Diese Fraktionen wurden neutralisiert, da sonst das Glycin und der niedrige pH-Wert die weiteren Analysen behinderten. Die einzelnen Fraktionen wurden sowohl in der SDS-PAGE (Abb. 2.2.3a) als auch im IL4 ELISA (Abb. 2.2.3b) analysiert.



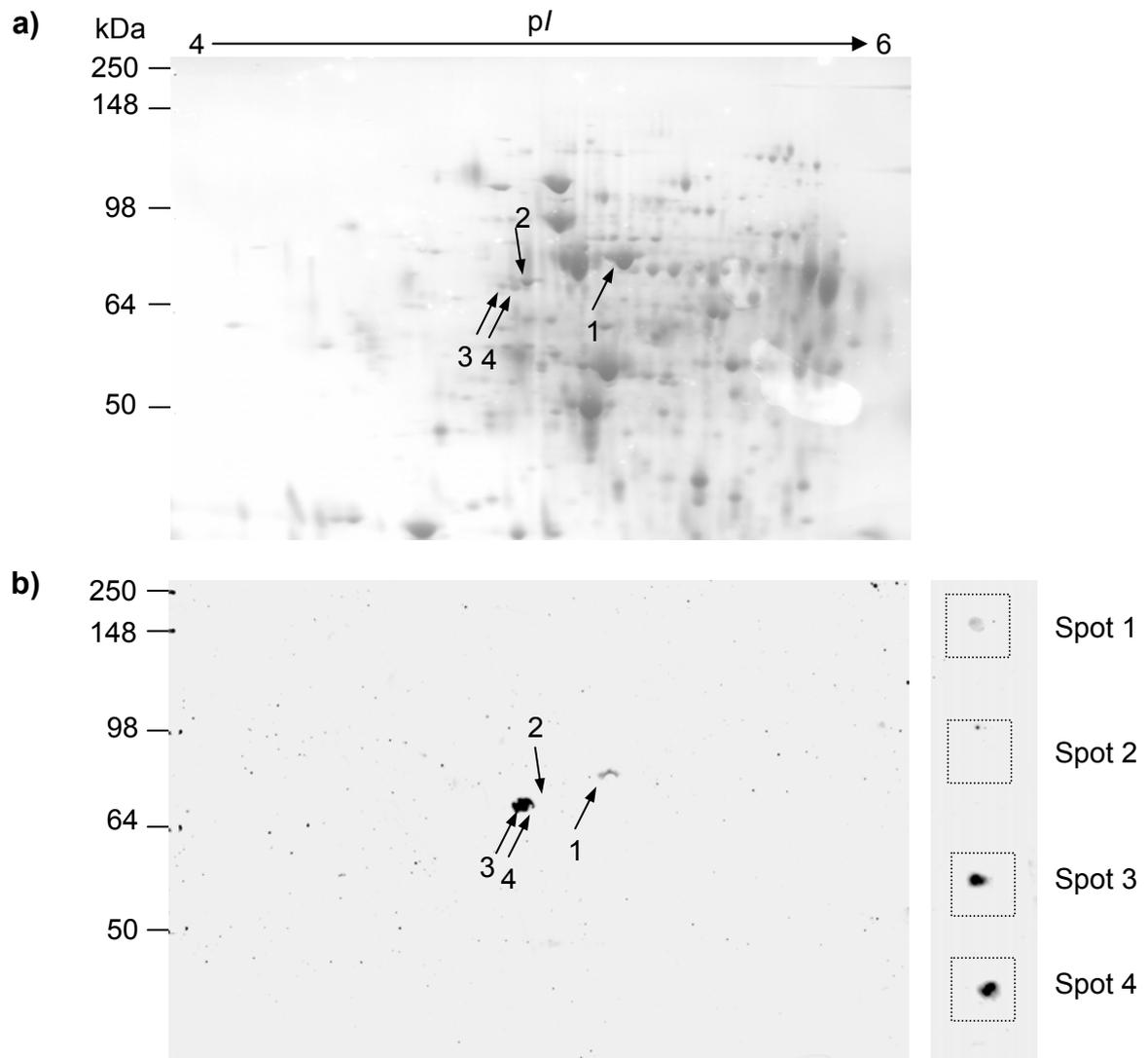
**Abb. 2.2.3:** Analyse der Elutionsfraktionen nach der Immunoaffinitätschromatographie mittels SDS-PAGE und IL4-ELISA. a) SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung des Ausgangslysates (TL), des Durchlaufes (D), der ersten drei Elutionsfraktionen (Elu 1 – 3) und der ankonzentrierten Elutionsfraktion 2 (Elu2 konz.). b) IL4-Sandwich-ELISA: Analyse von Toxoplasma-Lysat (TL), Elutionsfraktion 2 (Elu 2) und als Kontrolle PBS.

In den Fraktionen ließen sich in der SDS-PAGE des Ausgangslysats und im Durchlauf viele Proteine nachweisen. In den Elutionsfraktionen war in der zweiten Fraktion ein schwaches Signal bei ca. 30 kDa zu sehen. Nach dem Aufkonzentrieren dieser Elutionsfraktion mit einem 5 kDa Ausschluss-Filter waren deutlich zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 30 und 36 kDa zu erkennen (Abb. 2.2.3a). In einem IL4-Sandwich-ELISA wurde das Lysat und die aufkonzentrierte Elutionsfraktion 2 analysiert (Abb. 2.2.3b). Hier zeigte sich, dass die anti-IL4 Reaktivität um das 15fache angereichert war. Ein Immunoblot der aufkonzentrierten Elutionsfraktion 2 mit diversen anti-IL4 Antikörper blieb negativ (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der harschen Elutionsbedingungen ist es möglich, dass die IL4-ähnlichen Proteine degradiert wurden und für die Antikörper im Immunoblot nicht mehr detektierbar waren, denn im Immunoblot mit unbehandeltem Toxoplasma-Lysat war die IL4-Reaktivität nachweisbar.

## 2.2.4 Identifizierung anti-IL4-reaktiver Proteine im Tachyzoitenproteom

Da nach der Immunoaffinitätsaufreinigung das Protein im Immunoblot nicht nachgewiesen werden konnte, wurde für die weitere Charakterisierung dieses Proteins Toxoplasma-Lysat mittels Zweidimensionaler-Gelelektrophorese (5.4.8) aufgetrennt. Dazu wurde ein Milligramm Toxoplasma-Lysat isoelektrisch fokussiert. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte in einem 9,5% SDS-Gel. Das mit Zink-Imidazol gefärbte Gel (5.4.7.3) ist in Abb. 2.2.4a dargestellt. Eine grobe Lokalisierung von anti-IL4-reaktiven Spots mit Hilfe des Immunoblots (5.4.7.4 und 5.5.1) zeigte, dass an zwei verschiedenen Punkten im Proteom eine Reaktivität mit anti-IL4 Antikörpern vorhanden war. Um diese Proteinspots genauer zu lokalisieren und zu identifizieren, wurden verschiedene Spots in dieser Region aus einem negativ gefärbten Gel ausgestochen. Die Proteine aus den ausgestochenen Gelstücken sowie das restliche Gel wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit einem anti-IL4 Antikörper ließen sich diese Proteine auf ihre Reaktivität testen. Von den vier ausgestochenen Spots (Abb. 2.2.4a) wiesen drei eine Reaktion mit dem anti-IL4 Antikörper 1D11 auf (Abb. 2.2.4b). Eine Zuordnung der reaktiven Proteinspots war zu folgenden Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten möglich:

Spot 1:	86 kDa,	pI 5,19
Spot 3:	80 kDa,	pI 4,94
Spot 4:	80 kDa,	pI 4,91.



**Abb. 2.2.4:** Position anti-IL4-reaktiver *T. gondii* Proteine im Tachyzoitenproteom. a) Zweidimensionale Auftrennung von 1 mg TLA, 1. Dimension: isoelektrische Fokussierung in 18 cm IPG-Streifen mit linear verteiltem pI von 4 bis 7; 2. Dimension: 9,5% SDS-PAGE, wobei der Streifen um eine pI-Einheit verkürzt wurde, Zn-Imidazol gefärbt. b) Immunoblot des kompletten zweidimensionalen Geles und der 4 ausgestochenen Proteinspots; Detektion mit monoklonalem anti-IL4 Antikörper (1D11).

Nach genauer Lokalisation der Proteine wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Spots aus einem Coomassie-gefärbten Parallelgel ausgestochen und tryptisch verdaut. Die Massen und Sequenzen der gefundenen tryptischen Peptide sind in Tab. 2.2.1 dargestellt. Für Spot 4 konnten wegen der geringen Menge an Ausgangsmaterial keine Peptid-Sequenzen ermittelt werden.

Spot	Peptid	gemessene Masse	theoretische Masse	Vermutetes Protein	Protein im ORF
1	VDIIPNDQGNRI	1239,58 Da	1239,62 Da	'dnaK-type molecular chaperon'	35-45
	FEELNSDLFQK	1368,98 Da	1368,66 Da		309-319
	IINEPTAAAIAYGLDK	1658,98 Da	1658,89 Da		181-196
	NAVVTVPAYFNDAQR	1663,78 Da	1663,83 Da		150-164
	VEVENLMEGVDFSETLTR	2066,78 Da	2066,98 Da		289-306
3	LEADELESER	1189,78 Da	1189,55 Da	MAG1	231-240
	QLVGTAAGEIEEGVK	1499,94 Da	1499,78 Da		378-392
	VQSGGDFDISFEVGR	1611,78 Da	1611,75 Da		198-212

**Tab. 2.2.1:** Ergebnis der massenspektrometrischen Proteinanalyse. Die ausgestochenen Proteinspots wurden im Gel einer Trypsinbehandlung unterzogen. Die Sequenzen der eluierten Peptide wurden mittels Elektronspray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie und BLAST2 Suche ermittelt. Die zugehörige cDNA kodiert bei Spot 1 für ein Protein mit 642 Aminosäuren und für Spot 3 für ein Protein mit 452 Aminosäuren. Alle Peptidsequenzen für Spot 1 bzw. 3 finden sich in diesen deduzierten Proteinsequenzen. Die dargestellten Massen entsprechen Monoisotopischen Massen  $[M + H]^+$ , die aus den aufgenommenen Spektren berechnet werden.

Bei der Datenbankanalyse stimmten die jeweiligen Peptidsequenzen zu 100% mit den Sequenzen der beiden Proteine überein. MAG1 erhielt seinen Namen, weil dieses Antigen nur in der Zystenmatrix exprimiert wird. Dieses Protein wurde bisher nur in Zysten, aber nicht in Tachyzoiten oder in parasitophoren Vakuolen von Tachyzoiten-infizierten Wirtszellen gefunden (Parmley *et al.*, 1994). Das ‚dnaK-type molecular chaperon‘ gehört zur Superfamilie der ‚heat shock protein‘ 70 (Hsp70). Mitglieder der Hsp70 Familie besitzen eine Funktion als molekulare Chaperone im endoplasmatischen Retikulum und im Zytoplasma (Kuppner *et al.*, 2001).

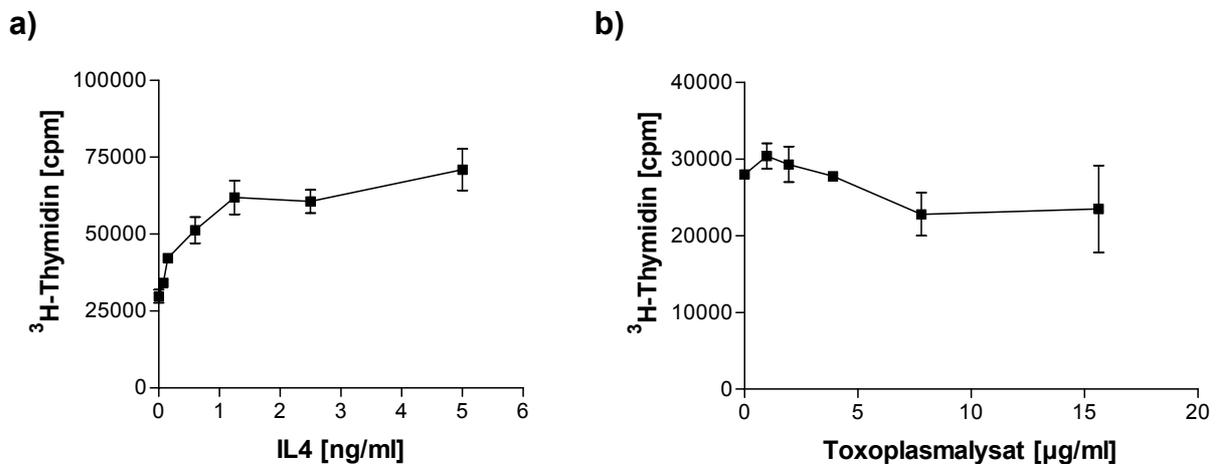
## 2.2.5 *T. gondii* Lysat besitzt keine biologische IL4-Aktivität

### 2.2.5.1 *T. gondii* Lysat induziert keine Proliferation von IL4-Indikatorzellen

Die Reaktivität eines *T. gondii* Proteins mit einem anti-IL4 Antikörper sagt noch nichts über die tatsächliche Bindung an einen IL4-Rezeptor und damit seine biologische

Aktivität aus. Aus diesem Grund wurden Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob Toxoplasma-Lysat IL4-Aktivität besitzt, die tatsächlich über den IL4-Rezeptor wirkt und so mit dem Immunsystem des Wirtes interagieren kann.

Nachdem gezeigt wurde, dass Toxoplasma-Lysat zwei Proteine enthält, die von anti-IL4 Antikörpern detektiert werden, war zu überprüfen, ob Toxoplasma-Lysat über den IL4-Rezeptor wirkt. Dazu bietet sich ein *in vitro* Test mit Indikatorzellen an. Knochenmarkszellen von Mäusen differenzieren unter dem Einfluss von Interleukin-3 (IL3) in 4 bis 5 Wochen zu Mastzellen (5.1.4.1). Die zusätzliche Gabe von IL4 zu Mastzellen führt zu einer erhöhten Proliferation dieser Zellen (Schmitt *et al.*, 1987). Dieser Effekt sollte für einen Bioassay auf IL4 genutzt werden. Dazu wurden Mastzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Toxoplasma-Lysat und als Kontrolle mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem IL4 inkubiert. Die Proliferation der Mastzellen ließ sich anhand des eingebauten  $^3\text{H}$ -Thymidins messen. In Abb. 2.2.5a ist gezeigt, dass die Proliferation der Mastzellen bereits durch 1 ng/ml IL4 verdoppelt wurde. Das Maximum war mit 5 ng/ml erreicht.



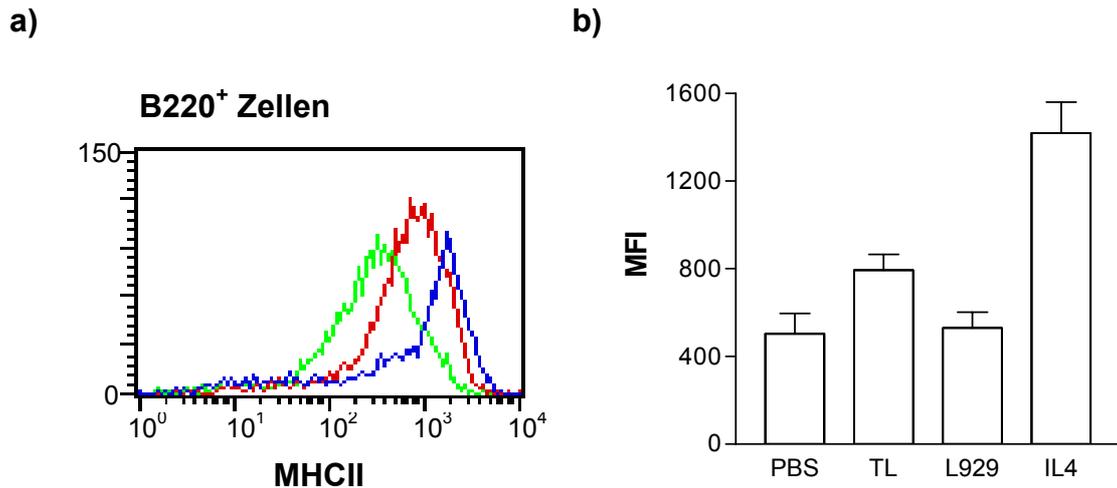
**Abb. 2.2.5:** Mastzellproliferationstests mit IL4 und Toxoplasma-Lysat. 3000 Mastzellen pro 96-well wurden mit 1% IL3 und mit: a) IL4 und b) Toxoplasma-Lysat inkubiert. Die Testdauer betrug drei Tage, nach zwei Tagen erfolgte die Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin.

Bei Verwendung von Toxoplasma-Lysat war keine Erhöhung der Mastzellproliferation zu beobachten (Abb. 2.2.5b). Bei höheren Konzentrationen (ab 20 µg/ml Gesamtprotein) lag sogar eine Hemmung der Proliferation vor. Es ist denkbar, dass die Anwesenheit anderer Bestandteile im Toxoplasma-Lysat störend war. Deshalb wurde dieses Experiment ebenfalls mit dem immunoaffinitätschromatographisch

aufgereinigten Toxoplasma-Lysat (2.2.3) durchgeführt. Die Fraktion mit der angereicherten IL4-Aktivität induzierte jedoch keine Erhöhung des Mastzellwachstums (Daten nicht gezeigt). Proteine aus Toxoplasma-Lysat zeigten folglich keine IL4-Bioaktivität.

### **2.2.5.2 *T. gondii* Lysat induziert die Expression von MHCII-Molekülen auf B-Zellen**

Parallel zu den Experimenten mit den Indikatorzellen wurden *in vivo* Analysen zur Wirkung der IL4-Reaktivität von Toxoplasma-Lysat durchgeführt. Es ist bekannt, dass B-Zellen aus der Milz durch IL4 verstärkt MHCII-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Noelle *et al.*, 1984). Bei intravenöser Injektion von rekombinantem IL4 wird ein Anstieg der MHCII-Expression auf B-Zellen aus der Milz gemessen (Finkelman *et al.*, 1993). Um auszuschließen, dass die Ursache der erhöhten MHCII-Expression nicht endogenes IL4 ist, wurden IL4 ‚knock out‘ (IL4<sup>-/-</sup>) Mäuse verwendet. Wenn Toxoplasma-Lysat ein IL4-analoges Protein besitzt, welches über den IL4 Rezeptor wirkt, dann sollte nach intravenöser Injektion des Lysats ein Anstieg der MHCII-Expression auf den B-Zellen aus der Milz beobachtet werden. IL4<sup>-/-</sup> Mäusen wurde intravenös rekombinantes IL4, Toxoplasma-Lysat und Kontroll-Lysat aus L929-Fibroblasten bzw. PBS appliziert. Nach ca. 16 Stunden erfolgte die Präparation der Milz aus den Mäusen und die Analyse der B220<sup>+</sup> Zellen im Durchflusszytometer (5.5.5) (Abb. 2.2.6a/b). Die Verabreichung von Toxoplasma-Lysat hatte eine Erhöhung der MHCII-Expression auf B-Zellen zur Folge (Abb. 2.2.6). Kontroll-Lysat aus den Wirtszellen (L929) ergab keinen Expressionsanstieg. Durch IL4-Gabe steigt die Expression der MHCII-Moleküle auf den B-Zellen um das Dreifache im Vergleich zu den B-Zellen von PBS-behandelten Mäusen. Bei der Injektion von Toxoplasma-Lysat hingegen erhöhte sich der Anstieg der MHCII-Expression auf den B-Zellen aus der Milz maximal um das Doppelte. Toxoplasma-Lysat induzierte somit eine MHCII-Expression auf den B-Zellen aus der Milz, die allerdings nicht so stark war wie mit der optimalen Dosis von IL4.

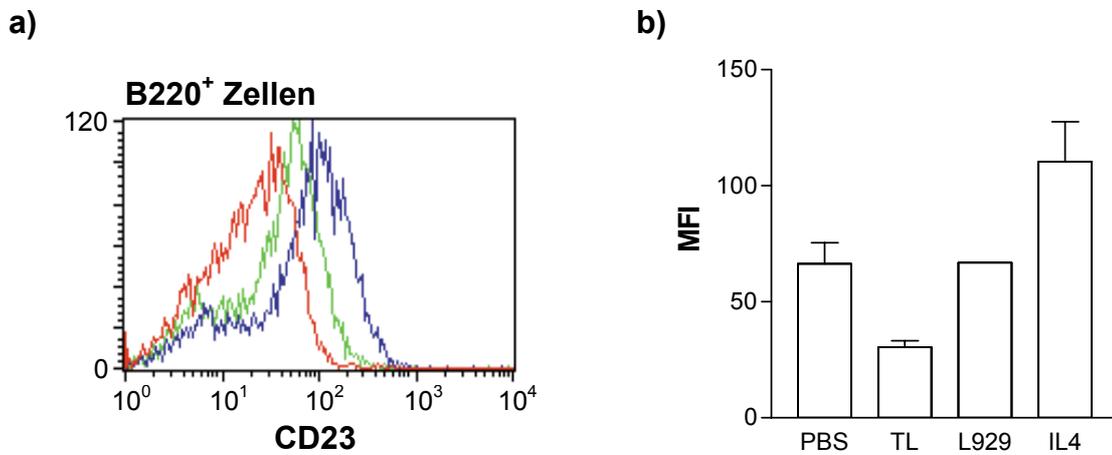


**Abb. 2.2.6:** FACS-Analyse von B220<sup>+</sup> Zellen. Mäusen wurde intravenös PBS, rekombinantes IL4 (100 ng), 1 mg Wirtszelllysate (L929) oder 1 mg Toxoplasma-Lysate (TL) injiziert. Nach 16 h wurden Gesamtmilzzellen präpariert und die MHCII-Expression von B220<sup>+</sup> Zellen im FACS analysiert. a) exemplarisches Histogramm einer FACS-Analyse der Gesamtmilzzellen aus Mäusen denen PBS, TL bzw. IL4 appliziert wurde; b) Darstellung der Ergebnisse aus a) in einem Balkendiagramm (MFI = ‚mean fluorescence intensity‘). Insgesamt wurden sieben voneinander unabhängige Experimente mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

### 2.2.5.3 *T. gondii*-Lysat zeigt keine IL4-artige Aktivität

Da Toxoplasma-Lysat im Vergleich zu IL4 die MHCII-Expression auf den B-Zellen nicht so stark induziert, wurden zur Kontrolle dieses Befundes zwei weitere Analysen durchgeführt. Es ist beschrieben, dass IL4 eine zwölffache Erhöhung der MHCII-Expression auf B-Zellen hervorruft und zusätzliches IFN $\gamma$  diesen Effekt hemmt, aber IFN $\gamma$  allein eine zweifache Erhöhung der MHCII-Expression bewirkt (Conrad *et al.*, 1987). Da aber bei Injektion von Toxoplasma-Lysat nur eine zweifache Erhöhung der MHCII-Expression zu beobachten war, wurde eine weitere Messstrecke gewählt, um zu kontrollieren, ob der Effekt über den IL4-Rezeptor vermittelt wird und nicht etwa durch endogenes IFN $\gamma$ . Zusätzlich zu MHCII-Antigenen exprimieren murine B-Zellen aus der Milz auch Fc-Rezeptoren für Immunglobulin E (Fc $\epsilon$ R), das auch als CD23 bekannt ist. In der Literatur ist beschrieben, dass ausschließlich durch IL4 die Expression von CD23 auf B-Zellen hochreguliert wird (Waldschmidt *et al.*, 1989).

Weiterhin wird erwähnt, dass  $\text{IFN}\gamma$  allein die CD23 Expression auf B-Zellen reduziert (Conrad *et al.*, 1987).

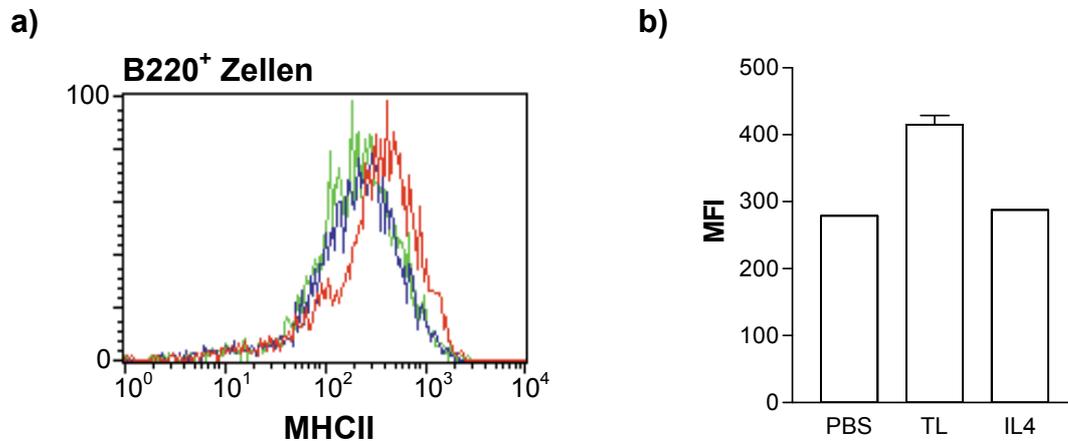


**Abb. 2.2.7:** FACS-Analyse der CD23-Expression auf B-Zellen der Milz. Mäusen wurde intravenös PBS, 1 mg Toxoplasma-Lysat (TL), 1 mg Wirtszelllysate (L929) oder 100 ng rekombinantes IL4 injiziert. Nach 16 h wurden Gesamtmilzzellen präpariert und die CD23-Expression von B220<sup>+</sup> Zellen im FACS analysiert. a) exemplarisches Histogramm einer FACS-Analyse der Gesamtmilzzellen aus Mäusen denen PBS (grün), TL (rot) bzw. IL4 (blau) appliziert wurde; b) Darstellung der Ergebnisse aus a) in einem Balkendiagramm (MFI = ‚mean fluorescence intensity‘). Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Experimente mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Um zu kontrollieren, ob die erhöhte Expression der MHCII-Moleküle auf den B-Zellen durch Toxoplasma-Lysat die Folge IL4-ähnlicher Moleküle ist, wurde die CD23-Expression auf der Oberfläche der B-Zellen nach Toxoplasma-Lysat Injektion untersucht. In Abb. 2.2.7 ist eine exemplarische FACS-Analyse mit anti-CD23 Antikörper aus vier voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der Untersuchung der CD23-Expression auf den B-Zellen der Milz nach Injektion von Toxoplasma-Lysat war eine Reduktion der CD23-Expression zu beobachten (Abb. 2.2.7). Die Kontrollen mit IL4 wiesen eine Erhöhung der CD23-Expression auf und das Wirtszell-Lysat zeigte keine Veränderung der CD23-Expression. Die Injektion von Toxoplasma-Lysat führt also nicht wie IL4 zur Erhöhung sondern wie  $\text{IFN}\gamma$  zur Absenkung der CD23-Expression.

Eine andere Kontrolle zu der Hypothese, dass Toxoplasma-Lysat ein funktionelles IL4-homologes Molekül besitzt, ist die Injektion von Toxoplasma-Lysat in IL4-Rezeptor ‚knock out‘ (IL4R<sup>-/-</sup>) Mäuse. Bei einem IL4-Rezeptor-vermittelten Effekt sollte sowohl durch intravenöse Injektion von rekombinantem IL4 als auch von

Toxoplasma-Lysat keine erhöhte Expression von MHCII-Molekülen auf der Oberfläche von B-Zellen aus der Milz beobachtet werden.



**Abb. 2.2.8:** FACS-Analyse der MHCII-Expression auf B-Zellen der Milz von  $IL4R^{-/-}$  Mäusen. Mäusen wurde intravenös PBS, 1 mg Toxoplasma-Lysat (TL) oder 100 ng rekombinantes IL4 injiziert. Nach 16h wurden Gesamtmilzzellen präpariert und die MHCII-Expression von B220<sup>+</sup> Zellen im FACS analysiert. a) exemplarisches Histogramm einer FACS-Analyse der Gesamtmilzzellen aus Mäusen denen PBS (grün), TL (rot) oder IL4 (blau) appliziert wurde; b) Darstellung der Ergebnisse aus a) in einem Balkendiagramm (MFI = ‚mean fluorescence intensity‘). Insgesamt wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

$IL4R^{-/-}$  Mäusen wurde Toxoplasma-Lysat, rekombinantes IL4 bzw. PBS appliziert und nach 16 Stunden wurden die Milzen präpariert und die Gesamtmilzzellen im Durchflusszytometer unter Verwendung von anti-MCHII Antikörper analysiert (Abb. 2.2.8). Wie erwartet induzierte IL4 keine Expression von MHCII-Molekülen auf der Oberfläche von B-Zellen aus der Milz von  $IL4R^{-/-}$  Mäusen. Toxoplasma-Lysat hingegen zeigte trotz Verwendung von  $IL4R^{-/-}$  Mäusen eine erhöhte MHCII-Expression auf den B-Zellen. Die erhöhte MHCII-Expression auf B-Zellen durch Toxoplasma-Lysat war offensichtlich nicht die Folge IL4-ähnlicher Moleküle.

## 3 Diskussion

### 3.1 Eine anti-*T. gondii* Aktivität Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen mit der einzigartigen Fähigkeit eine primäre Immunantwort zu induzieren. Sie nehmen Antigene auf und transferieren diese von der Peripherie zu den Zellen des adaptiven Immunsystems. Für die Ausbildung eines immunologischen „Gedächtnisses“ (Banchereau und Steinman, 1998) erwiesen sie sich als unverzichtbar. Eine weitere Funktion, die bisher erst einmal für DC gezeigt worden ist, ist ihre Funktion als antimikrobielle Effektorzellen. Nach der Stimulation der DC mit  $\text{IFN}\gamma$  und einer anschließenden Infektion mit *T. gondii*, wurde eine Hemmung des Toxoplasma-Wachstums durch DC festgestellt (Aline *et al.*, 2002). Bei dem Effektormolekül handelt es sich um reaktive Sauerstoff-Intermediate.

In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass Mikroglia, die zu DC differenzieren können, das Toxoplasma-Wachstum in benachbarten Wirtszellen hemmten. Daraufhin ergab sich die Frage: Können auch isolierte DC das Toxoplasma-Wachstum hemmen? Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Doppelkammer-Kokultursystem verwendet (Abb. 2.1.1), bei dem sich die DC in der oberen Kammer befinden und die infizierten Wirtszellen in der Kammer darunter. Dadurch sind die DC von den infizierten Wirtszellen getrennt, aber lösliche Stoffe, die in der Lage sind eine Membran mit 0,4  $\mu\text{m}$  Porengröße zu passieren, können ausgetauscht werden. Als *in vitro* Modell für die chronische Infektion im Hirn der Maus wurden murine primäre Hirnzellkulturen als Wirtszellen verwendet. Die Hirnzellen wurden mit *T. gondii* infiziert und die DC im Transwell simultan hinzu gegeben. DC reduzierten das Toxoplasma-Wachstum, während DC-Vorläufer dazu nicht in der Lage waren. Demzufolge wird die antiparasitäre Aktivität in diesem System von  $\text{CD11c}^+$  Zellen vermittelt. Da die Hemmung durch die permeable Membran hindurch vermittelt wird, kann die Wirkung auf ein sezerniertes Molekül der DC zurückgeführt werden, denn die DC im Transwell stehen nicht in direkten Zell-Zell Kontakt mit den infizierten Wirtszellen.

Dendritische Zellen sind in allen lymphatischen Organen des Körpers zu finden. Üblicherweise werden DC für *in vitro* Analysen aus der Milz oder aus Knochenmarkskulturen isoliert. Aline *et al.* (2002) bezeichneten DC als mögliche Effektorzellen in der ersten Abwehr gegen die Pathogeninvasion. Da DC auch im Hirn, während der chronischen Phase der Infektion, gefunden wurden (Fischer *et al.*, 2000), könnten sie ebenfalls eine Rolle als Effektorzellen im Hirn spielen. Aus diesem Grund wurden für die Analyse der antiparasitären Aktivität DC sowohl aus dem Hirn chronisch infizierter Mäuse als auch aus der Milz bzw. aus Knochenmarkskulturen isoliert und analysiert. Bei Untersuchungen der Oberflächenmarker war zu erkennen, dass die verschiedenen DC-Präparationen nicht alle identisch waren. Knochenmark-DC zeigten, wie auch beschrieben (Lutz *et al.*, 1999), eine homogene myeloide Population (Abb. 2.1.3), mit 95% unreifen Zellen. Nach Stimulation mit LPS differenzierten diese DC zu einer weitestgehend reifen Population (Abb. 2.1.4). Milz-DC und Hirn-DC setzten sich aus zwei unterschiedlichen Populationen zusammen. Die Hauptpopulation hatte hauptsächlich myeloiden Charakter, der Rest der Zellen war vom lymphoiden Typ (Abb. 2.1.3). Diese beiden Populationen sind typisch für DC aus Hirn bzw. Milz (Fischer *et al.*, 2000; Leenen *et al.*, 1998). Die Untersuchung des Reifungszustandes von Milz-DC ergab für Milz-DC, wie auch in anderen Arbeiten beschrieben (Leenen *et al.*, 1998), eine gemischte Population von unreifen und reifen Zellen. DC aus dem Hirn chronisch infizierter Mäuse hingegen wiesen mehrheitlich einen reifen Phänotyp auf (Fischer *et al.*, 2000). Obwohl die DC aus den verschiedenen Organen phänotypisch nicht identisch waren, wurde für alle DC-Populationen eine vergleichbare Hemmung der Toxoplasma-Proliferation beobachtet (Abb. 2.1.2). Milz-DC vermittelten mit durchschnittlich 40%, eine etwas schlechtere Hemmung als Hirn-DC oder Knochenmark-DC, die das Toxoplasma-Wachstum um 60% hemmten. Da der Reifungszustand der DC ein Parameter war, der zwischen diesen DC am stärksten variierte, wurde überprüft inwieweit dies eine Rolle bei der antiparasitären Aktivität spielt. Dazu wurden unreife und reife Knochenmark-DC, auf ihre Fähigkeit das Parasitenwachstum zu hemmen, untersucht. Beide Populationen zeigten keinen Unterschied in der Hemmung der Toxoplasma-Proliferation (Abb. 2.1.4). Entweder besitzen unreife und reife DC gleichermaßen eine antiparasitäre Aktivität oder die unreifen DC reifen während des Tests und erlangen erst als vollständig gereifte DC die Fähigkeit antiparasitär zu wirken. Aus diesem Grund wurde der Reifungszustand

der unreifen Knochenmark-DC nach dem Proliferationstest untersucht. Es zeigte sich, dass die eingesetzten unreifen DC während des Tests nicht zu reifen DC differenzieren (Abb. 2.1.5). Demnach sezernieren sowohl unreife als auch reife DC aus dem Hirn, der Milz und der Knochenmarkskultur einen Faktor, der eine antiparasitäre Wirkung in *T. gondii*-infizierten Hirnzellen ausübt.

### **3.2 Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen, *T. gondii* und der infizierten Wirtszelle**

Bei einer antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen, stellt sich die Frage, wie diese Hemmung auf den Parasiten selbst wirkt. Wird der Parasit abgetötet oder wird die intrazelluläre Vermehrung gehemmt? Wird die Invasion oder die intrazelluläre Proliferation gehemmt? Worauf wirkt der sezernierte Faktor der DC? Wirkt der Faktor selber antiparasitär gegen *T. gondii*, oder wird die Hemmung über die Wirtszelle vermittelt, indem sie aktiviert wird?

#### **3.2.1 Wirkung der Aktivität Dendritischer Zellen auf *T. gondii***

Auf welche Weise hemmen DC das Wachstum von *T. gondii*? Bei simultaner Zugabe von DC und Toxoplasmen zum Test, kann nicht unterschieden werden, ob die Invasion oder die intrazelluläre Proliferation der Parasiten gehemmt ist. In Abb. 2.1.8 ist gezeigt, dass die intrazelluläre Proliferation der Parasiten durch DC gehemmt wird. Dazu wurde durch mikroskopische Auszählung die Anzahl der Vakuolen pro Zelle bei den Infektionsansätzen mit und ohne DC bestimmt, damit ergibt sich die Zahl der Infektionsereignisse pro Zelle. Es wurde gezeigt, dass bei gleicher Infektionsrate die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen gehemmt ist (Abb. 2.1.8). Dieser Befund wurde auch durch Pulsinfektionsexperimente bestätigt. Dabei wurden Wirtszellen infiziert und die Zugabe der DC erfolgte, nachdem alle Toxoplasmen intrazellulär waren. In diesen Experimenten war ebenfalls eine Hemmung der Toxoplasma-Proliferation durch DC zu beobachten. Folglich wird durch DC die intrazelluläre Proliferation und nicht die Invasion von *T. gondii* in die Wirtszellen gehemmt.

Durch dieses Experiment kann aber nicht geklärt werden, ob der Parasit getötet wird oder ob die Proliferation gehemmt ist. Es ist beschrieben, dass reaktive Sauerstoff-Intermediate *T. gondii* intrazellulär töten (Murray und Cohn, 1979). In Kapitel 2.1.4.2 wurde gezeigt, dass die intrazellulären Toxoplasmen gleich infektiös waren, unabhängig davon ob DC im Test zugegen waren oder nicht. Dieser Aspekt spricht für einen zytostatischen Effekt der DC auf *T. gondii*, da getötete Toxoplasmen nicht mehr infektiös sind (Murray und Cohn, 1979). Ein weiterer Befund, der für die Hemmung des Parasitenwachstums spricht, ist die Tatsache, dass der antiparasitäre Effekt transient ist (siehe Kapitel 2.1.4.3). Solange DC im Test kokultiviert wurden, war die Toxoplasma-Proliferation gehemmt. Die Hemmung der Toxoplasma-Proliferation wird bei Entnahme der DC aus dem Test aufgehoben, damit ist ein Abtöten der Parasiten durch DC unvereinbar. Es lässt sich zusammenfassen, dass DC eine toxoplasmastatische Aktivität vermitteln und nicht toxoplasmazidal wirken. Falls in Tachyzoiten durch den Einfluss der DC die Stadienkonversion zu Bradyzoiten induziert wird, könnte dies ein Mechanismus sein, der die Hemmung der Parasitenproliferation verursacht. In der Maus wird durch immunologischen Druck die Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten eingeleitet (Gross *et al.*, 1996). In Experimenten *in vitro* ist gezeigt, dass IFN $\gamma$ -aktivierte, Tachyzoiten-infizierte Makrophagen das Toxoplasma-Wachstum hemmen. Diese Hemmung wird durch die Konvertierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten verursacht (Bohne *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Daten ist es denkbar, dass sich die schnell proliferierenden Tachyzoiten in Gegenwart der DC zu den langsam proliferierenden Bradyzoiten umwandeln. In allen Experimenten dieser Arbeit wurden ein *T. gondii* Isolat der Stammgruppe II, das in beiden Stadien vorliegen kann, verwendet. Beide Stadien zeichnen sich durch die Expression spezifischer Moleküle aus. BAG1 (Bohne *et al.*, 1995) wird nur in Bradyzoiten exprimiert wohingegen SAG1 (Kasper *et al.*, 1985) ausschließlich in Tachyzoiten exprimiert wird. Mittels RT-PCR Analyse der intrazellulären Parasiten wurden, 48 Stunden nach Kokultivierung mit und ohne DC, bei Toxoplasmen nur SAG1 Transkripte (Abb. 2.1.11) nachgewiesen. BAG1-Transkripte waren nicht detektierbar. Da beschrieben ist, dass Bradyzoiten-spezifische Marker bereits 24 Stunden nach der Infektion mit Tachyzoiten in Zellkultur detektiert werden (Gross *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1996) sollte demzufolge eine DC-induzierte Stadienkonversion des Parasiten nach 48 Stunden Kokultivierung nachweisbar sein. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Hemmung der

Toxoplasma-Proliferation nicht auf die Konvertierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten zurückzuführen ist.

### 3.2.2 Beteiligung der Wirtszelle am antiparasitären Effekt

Nachdem prinzipiell die toxoplasmastatische Aktivität von DC gezeigt wurde, wurde untersucht inwieweit die Wirtszelle an diesem Effekt beteiligt ist. Falls die Wirtszelle nicht an diesem Effekt beteiligt ist, sollte die Hemmung der Toxoplasmen in allen Wirtszellen zu beobachten sein. Dazu erfolgte eine Untersuchung verschiedener Wirtszelltypen aus unterschiedlichen Spezies, wie Hirnzellen und Fibroblasten aus der Maus, der Ratte und dem Menschen. DC hemmten die Toxoplasma-Proliferation in den getesteten murinen Hirnzellen und Fibroblasten, und in den Hirnzellen der Ratte (Abb. 2.1.6). Bei Verwendung von humanen Fibroblasten hingegen, wurde keine verminderte Parasitenproliferation bei DC-Kokultivierung beobachtet. Um den Einfluss der Wirtsspezies zu klären, wurde eine weitere humane Hirnzelllinie verwendet. Diese Glioblastomzelllinie zeigte im Gegensatz zu humanen Fibroblasten eine Hemmung der Toxoplasmen-Proliferation um ca. 30%. Die Hemmung fiel aber dennoch signifikant geringer aus, als in den getesteten Wirtszellen aus Maus oder Ratte, bei denen die Hemmung über 60% betrug. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Wirtszelle an der Hemmung der *T. gondii* Proliferation beteiligt ist. Das Fehlen eines antiparasitären Effekts bei humanen Fibroblasten legt nahe, dass ein sezerniertes Effektormolekül wahrscheinlich nicht passiv in die Wirtszelle diffundiert und dort direkt den Parasiten hemmt. Es ist prinzipiell nicht auszuschließen, dass die Hemmung über mehr als einen Mechanismus vermittelt wird, wie es für aktivierte murine Mikroglia beschrieben ist (Freund *et al.*, 2001). Aktivierte murine Mikroglia inhibieren das Toxoplasma-Wachstum über einen NO-abhängigen und einen unbekanntem NO-unabhängigen Abwehrmechanismus. Eine weitere Erklärung wäre auch, dass der sezernierte Faktor mit unterschiedlicher Affinität mit den verschiedenen Zellen interagiert. In solch einem Fall läge eine schlechtere Affinität des sezernierten Faktors zu humanen Hirnzellen vor und gar keine Bindungsmöglichkeit an humanen Fibroblasten.

Es sind mehrere Möglichkeiten der Wirtszellbeteiligung vorstellbar. Eine Möglichkeit ist, dass DC in der Wirtszell Apoptose induzieren, um die Vermehrung von *T. gondii*

zu unterbinden. Die Fähigkeit von Wirtszellen Apoptose einzuleiten, um die Vermehrung von Bakterien und die Übertragung auf uninfizierte Zellen zu verhindern, ist bereits für die Infektion mit *Mycobacterium avium* beschrieben (Fratazzi *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit diese Möglichkeit einer antiparasitären Funktion untersucht. Die Einleitung der Apoptose ist durch das Fragmentieren von genomischer DNA der Zelle charakterisiert. Die DNA-Fragmentierung kann durch den Nachweis der Strangbrüche mittels TUNEL-Reaktion gezeigt werden. In Abb. 2.1.7 wurde gezeigt, dass infizierte Wirtszellen in Gegenwart von DC keine verstärkte Apoptose induzieren. Diese Daten stehen im Einklang mit Ergebnissen in denen beschrieben ist, dass *T. gondii* die Apoptose der Wirtszellen aktiv unterdrückt (Hisaeda *et al.*, 1997; Orlofsky *et al.*, 1999). Die anti-apoptotische Aktivität von *T. gondii* geht einher mit der verminderten Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom c und dem verminderten Herunterregulieren der Kaspase Aktivität. Die Konzentration der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) wird dabei intrazellulär deutlich herabgesetzt (Goebel *et al.*, 2001). Zum Prüfen einer möglichen Apoptoseinduktion durch DC wurden auch Toxoplasmen-Proliferationstests mit primären Hirnzellkulturen aus PARP<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). DC riefen in diesen PARP<sup>-/-</sup> Wirtszellen wie in Wildtyp-Wirtszellen eine vergleichbare Hemmung der Toxoplasmen-Proliferation hervor. Falls Apoptose der Wirtszelle einen Einfluss auf die Toxoplasmenhemmung hat, dann sollte in PARP<sup>-/-</sup> Wirtszellen eine reduzierte Hemmung von *T. gondii* zu beobachten sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirtszelle an der toxoplasmastatischen Aktivität der DC beteiligt ist, aber die Apoptose von Wirtszellen ist für die Hemmung der *T. gondii* Proliferation nicht von Bedeutung.

### **3.3 Charakteristika der anti-*T. gondii* Aktivität Dendritischer Zellen**

Eine weitergehende biochemische Charakterisierung der antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen gibt eventuell Aufschluss über die Identität des Effektormechanismus. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass der sezernierte DC-Faktor sowohl als Effektormolekül als auch als Signalmolekül fungieren kann. Als Effektormolekül wirkt er direkt auf den Parasiten, oder er wird über die Wirtszelle bis zum Parasiten weitergeleitet. Als Signalmolekül aktiviert oder

stimuliert er die Wirtszelle und initiiert in dieser einen Effektormechanismus, der für sich gesehen prinzipiell DC-unabhängig ist.

### 3.3.1 Wirkung als Effektormolekül

Bei der Suche nach einem Effektormolekül wurden zuerst bekannte antiparasitäre Mechanismen analysiert, die bei der Hemmung von *T. gondii* eine Rolle spielen. Das sind zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI). Im Überstand des *T. gondii* Proliferationsansatzes wurden weder NO noch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Grund der gegen NO bzw. ROI als Effektormoleküle spricht, ist der Befund, dass der lösliche Überstand von DC, auch nach längerer Lagerung bei 4°C oder -20°C, seine antiparasitäre Aktivität noch enthielt. Stickstoffmonoxid, O<sub>2</sub><sup>-</sup> oder OH<sup>-</sup> sind jedoch alles instabile Moleküle, die in Lösung sehr schnell abreagieren (Gallin *et al.*, 1992; Ignarro *et al.*, 1993; Stryer, 1994). Wasserstoffperoxid hingegen ist ein deutlich stabileres Molekül (Gallin *et al.*, 1992), war aber im Überstand der DC nicht nachweisbar. Die Nachweisgrenze betrug in diesem Fall ca. 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im FCS-freien Hirnzell-Medium. Es ist beschrieben, dass Toxoplasmen, die für eine Stunde mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden, danach normal in residenten Makrophagen proliferieren (Murray und Cohn, 1979). Diese Resistenz wird auf endogene Catalase des Parasiten, ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spaltendes Enzym, zurückgeführt. Übereinstimmend damit, war die Hemmung von *T. gondii* durch Zugabe von Catalase ins Medium nicht wieder aufhebbar. Wasserstoffperoxid wirkt außerdem wirtszellunabhängig, während bei der beschriebenen toxoplasmastatischen Aktivität die Wirtszellbeteiligung bereits nachgewiesen wurde (3.2.2). Wasserstoffperoxid spielt als Effektormolekül folglich keine Rolle bei der DC-induzierten Parasitenhemmung.

Bei näherer Untersuchung des DC-Überstandes stellte sich heraus, dass die antiparasitäre Aktivität durch sezernierte Moleküle vermittelt wird, die kleiner als fünf kDa und hitzestabil sind. Sie sind Proteinase K- und Pronase E-resistent und lassen sich durch Phenol/Chloroform-Extraktion nicht entfernen. Demzufolge wird die antiparasitäre Aktivität nicht von einem Protein vermittelt. Mit dieser Charakterisierung des Moleküls lassen sich auch antimikrobielle Peptide, wie z.B. β-Defensine (Yang *et al.*, 1999) ausschließen. Defensine sind drei bis vier kDa große

Peptide, die sechs Disulfid-gepaarte Cysteine enthalten und die biologische Membranen zerstören können (Ganz und Lehrer, 1994). Trotz ihrer geringen Größe, sollten diese durch Proteinase K/Pronase E-Behandlung bzw. Phenol/Chloroform-Extraktion zerstört bzw. entfernt worden sein. Proteinase K und Pronase E spalten Proteine an jeder Peptidbindung (Maniatis *et al.*, 1982), so dass wahrscheinlich auch drei bis vier kDa große Peptide zerstört werden. Um Defensine als Effektormoleküle definitiv auszuschließen, muss in zukünftigen Untersuchungen mit Peptiden verschiedener Primärsequenz die Entfernung aus dem DC-Überstand kontrolliert werden.

### 3.3.2 Wirkung als Signalmolekül

Ein alternatives Modell für den Wirkmechanismus der sezernierten antiparasitären Aktivität von DC ist das Freisetzen eines Signalmoleküls durch DC. Ein solches Signalmolekül kann die Wirtszellen aktivieren, die ihrerseits einen Abwehrmechanismus induzieren. Das wichtigste Signalmolekül bei der Immunabwehr von *T. gondii* ist  $\text{IFN}\gamma$ . Alle bisher bekannten Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* sind  $\text{IFN}\gamma$ -abhängig (Suzuki, 2002).  $\text{IFN}\gamma$  war in dem vorliegenden Doppelkammer-Kokultursystem weder als Transkript noch als sezerniertes Protein nachweisbar. Folglich muss es sich im vorliegenden System um ein anderes Signalmolekül handeln. Da der Faktor sezerniert wird, kleiner als fünf kDa, hitzestabil sowie proteaseresistent ist, können Zytokine als Signalmoleküle ausgeschlossen werden. Ein Kandidat für solch ein Signalmolekül der DC wären Lipopeptide. Lipopeptide sind als Signalmoleküle unter anderem bei Mycoplasmen gefunden worden (Mühlradt *et al.*, 1997). Lipopeptide aktivieren in Makrophagen antimikrobielle Effektormechanismen, wie die Produktion von TNF, IL1, IL6, Prostaglandine (Mühlradt *et al.*, 1991; Mühlradt und Schade, 1991) und im Fall von  $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Makrophagen, auch NO (Mühlradt und Frisch, 1994; Ruschmeyer *et al.*, 1993). Durch Methylamin werden Esterbindungen zwischen Aminosäure und Lipid gespalten und somit die Funktionalität von Lipopeptiden zerstört (Stryer, 1994). Analysen mit Methylamin gaben keinen Aufschluss über die Beteiligung von Lipopeptiden an der DC-vermittelten Hemmung der Toxoplasma-Proliferation, da Methylamin als hochtoxische Komponente nicht aus dem zu testenden Überstand

entfernt werden konnte. Falls die toxoplasmastatische Aktivität von DC durch ein Signalmolekül vermittelt wird, dann gehört dieses Molekül nicht zur Klasse der Proteine, ist kleiner als fünf kDa und hitzestabil, Eigenschaften, die z.B. auf Lipopeptide zutreffen.

Eine Erfolg versprechende Möglichkeit, ein putatives Signalmolekül zu charakterisieren, ist die HPLC-Analyse. Da im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Charakterisierung mit Hilfe der HPLC nicht mehr möglich war, wurde die Beteiligung von bekannten Abwehrmechanismen auf der Seite der Wirtszelle untersucht.

### 3.3.3 Ausschluss bekannter anti-*T. gondii* Effektormechanismen

Es gibt fünf bekannte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*. Dabei handelt es sich um die Produktion von NO durch die iNOS, die Verknappung von Tryptophan durch die IDO, der Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten, die limitierte Verfügbarkeit von intrazellulärem Eisen für den Parasiten und einen undefinierten Mechanismus, der durch IFN $\gamma$ -induzierte GTPase (IGTP), vermittelt wird (Suzuki, 2002). Alle diese Effektormechanismen werden durch IFN $\gamma$  induziert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein anderes Signalmolekül als IFN $\gamma$  einen dieser Abwehrmechanismen ebenfalls induzieren kann. Aus diesem Grund wurde auf der Seite der Wirtszelle nach diesen Effektormechanismen gesucht. Es ist beschrieben, dass durch IFN $\gamma$  die Expression der iNOS induziert und damit NO in den Überstand sezerniert wird (Ding *et al.*, 1988). iNOS mRNA war in infizierten Hirnzellen im Vergleich zu uninfizierten Hirnzellen verstärkt exprimiert. Die Gegenwart von DC induzierte keine weitere Erhöhung der iNOS mRNA-Expression. Stickstoffmonoxid wurde im Proliferationstestansatz ebenfalls nicht nachgewiesen. Durch Zugabe von N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginin (NMMA), welches die Generierung von NO blockiert, wurde die Hemmung der Toxoplasma-Proliferation nicht aufgehoben (Abb. 2.1.12). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch iNOS produziertes NO nicht als Effektormolekül im vorliegenden Testsystem in Frage kommt.

Die Hemmung von intrazellulären Toxoplasmen durch ROI wurde bisher nur in humanen Monozyten und Makrophagen beobachtet (Murray *et al.*, 1985; Wilson und Remington, 1979). Im Mausmodell bleibt die Relevanz von ROI unklar, denn es ist beschrieben, dass *T. gondii* resistent gegen oxidativen Stress ist, der von murinen

Makrophagen produziert wurde (Chang und Pechère, 1989). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass *p47phox*-defiziente Mäuse, bei denen oxidativer Stress nicht induziert wird, trotzdem in der Lage sind, sowohl die akute als auch die chronische Phase einer *T. gondii* Infektion zu kontrollieren (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). IFN $\gamma$ -aktivierte murine Astrozyten aus *p47phox*-defizienten Mäusen hemmen das Toxoplasma-Wachstum, so dass Halonen und Weiss (2000) ebenfalls ROI als Effektormoleküle ausschlossen. Auch in dieser Arbeit ließen sich keine reaktiven Sauerstoff-Intermediate (ROI) als mögliche Effektoren nachweisen. Eine Aufhebung der Hemmung des Parasitenwachstums wurde durch Zugabe von Sauerstoffradikal-Fängern nicht erreicht. Zusammenfassend gibt es keine Hinweise auf eine DC-induzierte Hemmung der *T. gondii*-Proliferation durch ROI.

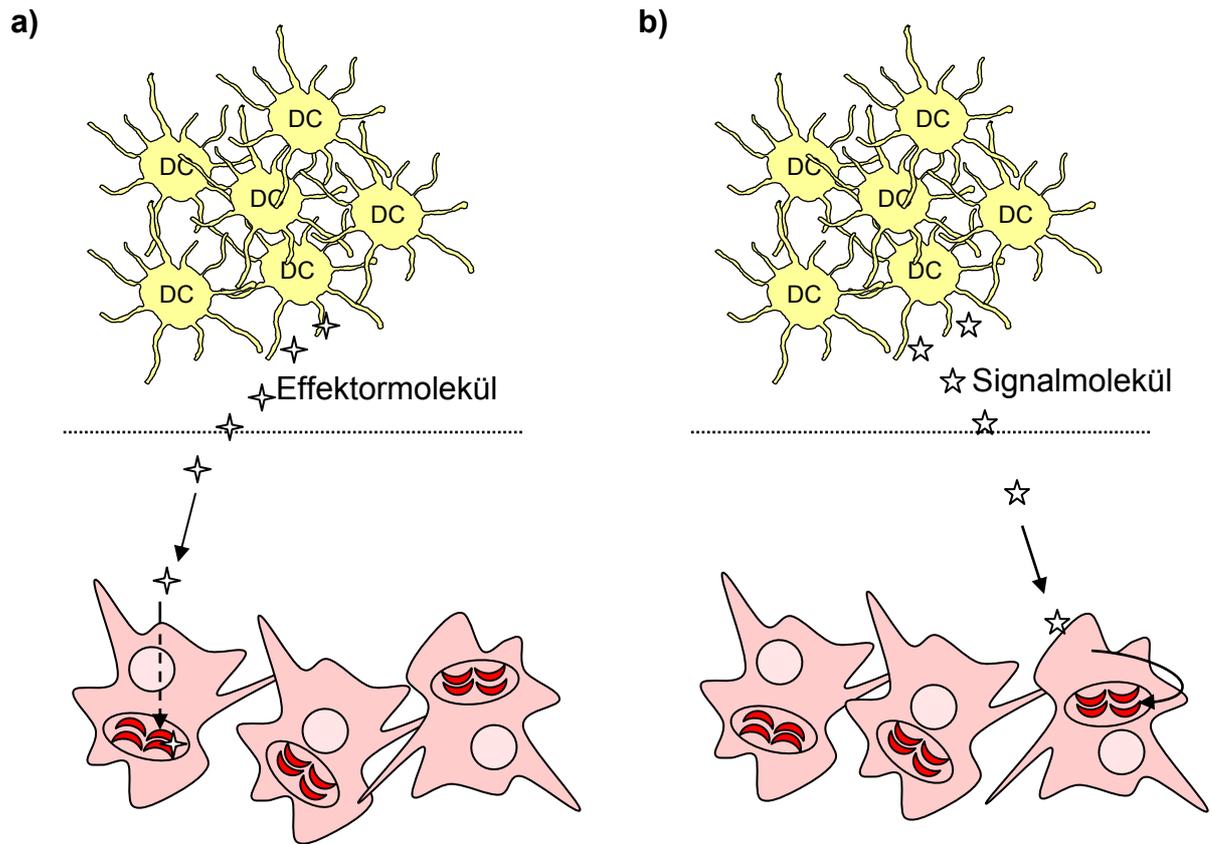
Eine verminderte Proliferation von *T. gondii* durch DC aufgrund von Tryptophanverknappung ist ebenfalls unwahrscheinlich, denn die Zugabe von Tryptophan zum Proliferationsansatz führte nicht zur Aufhebung der Wachstumshemmung (Abb. 2.1.13). Dieser Effektormechanismus wurde bisher ausschließlich in humanen Zellen beobachtet und die Relevanz der Tryptophanverknappung durch IDO ist im Mausmodell noch unklar (Suzuki, 2002). Weder in murinen Fibroblasten noch in murinen Astrozyten wurde bislang eine IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Expression als toxoplasmastatische Aktivität nachgewiesen (Halonen *et al.*, 2001; Turco und Winkler, 1986).

Die limitierte Verfügbarkeit von intrazellulärem Eisen für den Parasiten wurde bisher nur in aktivierten Ratten-Enterozyten beschrieben (Dimier und Bout, 1998). Nach Voraktivierung von Ratten-Enterozyten mit IFN $\gamma$  wurde eine Hemmung der intrazellulären Replikation von *T. gondii* beobachtet. Die Zugabe von Eisensalzen resultiert in der Aufhebung der Hemmung und der Einsatz von Eisen-Chelatoren induziert die Hemmung der Parasiteneplikation ohne vorherige Stimulation der Wirtszellen. In anderen Zellen wurde dieser Mechanismus noch nicht gezeigt. Experimente mit infizierten murinen Astrozyten, die mit Eisen-Chelatoren versetzt wurden, zeigen keine Hemmung des Toxoplasma-Wachstums (Halonen und Weiss, 2000). Eisenmangel in murinen Astrozyten führt demnach nicht zur Toxoplasmastase. Bei IFN $\gamma$ -aktivierten murinen Astrozyten, die das Toxoplasma-Wachstum hemmen, ließ sich durch Eisenzugabe die Toxoplasmastase nicht aufheben (Halonen und Weiss, 2000). Die Hemmung von *T. gondii* in murinen Astrozyten scheint somit nicht durch Eisenmangel vermittelt zu sein.

An dem fünften bekannten Abwehrmechanismus ist die IFN $\gamma$ -induzierte GTPase (IGTP) beteiligt. Kürzlich wurde bei *IGTP*-defizienten Mäusen ein Defekt in der Abwehr gegen die akute Infektion mit *T. gondii* gefunden, wobei die Entwicklung der Immunzellen normal war (Taylor *et al.*, 2000). *In vitro* Analysen mit IFN $\gamma$ -aktivierten murinen Astrozyten demonstrierten die Relevanz des IGTP für die Abwehr von *T. gondii*. Wildtyp-Astrozyten hemmen die Toxoplasma-Proliferation, während Astrozyten aus *IGTP*-defizienten Mäusen keine Hemmung zeigen (Halonen *et al.*, 2001). Nach diesen Befunden erscheint es denkbar, dass ein Signalmolekül der DC die infizierten Hirnzellen stimuliert, in denen wiederum die Expression von IGTP angeregt wird. Die Analyse von infizierten Astrozyten und infizierten Astrozyten in DC-Kokultur mittels semiquantitativer RT-PCR ergab jedoch, dass die gefundene IGTP mRNA-Menge in allen Proben vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). Diese Analysen geben keinen Hinweis auf eine Regulation der Infektion durch IGTP. Für eine abschließende Aussage über die Beteiligung von IGTP am antiparasitären Effekt durch DC wären vergleichende Western Blot-Analysen notwendig, die die Expression des Proteins untersuchen. Erst durch Analysen mit Hirnzellkulturen aus *IGTP*-defizienten Mäusen kann ein IGTP-vermittelter Effekt endgültig ausgeschlossen werden.

### 3.3.4 Modell des antiparasitären Effektormechanismus

Es wurde gezeigt, dass DC einen toxoplasmastatischen Effekt ohne direkten Zell-Zell Kontakt mit der infizierten Wirtszelle induzieren. Die antiparasitäre Aktivität ist wirtszellabhängig und transient. Die Faktoren, die diesen Effekt vermitteln, werden konstitutiv von DC sezerniert und sind auch im Überstand von DC zu finden. Die Moleküle sind hitzestabil, kleiner als fünf kDa und keine Polypeptide. Durch die antiparasitäre Aktivität wird *T. gondii* in seiner intrazellulären Proliferation gehemmt, wobei in Tachyzoiten keine Stadienkonversion erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht endgültig geklärt, ob es sich bei den sezernierten Faktoren um Effektormoleküle oder Signalmoleküle handelt. In der folgenden Abbildung 3.1 sind zwei Modelle skizziert, die verdeutlichen, wie ein putatives Effektormolekül bzw. Signalmolekül wirken könnte.



**Abb. 3.1:** Modelle der antiparasitären Aktivität Dendritischer Zellen. DC sind getrennt durch eine permeable Membran (0,4  $\mu\text{m}$ ) von den infizierten Wirtszellen. a) Effektormoleküle wirken über die Wirtszelle auf den Parasiten. b) Signalmoleküle wirken auf die Wirtszelle, die dann ihrerseits einen Abwehrmechanismus initiiert.

Unter der Annahme (Kapitel 2.1.3.1), dass die antiparasitäre Aktivität Wirtszell-abhängig ist, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. 1) Bei der antiparasitären Aktivität handelt es sich um ein zelltypspezifisches Effektormolekül, das aktiv von der Wirtszelle zum Parasiten weitergeleitet wird oder 2) Ein zelltypspezifisches Signalmolekül aktiviert die Wirtszelle, die ihrerseits einen DC-unabhängigen Abwehrmechanismus initiiert. Für die erste Möglichkeit gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise, während Abwehrmechanismen, die durch Signalmoleküle eingeleitet werden, beschrieben sind (Mühlradt *et al.*, 1997; Suzuki, 2002).

Die Hemmung ist, wie gezeigt (Abb. 2.1.10), nur bei ständiger Gegenwart der DC messbar d.h. transient und reversibel, so dass nicht klar unterschieden werden kann, inwieweit DC schon allein auf Wirtszelle oder Parasit hemmende Effekte ausüben. Für eine endgültige Aufklärung des Hemmmechanismus müsste das sezernierte

Molekül isoliert werden. Eine viel versprechende Methode dafür wäre die Analyse des DC-Überstandes mittels HPLC, denn mit dieser Methode ist auch die Charakterisierung von kleinen Molekülen wie z.B. Peptiden, Kohlenhydraten und Lipiden möglich. Um den Effektormechanismus endgültig aufzuklären, müssen weitere Analysen auf der Seite der Wirtszelle durchgeführt werden. Dazu eignen sich vergleichende Microarray-Analysen um das Transkriptom zu untersuchen, sowie 2D-Gelanalysen für die Analyse des Proteoms.

In dieser Arbeit wurde eine neue antiparasitäre Aktivität beschrieben, die durch DC induziert wird. Die DC-Aktivität könnte für die Infektion der Maus durch die Hemmung von *T. gondii* in der akuten Phase sowie in der chronischen Phase eine wichtige Rolle spielen. Während der akuten Phase interagieren DC in der Peripherie mit den Parasiten (Sousa *et al.*, 1997), in der chronischen Phase sind sowohl aktivierte DC als auch Parasiten im entzündeten Hirn nachweisbar (Fischer *et al.*, 2000).

### **3.4 Eine IL4-artige Aktivität von *T. gondii***

#### **3.4.1 ‚Molecular mimicry‘ von Wirtsproteinen**

Der Parasit muss einerseits die Immunabwehr überwinden, um seinen Lebensraum zu besiedeln, andererseits darf der Wirt durch unbeschränktes Parasitenwachstum nicht so stark geschädigt werden, dass er den Erreger nicht mehr weiter verbreiten kann. Die Nachahmung von regulatorischen Wirtsproteinen durch den Parasiten, ermöglicht es dem Parasiten das Immunsystem des Wirts zu beeinflussen. Zwei derartige Fälle wurden bisher beschrieben: 1) Ein Nematode (*Trichuris muris*) besitzt ein Molekül, das dem IFN $\gamma$  der Maus ähnelt. Dieses Protein weist IFN $\gamma$ -kreuzreaktive Epitope auf. Außerdem bindet das Molekül an den Wirts-IFN $\gamma$  Rezeptor und IFN $\gamma$ -reaktive Zellen zeigen die gleiche Reaktion mit dem Parasiten wie mit Wirts-IFN $\gamma$  (Grencis und Entwistle, 1997). 2) *T. gondii* ahmt ein Molekül nach, das an den Chemokinrezeptor 5 (CCR5) bindet und damit DC aktiviert. Die DC produzieren daraufhin IL12 und induzieren auf diese Weise verschiedene Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*. Die Autoren interpretieren diesen Befund so, dass der Parasit damit seine eigene Proliferation durch das Einsetzen der Immunabwehr des Wirts reduziert, um den Wirt nicht vorzeitig zu töten (Aliberti *et al.*, 2003).

Zufällige Befunde in unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Reaktivität von Toxoplasma-Lysat mit monoklonalen anti-IL4-Antikörpern. Nachdem dieser Befund bestätigt wurde (Abb. 2.2.2), erfolgten weitere Experimente, um IL4-homologe Proteine aus *T. gondii* zu isolieren. Eine immunoaffinitätschromatographische Aufreinigung von Toxoplasma-Lysat war teilweise erfolgreich. Die Anreicherung der anti-IL4-Reaktivität wurde im ELISA nachgewiesen (Abb. 2.2.3). Im Immunoblot hingegen ließ sich das aufgereinigte Molekül allerdings nicht mehr detektieren. Es ist denkbar, dass die Epitope, die in der Immunoblot-Analyse von den anti-IL4 Antikörpern nicht mehr erkannt wurden, durch die harschen Elutionsbedingungen zerstört wurden. Bei der Auftrennung von Gesamtlisat in der 2D-Gelelektrophorese wurden drei anti-IL4-reaktive Proteinspots identifiziert. Von Zweien wurden mittels Massenspektrometrie Peptidmassen von tryptischen Peptiden bestimmt. Die ermittelten Peptidsequenzen führten zu zwei verschiedenen Proteinen. Bei dem einen Protein handelte es sich um das ‚dnaK like molecular chaperon‘, ein Protein, das strukturell den ‚heat shock‘ Proteinen verwandt ist. Das andere Protein war das ‚matrix antigen‘ 1 (MAG1), dessen Expression in enzystierten Bradyzoiten beschrieben wurde (Parmley *et al.*, 1994). Die aus den Proteinspots gewonnen Peptidsequenzen sind 100% identisch zu den deduzierten Proteinsequenzen der beiden Proteine. Mit Hilfe von Datenbankanalysen wurden keine Sequenzhomologien der beiden Proteine zum murinen IL4 gefunden. Eine mögliche Bindung an den IL4-Rezeptor ist dadurch allerdings nicht ausgeschlossen. Um solch eine Bindung nachzuweisen, wurden Analysen *in vitro* durchgeführt. Mastzellen werden durch IL4 zur Proliferation angeregt (Schmitt *et al.*, 1987). Durch Stimulation von diesen IL4-reaktiven Zellen mit Lysat von Toxoplasmen ließ sich keine funktionelle Aktivität der Zellen und somit keine Bindung von Parasitenproteinen an den murinen IL4-Rezeptor nachweisen (Abb. 2.2.5). Weder bei der Verwendung von Gesamtlisat noch bei der Verwendung von affinitätschromatographisch aufgereinigten Toxoplasma-Lysat-Fractionen war eine funktionelle Aktivität messbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Reaktivität von Toxoplasma-Lysat mit anti-IL4-Antikörpern im ELISA nachgewiesen wurde. Diese anti-IL4-Reaktivität wurde durch Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Identifikation zweier IL4-kreuzreaktiver Proteine mittels Massenspektrometrie ergaben keine Hinweise zu einem IL4-homologen Protein. *In vitro* Analysen mit IL4-Indikatorzellen zeigten keine

Reaktion mit dem Toxoplasma-Lysat oder der aufgereinigten Fraktion, so dass kein Hinweis auf die funktionelle Aktivität des Moleküls *in vitro* gefunden wurde.

### **3.4.2 *T. gondii* induziert die Expression von MHCII-Molekülen auf B-Zellen**

Die Relevanz eines IL4-homologen Moleküls aus Toxoplasma-Lysat wurde in der Maus getestet. Es ist bekannt, dass B-Zellen der Milz durch IL4-Stimulation verstärkt MHCII-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Noelle *et al.*, 1984). Durch intravenöse Injektion von IL4 lässt sich die erhöhte MHCII-Expression auf den B-Zellen der Milz induzieren. Durch Komplexieren des injizierten IL4 mit einem anti-IL4-Antikörper wird die MHCII-Expression auf den B-Zellen noch weiter verstärkt (Finkelman *et al.*, 1993). Die Injektion von Toxoplasma-Lysat führte auf B-Zellen der Milz zur Verdopplung der MHCII-Expression, wohingegen nach IL4-Gabe die Expression dreifach erhöht war. Die Induktion der MHCII-Expression auf B-Zellen erreichte somit durch Toxoplasma-Lysat nicht das Niveau wie mit murinem IL4. Diese Experimente wurden mit IL4 ‚knock out‘ (IL4<sup>-/-</sup>) Mäusen durchgeführt, um auszuschließen, dass endogenes IL4 die Ursache für die Erhöhung der MHCII-Expression war (Abb. 2.2.6). Die Komplexierung von Toxoplasma-Lysat mit einem anti-IL4 Antikörper ergab keine Verstärkung der MHCII-Expression auf B-Zellen. In parallel durchgeführten Analysen zeigte Wirtszelllysat keine Stimulation der MHCII-Expression auf B-Zellen, was darauf hindeutet, dass die Reaktion spezifisch durch *T. gondii* Lysat induziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Toxoplasma-Lysat, wie murines IL4, eine Erhöhung der MHCII-Expression auf B-Zellen induziert. Die Komplexierung von Toxoplasma-Lysat mit einem anti-IL4 Antikörper führte nicht zur Verstärkung der MHCII-Expression. Die Befunde lassen sich einerseits dahingehend interpretieren, dass es kein IL4-ähnliches Protein von *T. gondii* gibt, das funktionell dem murinen IL4 entspricht. Andererseits ist das IL4-homologe Protein von *T. gondii* vielleicht strukturell stark unterschiedlich zu murinem IL4 und deshalb zeigt auch die Komplexierung mit dem anti-IL4 Antikörper keine Wirkung.

### 3.4.3 Das IL4-ähnliche *T. gondii* Protein vermittelt keine IL4-Funktion

Kann die erhöhte MHCII-Expression auf den B-Zellen der Milz nur durch IL4 hervorgerufen werden? 1987 beschrieben Conrad *et al.* dass durch IL4 eine starke Expression von MHCII auf den B-Zellen der Milz induziert wird. Dieser Effekt wird durch IFN $\gamma$  gehemmt, während die alleinige Zugabe von IFN $\gamma$  ebenfalls die MHCII-Expression auf B-Zellen erhöht (Conrad *et al.*, 1987). Der Anstieg der MHCII-Expression fällt aber dabei deutlich geringer aus als nach Stimulation mit IL4. Bei der Injektion von Toxoplasma-Lysat in IL4<sup>-/-</sup>-Mäuse war eine Verdopplung der MHCII-Expression auf B-Zellen zu beobachten. Um auszuschließen, dass dieser Effekt nicht durch endogenes IFN $\gamma$  induziert war, wurde wie von Waldschmidt *et al.* (1989) beschrieben, die CD23-Expression auf B-Zellen als zweite Messstrecke untersucht. Die Zugabe von IL4 erhöht die CD23-Expression auf B-Zellen der Milz, wohingegen durch IFN $\gamma$  die CD23-Expression auf B-Zellen reduziert wird (Conrad *et al.*, 1987). Die Analyse der CD23-Expression auf B-Zellen nach Injektion von Toxoplasma-Lysat ergab eine deutliche Reduktion der CD23-Expression (Abb. 2.2.7a). Dieser Befund lieferte ein starkes Indiz gegen eine funktionelle Aktivität eines IL4-ähnlichen Proteins aus *T. gondii*. Dieses Ergebnis wurde durch Verwendung von IL4-Rezeptor ‚knock out‘ (IL4R<sup>-/-</sup>) Mäusen weiter geprüft. Bei diesen Mäusen fehlt ein Gen, dessen Produkt für einen funktionellen IL4-Rezeptor notwendig ist (Noben-Trauth *et al.*, 1997). Experimente mit IL4R<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass die Verabreichung von Toxoplasma-Lysat wie bei IL4<sup>-/-</sup> -Mäusen zur Erhöhung der MHCII-Expression auf B-Zellen der Milz führte (Abb. 2.2.8). Folglich ist gezeigt, dass die Erhöhung der MHCII-Expression auf den B-Zellen nicht über den IL4-Rezeptor vermittelt sein kann. Es lässt eher darauf schließen, dass durch Toxoplasma-Lysat die Produktion von IFN $\gamma$  induziert wurde, und dieses Zytokin die MHCII-Erhöhung auf B-Zellen stimuliert. Diese Vermutung wird durch zwei Aspekte bestätigt, 1) Toxoplasma-Lysat erniedrigt, wie IFN $\gamma$  und im Gegensatz zu IL4, die CD23-Expression auf den B-Zellen der Milz (Conrad *et al.*, 1987) und 2) Es ist beschrieben, dass Toxoplasma-Lysat in der Maus IL12 induziert, das nachfolgend eine Produktion von IFN $\gamma$  initiiert (Sousa *et al.*, 1997).

In Toxoplasma-Lysat ist eine Kreuzreaktivität mit anti-IL4 Antikörpern nachweisbar, was auf ein Protein mit IL4-ähnlichen Epitopen schließen lässt. Jedoch zeigt das IL4-

ähnliche Protein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keinerlei funktionelle Bioaktivität. Demzufolge kann nur von einem kreuzreaktiven Protein gesprochen werden, dass wahrscheinlich nicht spezifisch von anti-IL4 Antikörpern gebunden wird.

## 4 Material

### 4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad *Pro analysis*. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Wasser aus der Millipore Wasseranlage (Elix 3) verwendet, hier nachfolgend als *Aqua dest.* bezeichnet.

### 4.2 Proteine

#### 4.2.1 Antikörper

HL3-biotin / -FITC (anti-CD11c)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
N418-biotin (anti-CD11c)	Biozol, Eching
53-6.7-FITC (anti-CD8 $\alpha$ )	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
M1/70-FITC (anti-CD11b)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
3/23-FITC / -PE (anti-CD40)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
16-10A1-FITC / -PE (anti-CD80)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
GL1-FITC / -PE (anti-CD86)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
Michel17-FITC (anti-CD83)	Biocarta , Hamburg
B3B4-FITC (anti-CD23)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
M5/114.15.2-PE (anti- I <sup>A</sup> /I <sup>E</sup> )	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
RA3-6B2-FITC (anti-B220)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
hamster-IgG <sub>1</sub> -biotin / -FITC	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
rat-IgG <sub>2a</sub> -PE / -FITC	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
rat-IgG <sub>2b</sub> -FITC / -PE	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-APC	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-HRP	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
1D11 (anti-IL4)	Serotec, Düsseldorf
11B11 (anti-IL4)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
11B11-biotin (anti-IL4)	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

anti-IFN $\gamma$ -unmarkiert / -biotinyliert	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
anti- <i>T. gondii</i>	Innogenetics

### 4.2.2 Zytokine

GM-CSF	Präparation aus P3X63/O-GM-CSF Hybridomzellen
r-Interferon $\gamma$	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
r-Interleukin 12	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Interleukin 3	Präparation aus P3X63/O-IL3 Hybridomzellen
r-Interleukin 4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
r-TNF $\alpha$	Genzyme, Cambridge, USA

### 4.2.3 Enzyme

Collagenase / Dispase	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma, St. Louis, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim

## 4.3 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide

### Nukleinsäuren

kb-Leiter	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
-----------	-----------------------------

## Desoxyoligonukleotide

Bezeichnung	Primersequenz	Fragmentgröße
5' G3PDH 3' G3PDH	5' TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC 3' 5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'	1000 bp
5' IFN $\gamma$ 3' IFN $\gamma$	5' CAG GCC ATC AGC AAC AAC ATA AGC 3' 5' GTC CCC CAC CCC CAG ATA CAA C 3'	514 bp
5' CD83 3' CD83	5' AAG GCC TCC AGC TCC TGT TTC TAG G 3' 5' CAG AGA GAA GAG CAA CAC AGC TTC TGC 3'	418 bp
5' SAG1 3' SAG1	5' GCC GTT GTG CAG CTT TCC GTT CTT C 3' 5' ATC CCC CGT CAC CCA GCT ATC TTC T 3'	465 bp
5' BAG1 3' BAG1	5' GTT CCA TCC CGC GGG GCC TCA CTC 3' 5' CGG CGC GCA AAA TAA CCG GAC ACT CG 3'	459 bp
5' iNOS 3' iNOS	5' CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C 3' 5' GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G 3'	497 bp
5' $\beta$ -Tubulin 3' $\beta$ -Tubulin	5' CCC GTT CCC TCG TCT CC 3' 5' CTC GGT GAA TTC CAT CTC GT 3'	287 bp

## Nukleotide

[5,6-<sup>3</sup>H] Uracil

Amersham Pharmacia, Freiburg

[methyl-<sup>3</sup>H] Thymidin

Amersham Pharmacia, Freiburg

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat

Boehringer, Mannheim

2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat

Boehringer, Mannheim

2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

Boehringer, Mannheim

2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat

Boehringer, Mannheim

## 4.4 Medien und Puffer

Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)  
w/o Phenol Red

Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)  
+ 25 mM HEPES, ohne Glutamin

BioWhittaker, Verviers, B

Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7,3  
10x PBS

Serag Wiessner, Naila  
Gibco Invitrogen, Karlsruhe

### TBE-Puffer

89 mM Tris-HCl, pH 7

89 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

### Hirnzell-Medium

DMEM w/o Phenol Red

1% (v/v) Glutamin

10% (v/v) FCS

0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Knochenmark-Medium

DMEM w/o Phenol Red

1% (v/v) Glutamin

1% (v/v) GM-CSF

10% (v/v) FCS

0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Mastzell-Medium

IMDM

1% (v/v) Glutamin

1% (v/v) IL3

5% (v/v) FCS

0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

Makrophagen-Medium

IMDM

1% (v/v) Glutamin

10% (v/v) FCS

30% (v/v) L-Sup

0,1% (v/v)  $\beta$ -MercaptoethanolZell-Medium

IMDM

1% (v/v) Glutamin

5% (v/v) FCS

0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol**4.5 Feinchemikalien**

Acrylamid

Serva, Heidelberg

Agarose

Biozym, Hameln

Ammoniumoxalat

Sigma, St. Louis, USA

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Merck, Darmstadt

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt

Borsäure

Merck, Darmstadt

Bovine Serum Albumine, cell culture tested

Sigma, St. Louis, USA

n-Butanol

Merck, Darmstadt

CHAPS

Fluka Chemie, Buchs, CH

Cäsiumchlorid

ICN, Aurora, USA

Coomassie Blue G

Sigma, St. Louis, USA

Coomassie Brilliant Blue R250

Serva, Heidelberg

4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorid  
hydrate (DAPI)

Boehringer, Mannheim

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Sigma, St. Louis, USA

Dimethyl sulfoxid (DMSO)

Sigma, St. Louis, USA

Dithiothreitol (DTT)

Amersham Bioscience, Freiburg

Ethanol 97%

Merck, Darmstadt

Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA), cell culture  
tested

Sigma, St. Louis, USA

Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ficoll Typ 400	Amersham Bioscience, Freiburg
Flouromount-G	SBA, Birmigham, CA, USA
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Cytogen, Sinn
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutamin (200 mM)	BioWhittaker, Verviers, B
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN)	Sigma, St. Louis, USA
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanat	Merck, Darmstadt
Ketamin (10%)	WDT, Garbsen
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Milchpulver	Oxoid, Basingstoke, GB
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarkosin	Sigma, St. Louis, USA
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine	Sigma, St. Louis, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Parafinöl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Percoll	Sigma, St. Louis, USA
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, USA
Scopoletin	Sigma, St. Louis, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Thioglykolat	Sigma, St. Louis, USA
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% w/v)	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Vecta Mount	Vector Lab. Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylazin	WDT, Garbsen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Sigma, St. Louis, USA

## 4.6 Organismen

### 4.6.1 Zelllinien

L929 (Sanford <i>et al.</i> , 1948)	ATCC, Manassas, USA
HS27 (Suss-Toby <i>et al.</i> , 1996)	Prof. Dr. Roos, Philadelphia, USA
C6 (Benda <i>et al.</i> , 1968)	Prof. Dr. Müller, Düsseldorf
86HG39 (Bilzer <i>et al.</i> , 1991)	Institut für Neuropathologie, Düsseldorf
EG2 (Fischer, unpubliziert)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf

### 4.6.2 *Toxoplasma gondii* Stämme

BK (Winser <i>et al.</i> , 1948)	Institut für Medizinische Parasitologie, Bonn
DX (Schlüter <i>et al.</i> , 1991)	Institut für Medizinische Parasitologie, Bonn
ME49	Prof. Dr. Roos, Philadelphia, USA

### 4.6.3 Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Inzuchtmäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf unter SPF (,specific pathogen-free')-Bedingungen gezüchtet bzw. gehalten. Hirnzell-Primärkulturen stammten aus neugeborenen

Mäusen, die maximal einen Tag alt waren. Für Knochenmarkskulturen wurden 4 bis 6 Wochen alte Mäuse präpariert. Für die Präparation von Milzzellen und Peritonealmakrophagen wurden 2 bis 3 Monate alte Mäuse verwendet.

BALB/c	Tierversuchsanlage Universität Düsseldorf
C57BL/6	Tierversuchsanlage Universität Düsseldorf
B6/129F2	Tierversuchsanlage Universität Düsseldorf
B6/129/ola/TgH(CoF), (GM <sup>-/-</sup> )	Tierversuchsanlage Universität Düsseldorf
BALB/c-IL4 <sup>tm1Nnt</sup> (IL4 <sup>-/-</sup> )	Jackson Laboratory, Maine, USA
BALB/c-IL4ra <sup>tm3Nnt</sup> (IL4R <sup>-/-</sup> )	Jackson Laboratory, Maine, USA

#### 4.7 Sonstige Geräte und Materialien

Basic 96 Harvester (Zellerntegerät)	Zinser analytic Skatron, Frankfurt
Bestrahlungsgerät (IBL 437 C)	Compagnie Oris Industrie, Ontario, CDN
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit)	LKB Wallac, FIN
CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank (Heraeus B 5060 EK/CO <sub>2</sub> )	Heraeus, Hanau
Diff-Quick	DADE Behring, Düdingen, CH
FACS-Röhrchen (75 mm x 12 mm)	Sarstedt, Nünbrecht
French Press Minicell	SLM Aminco, Cambridge, GB
Glasfaserfilter (Preprint Filtermat)	LKB Wallac, FIN
HiTrap Affinitätssäule	Amersham Bioscience, Freiburg
Kodak X-OMAT, AR Film, XAR-5	Kodak, Rochester, USA
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multiphor II (2D- Elektrophoresekammer)	Amersham Bioscience, Freiburg
Nitrocellulosemembran ‚Protran‘ 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterile Werkbank (Gelaire BSB 4A)	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Vivaspin 500 / 6 (5 MWCO)	Vivascience, Lincoln, UK
1205 Betaplate (Szintillationszähler)	LKB Wallac, FIN
40µm/70µm Zellsieb	Falcon BD, Franklin Lakes, USA
96 well Immunoplate Maxisorp F96	Nunc, Wiesbaden

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

Alle Kulturen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit 5% bzw. 10% fötalem Kälberserum supplementiert, das vor Verwendung für 30 Minuten auf 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine zu inaktivieren.

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen und Puffer wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, zwei bis drei bar) autoklaviert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mit Hilfe einer 0,2 µm Membran (‘Bottle top filter’, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

#### 5.1.1 Kultivierung von Wirtszellen

##### 5.1.1.1 L929 Fibroblasten

Die murine Fibroblastenlinie L929 diente als Wirtszelle für *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes BK. Je  $1 \times 10^6$  L929-Zellen wurden in Zell-Medium in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche kultiviert. Die Zellernte erfolgte mechanisch mit einem Zellschaber nach drei oder vier Tagen. Die geernteten Zellen wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 300 x g zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und unter Verwendung einer Neubauerkammer gezählt.

### **5.1.1.2 C6 Hirnzellen**

Diese Glioma-Zelllinie aus der Ratte diente ebenfalls als Wirtszelle für *T. gondii* Tachyzoiten (BK). Die Zellkultivierung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den L929 Zellen beschrieben (5.1.1.1).

### **5.1.1.3 HS27 Fibroblasten**

Die humane Fibroblastenlinie HS27 wächst stark adhärent und bildet stabile Monolayer aus. Zum Ernten wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank für ca. fünf Minuten inkubiert, bis die Zellen sich vom Plastik lösten. Die Flasche wurde mit 10 ml Zell-Medium ausgespült und die Zellen bei 300 x g für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Zur Expansion der Kultur wurden die geernteten Zellen 1:3 verdünnt in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden bis zur 32. Passage kultiviert. HS27 dienten als Wirtszelle für Tachyzoiten und Bradyzoiten des DX-Stammes und für Tachyzoiten des ME49 Isolates.

### **5.1.1.4 EG2 Hirnzellen**

Die murine O2-A Zelllinie wächst stark adhärent. Die Kultivierung erfolgte in 6-well-Zellkulturplatten (Costar). Zum Ernten wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 0,5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank für ca. zwei Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vom Plastik lösten. Das 6-well wurde mit 2 ml Hirnzell-Medium gespült und bei 300 x g für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Ein Drittel der Zellen wurde wieder in das ursprüngliche 6-well gegeben und weiter kultiviert. Alle zwei bis drei Tagen wurde das Medium komplett ausgewechselt. Nach ca. ein bis zwei Wochen erfolgte die Zellernte.

### 5.1.1.5 Neonatale Gehirnzellen

Einen Tag nach der Geburt wurden neugeborene Mäuse in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre getötet und anschließend für ca. 30 Sekunden in 70% Ethanol gelegt und dekapitiert. Zur Entnahme des Gehirns wurden die Ohrenkanäle durchtrennt und die Kopfhaut und die Schädeldecke entfernt. Nach der Entfernung der Hirnhäute von den beiden Kortexhälften wurden bis zu zehn Kortexhälften in 2 ml DMEM-Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette mechanisch zerkleinert. Durch eine verengte Pasteurpipette wurden die kleinen Zellklumpen bis zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde in einem Volumen von 10 ml durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und anschließend bei 300 x g für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in Hirnzell-Medium aufgenommen und mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 6-well ausgesät. Nach Anwachsen der ersten adhären Zellen (nach ca. drei Tagen) wurde das Medium komplett ausgetauscht, wobei nicht-adhären Zellen entfernt wurden. Für die nächsten sieben Tage wurde jeden zweiten Tag solch ein Mediumwechsel durchgeführt.

Nach mindestens zehn Tagen Kultur wurden die Zellen zweimal trypsinisiert. Bei der ersten Trypsinisierung wurde die Zellkultur einmal mit PBS waschen und anschließend für ca. eine Minute mit 0,5 ml Trypsin/EDTA inkubieren. Danach wurde die Enzymreaktion mit 2 ml Hirnzell-Medium gestoppt und mit einem Zellschaber die Zellen geerntet. Die Zellen wurden bei 300 x g zehn Minuten zentrifugiert und wieder in die gleichen 6-wells verteilt. Die zweite Trypsinisierung erfolgte frühestens nachdem die Zellen wieder vollständig adhären waren (nach ca. zwei Tagen). Die Zellen wurden diesmal in eine 24-well-Zellkulturplatte mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro 24-well ausgesät. Nach ca. zwei Tagen war diese Hirnzellkultur für einen Toxoplasma-Proliferationstest (5.1.2.2) verwendbar.

### 5.1.1.6 86HG39 Hirnzellen

Diese humane Glioblastomzelllinie ist eine adhären wachsende Zelle. Die Zellkultivierung erfolgte wie für die HS27 Zellen beschrieben (5.1.1.3).

## 5.1.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

### 5.1.2.1 *In vitro* Passage

Isolate der Stammgruppe I, die in Zellkultur nur Tachyzoiten ausbilden (z.B. der Stamm **BK**) wurden in L929 Zellen kultiviert. Bei der Infektion mit einem Parasit/Wirtszell-Verhältnis von 5:1 waren alle Wirtszellen zwei bis drei Tagen nach Infektion lysiert. Extrazelluläre Toxoplasmen wurden ab gespült und mit Hilfe einer differentiellen Zentrifugation von den übrigen Wirtszellbestandteilen getrennt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 50 x g für fünf Minuten (Sedimentation von Wirtszellbestandteilen) und der zweite bei 1500 x g für 15 Minuten (Sedimentation der Toxoplasmen). Für die Weiterkultivierung wurden die Wirtszellen (L929) mit einem Parasit/Wirtszell-Verhältnis von 5:1 infiziert. Für die Präparation von Toxoplasma-Lysat wurden die Toxoplasmen einmal mit PBS gewaschen (15 min, 1500 x g, 4°C) und das Pellet bei -70°C gelagert.

Isolate der Stammgruppe II, die in Zellkultur je nach Kulturbedingungen Bradyzoiten und Tachyzoiten ausbilden (Stamm **ME49**) wurden in HS27 Zellen kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurden nur ME49 Tachyzoiten verwendet. Konfluente Wirtszellkulturen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden mit 1 x 10<sup>6</sup> Toxoplasmen infiziert und nach zwei bis drei Tagen geerntet. Die Toxoplasmen haben zu diesem Zeitpunkt die Wirtszellen zu ca. 50% lysiert. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und in eine 5 ml Einwegspritze, die eine 26 *gauge* Kanüle trägt, überführt. Die Zellen wurden durch die Kanüle gepresst, wobei die Toxoplasmen freigesetzt wurden. Wiederum wurden die Toxoplasmen durch eine differentielle Zentrifugation, wie vorhergehend beschrieben, gereinigt.

**DX** ist ebenfalls ein Isolat der Stammgruppe II. Für die Passage dieser Toxoplasmen wurden Kulturen von HS27 Fibroblasten verwendet. Konfluente Wirtszellkulturen wurden mit 0,1 bis 1 Bradyzoit pro Zelle infiziert. Ohne Mediumswechsel bildeten sich innerhalb der nächsten zwei bis drei Wochen intrazelluläre Zysten aus. Zystenhaltige Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und zentrifugiert (5 min, 50 x g, RT). Das Pellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen und mit Trypsin/EDTA bei RT unter mikroskopischer Beobachtung lysiert. Nach ca. zwei Minuten waren 90% der Zysten lysiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 300 µl FCS gestoppt und die

Toxoplasmen anschließend in Zell-Medium gewaschen (15 min, 1500 x g, RT). Durchschnittlich wurden pro Zyste 500 bis 1000 Bradyzoiten gewonnen.

Für die Sicherung der Toxoplasmalinien wurden ca.  $3 \times 10^7$  Toxoplasmen in 250  $\mu$ l eiskaltem Zell-Medium ohne FCS aufgenommen und diese Suspension mit 250  $\mu$ l eiskaltem Einfriermedium (Zell-Medium plus 25% DMSO und 20% FCS) vermischt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 5.1.2.2 Toxoplasmen-Proliferationstest

Die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen wurde entweder durch mikroskopische Auszählung oder über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uracil gemessen.

$^3\text{H}$ -Uracil Einbau: Toxoplasmen können aufgrund der erhöhten Aktivität der Uridin Phosphorylase sehr gut externes Uracil für die Nucleotidsynthese verwenden. Im Vergleich zur Wirtszelle ist die Aktivität dieses Enzyms 100fach stärker (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977).

Zur Messung der Toxoplasmen-Proliferation wurden  $2 \times 10^5$  Wirtszellen pro 24-well in 800  $\mu$ l Hirnzell-Medium ausgesät. Diese Zellen wurden in einem Parasit/Wirtszellverhältnis von 1:1 mit Toxoplasma infiziert. Simultan wurden Dendritische Zellen oder Kontrollzellen im Transwell (0,4  $\mu$ m, Collagen coated, Costar) in einem Volumen von 100  $\mu$ l hinzugefügt. Bei Verwendung von DC-Überstand wurden die infizierten Wirtszellen mit 800  $\mu$ l Überstand versetzt. Nach sechs oder 24 Stunden wurde jeweils ein Ansatz mit 6  $\mu$ Ci pro well (222 kBq / well)  $^3\text{H}$ -Uracil markiert und nach insgesamt 24 oder 48 Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  gestoppt. Durch den Einfriervorgang werden die Zellen zerstört und die Nucleinsäuren freigesetzt. Nach dem Auftauen wurde jeder Testansatz auf drei 96-well's verteilt und das 24-well noch einmal mit 200  $\mu$ l einer 0,1% SDS-Lösung ausgespült und in ein 96-well pipettiert. Die Übertragung des Inhalts der 96-well-Zellkulturplatten erfolgte mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf einen Glasfaserfilter. Der Filter wurde ca. zehn Minuten bei  $100^\circ\text{C}$  in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend, nach Zugabe von ca. 10 ml Szintillationsflüssigkeit, in Plastikfolie eingeschweißt. Die Messung erfolgte in einem ‚Beta-counter‘. Die Summe der pro Ansatz errechneten

‚counts per minutes‘ (cpm) gilt als Maß für die Stärke der Proliferation der Toxoplasmen. Für jede Versuchsbedingung wurden mindestens zwei Parallelansätze angelegt. Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm ‚Prism 3.0‘ (Graph Pad Software, San Diego, USA). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem ‚unpaired students t-test‘.

Mikroskopische Analyse: Eine andere Methode zur Messung der Toxoplasmen-Proliferation ist die mikroskopische Auszählung der Toxoplasmen in der Wirtszelle. Dazu wurden die Wirtszellen auf Glasplättchen ( $\varnothing$  10 mm) in 24-well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Infektion erfolgte wie oben beschrieben aber ohne radioaktive Markierung. Die Glasplättchen wurden entweder nach ca. 24 Stunden mit Diff Quick (5.1.2.3) oder mit Immunfluoreszenz (5.5.4) gefärbt. Die behandelten Glasplättchen wurden auf einen Objektträger gelegt und unter einem Deckglas eingebettet. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch bei 100facher oder fluoreszenzmikroskopisch bei 40facher Vergrößerung untersucht. Fünf Gesichtsfelder pro Ansatz wurden gezählt. Dabei wurde die Anzahl der infizierten Zellen, der Toxoplasmen pro Zelle und der parasitophoren Vakuolen pro Zellen (= Infektionsrate) bestimmt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls mit ‚Prism 3.0‘ graphisch und statistisch (‚students t-test‘) ausgewertet.

### 5.1.2.3 Quantifizierung von infizierten Wirtszellen

**Diff-Quick-Färbung:** Der Diff-Quick Färbetest ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Giemsa-May-Grünwald Methode gut vergleichbar sind. Die Glasplättchen mit den infizierten Kulturen wurden aus der 24-well-Zellkulturplatte genommen und zweimal kurz in PBS getaucht. Danach wurden die Glasplättchen fünfmal eine Sekunde in die Fixierlösung getaucht, fünfmal 1 Sekunde in Färbelösung I (Eosin G, eosinophile Färbung), fünfmal 1 Sekunde in Färbelösung II (Thiazin-Farbstoff, basophile Färbung) und zum Schluss fünfmal 1 Sekunde in PBS gewaschen. Die gefärbten Glasplättchen wurden luftgetrocknet, bevor sie auf einem Objektträger unter einem Deckglas mit ‚Vecta Mount‘ eingebettet wurden. Die gefärbten und eingebetteten Glasplättchen wurden danach unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Die Zellkerne der Wirtszellen und der Toxoplasmen

werden durch den Thiazin-Farbstoff blau und das Zytoplasma wird durch Eosin G rosa gefärbt.

**Plaque Assay:** Zur Klärung der Frage wie viele Toxoplasmen in einer infizierten Kultur lebendig sind, wurde ein ‚Plaque Assay‘ durchgeführt. Dieser Assay erfolgte in HS27 Fibroblasten, da diese eine sehr geringe Wachstumsrate im Vergleich zu anderen Fibroblastenlinien besitzen (Roos *et al.*, 1994). In 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit maximal 200 Toxoplasmen pro Flasche infiziert. Die infizierten Zellen wurden für acht bis 24 Stunden zum Äquilibrieren in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Flaschen verschlossen und für acht bis neun weitere Tage bei 37°C inkubiert ohne die Flaschen zu bewegen. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gespült und für fünf Minuten bei RT mit Ethanol fixiert. Die Färbung erfolgte für ca. zwei Minuten mit Kristallviolett. Danach wurde der violett gefärbte Zellrasen mit PBS gespült und an der Luft getrocknet. Im violett gefärbten HS27 Monolayer lassen sich nun durch infektiöse Toxoplasmen verursachte Lysehöfe erkennen. Die Zahl der so genannten ‚Plaques‘ entspricht der Zahl der infektiösen Toxoplasmen zum Zeitpunkt der Infektion.

Kristallviolett-Lösung:      25 g Kristallviolett in 250 ml EtOH lösen  
   + 1000 ml 1% Ammoniumoxalat

### 5.1.3 Zellpräparationen

#### 5.1.3.1 Knochenmarkszellen

Zur Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen wurden 4 bis 6 Wochen alte Mäuse verwendet. Nach dem Töten der Mäuse in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre wurde das Fell vom Bauch und den hinteren Extremitäten entfernt. Die hinteren Extremitäten wurden direkt distal vom Hüftgelenk abgetrennt und in eine mit 10 ml eiskaltem DMEM Medium gefüllte Petrischale (Ø 50 mm) überführt. Nachdem der Ober- und Unterschenkel vom Kniegelenk abgetrennt wurde, wurde das Knochenmark aus den Knochen mit einer 20 gauge Kanüle, die auf einer mit DMEM-Medium gefüllten 10 ml Einwegspritze steckte, in einen neue Petrischale (Ø 50 mm) „gespritzt“. Nach der Präparation aus beiden hinteren Extremitäten wurde das

Knochenmark in ein 50 ml Spitzboden-Röhrchen überführt und mit einer 5 ml Plastikpipette mechanisch zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Petrischale mit 5 ml DMEM-Medium nachgespült und die Zellen bei 4°C mit 300 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde das Zellpellet mit 2 ml 0,85% Ammoniumchlorid resuspendiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml Zell-Medium gestoppt, zentrifugiert und gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 5 ml Knochenmark-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### 5.1.3.2 Gesamtmilzzellen

Für die Gewinnung von Gesamtmilzzellen wurden zwei bis drei Monate alte Mäuse verwendet. Nach dem Töten der Maus in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre wurde sie mit dem Kopf nach links auf die Seite gelegt. Nach Desinfektion wurde die Milz heraus präpariert und in ein 15 ml Spitzboden-Röhrchen, gefüllt mit 5 ml eiskaltem Zell-Medium, gegeben. Danach wurde die Milz mit dem Medium in eine 50 mm Petrischale überführt und mit sterilen Objektträgern (mit Mattrand) zerteilt und zerrieben. Diese Zellsuspension wurde zurück in das 15 ml Spitzboden-Röhrchen überführt und für fünf Minuten auf Eis stehen gelassen, damit alle großen Partikel sedimentierten. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Röhrchen pipettiert und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde für eine Erythrozytenlyse in 2 ml 0,85% Ammoniumchlorid resuspendiert und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 10 ml Zell-Medium hinzu pipettiert und wieder zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Dieses Erythrozyten freie Pellet wurde noch einmal mit Zell-Medium gewaschen und anschließend in 5 ml Zell-Medium für die Gesamtmilzzellen bzw. 5 ml MACS-Puffer (vgl. 5.1.5) für die Isolierung von Dendritischen Zellen aufgenommen und gezählt. Die Gesamtzellzahl einer Milz betrug ca. 100 Millionen Zellen.

Für die Aufreinigung Dendritischer Zellen aus der Milz wurden Milzzellen mit insgesamt 10 ml MACS-Puffer durch ein 40 µm Zellsieb gespült, um die größeren Partikel zu entfernen. Danach wurden die Dendritischen Zellen über eine MACS-Säule angereichert (vgl. 5.1.5). Die Population der Gesamtmilzzellen und der CD11c<sup>+</sup>

Zellen wurden in einem Durchflusszytometer (vgl. 5.5.5) auf ihre Reinheit hin analysiert.

### 5.1.3.3 Hirn-Leukozyten

Präparation des Hirns: Mononukläre Hirnzellen wurden aus Mäusen während der chronischen Phase der Infektion isoliert. Dazu wurden zwei bis drei Monate alte Mäuse mit drei Zysten des DX-Isolats pro Maus intraperitoneal (ip) infiziert. Nach sechs bis acht Wochen wurde die Maus mit 10 µl pro Gramm Mausgewicht intraperitoneal mit dem Anestätikum narkotisiert. Nach Desinfektion wurde über dem Sternum die Haut angehoben und abgeschnitten. Mit der linken Hand wurde die Maus seitlich gedrückt, so dass das Sternum nach oben stand. Unter dem Sternum wurde mit einem Schnitt die Bauchhaut geöffnet und der Brustkorb wurde an beiden Seiten geöffnet, aufgeklappt und abgetrennt. Unter dem Herz wurde die Vene zerschnitten. Mit einer mit eiskaltem PBS gefüllten Perfuserspritze wurde in die rechte Herzkammer gestochen und die Maus langsam mit ca. 30 bis 50 ml PBS perfundiert. Die Perfusion war erfolgreich, wenn die Leber weiß aussah. Nach Desinfektion des Nackenbereiches wurde die Maus dekapitiert und der Kopf in eine sterile Petrischale (Ø 50 mm) überführt. Nach Fixierung des Kopfes mit einer Pinzette an der Schnauze wurde die Kopfhaut am Mittelscheitel bis zwischen die Augen eingeschnitten, die Ohrenkanäle durchtrennt und die Kopfhaut weggeklappt, so dass die gesamte Schädeldecke freilag. Anschließend wurde die Schädeldecke eingeschnitten und entfernt. Das freiliegende Hirn wurde mit einem Spatel herausgenommen und in 10 ml eiskaltes PBS in einem 50 ml Spitzboden-Röhrchen überführt.

Isolierung der mononuklären Hirnzellen: Das perfundierte Hirn wurde in eine 50 mm Petrischale überführt und mit der Iris-Schere in kleine Stücke zerschnitten. Nach Zugabe von 4,5 ml Hirnzell-Medium wurde die Suspension zwei- bis dreimal durch eine 18 *gauge* Kanüle „gespritzt“. Danach wurde 240 µl Collagenase/Dispase hinzu gegeben und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 100 µl DNaseI hinzugefügt, mit einer Pipette resuspendiert und für weitere 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension aus der Petrischale gespült und mit 40 ml Hirnzell-Medium gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde

danach in 10 ml Hirnzell-Medium resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb gespült. Das Röhrchen und das Zellsieb wurden mit weiteren 10 ml Hirnzell-Medium gespült und zentrifugiert. Das Hirnzell-Pellet wurde in 70% Percoll resuspendiert und vorsichtig mit 30% Percoll überschichtet. Der Gradient wurde 25 Minuten bei RT mit 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Myelinschicht mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die mononuklären Zellen befanden sich in der Interphase. Sie wurden mit einer Transferpipette geerntet und in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 40 ml Hirnzell-Medium gewaschen (15 min, 400 x g, 4°C). Beim zweiten Waschgang wurden die Zellen aus den einzelnen Präparationen vereinigt (10 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 1 bis 2 ml Hirnzell-Medium aufgenommen und gezählt. Die durchschnittliche Ausbeute bei BALB/c Mäusen die länger als 4 Wochen infiziert waren, lag bei zwei Millionen Zellen pro Hirn.

Anestätikum:                    1,2 ml 10% Ketamin  
    1 ml 2% Xylazin  
    7,8 ml 0,9% NaCl (isotonische Kochsalzlösung)

Collagenase/Dispase:        Stocklösung: 10 mg/ml in A. dest., steril filtriert

DNaseI: Stocklösung:        10 mg/ml in A. dest., steril filtriert

Percoll:                    Verdünnen von Percoll mit 10fach PBS (9:1) = 100% Percoll  
    30% und 70% Percoll müssen frisch angesetzt werden  
    30% Percoll durch Verdünnung mit PBS herstellen

70% Percoll durch Verdünnung mit Medium ansetzen, da damit die Interphase besser zu erkennen ist.

#### **5.1.3.4 Peritonealexsudat-Makrophagen**

Für die Präparation der Peritonealexsudat-Makrophagen wurde Mäusen 1 ml 3% Thioglykolat i.p. appliziert. Nach drei bis vier Tagen wurde die Maus in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und auf dem Rücken

fixiert. Das Fell wurde über dem Bauch- und Brustbereich entfernt. Die frei präparierte Bauchwand wurde mit 70% Ethanol besprüht. Anschließend wurde die Bauchhöhle mit 5 bis 7 ml kaltem PBS zwei- bis dreimal kräftig durchgespült (20 *gauge* Kanüle). Die komplette Bauchhöhlenflüssigkeit wurde in ein Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Durchschnittlich erhält man ca. zehn Millionen Zellen aus einer Maus. Die gewonnenen Peritonealexsudat-Makrophagen wurden mit drei bis fünf Millionen Zellen pro 100 mm Petrischale in Makrophagen-Medium ausgesät. Die Zellen wurden für einen Tag im Brutschrank inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden abgespült und die adhärenen Peritonealexsudat-Makrophagen konnten geerntet werden. Um diese zu ernten, wurde die Petrischale für mindestens 20 Minuten auf Eis gestellt und danach mit kaltem Medium aus ca. 10 bis 20 cm Abstand (22 *gauge* Kanüle) kräftig „abgespritzt“. Die so abgelösten Zellen wurden in ein Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C).

## **5.1.4 Differenzierung myeloider Zellen aus Knochenmarkskulturen**

### **5.1.4.1 Mastzellen**

Die Differenzierung von Mastzellen aus Knochenmarkszellen durch IL3-haltiges Medium dauerte ca. vier bis fünf Wochen. Die Knochenmarkszellen wurden mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 24-well ausgesät und 14 Tage lang wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach zwei Wochen wurden die nicht adhärenen Zellen aus dem 24-well gespült und in ein frisches 24-well überführt. Dort wurden die Zellen wieder zwei bis drei Wochen mit regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Danach lag eine reine Mastzellpopulation vor, die durch die Färbung der Granula mit Toluidin Blau bestätigt wurden (Yung und Moore, 1985).

### **5.1.4.2 Dendritische Zellen**

Die Differenzierung der Knochenmarkszellen erfolgte wie von (Lutz *et al.*, 1999) beschrieben. Durchschnittlich wurden 30 bis 50 Millionen Knochenmarkszellen pro Maus gewonnen. Für die Differenzierung der Knochenmarkszellen in Dendritische

Zellen ist eine Erythrozytenlyse nicht notwendig, da diese die Differenzierung nicht beeinträchtigen. Es wurden zwei Millionen Zellen pro 100 mm Petrischale in 10 ml Knochenmarks-Medium überführt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit weiteren 10 ml Knochenmarks-Medium versetzt. Am sechsten Differenzierungstag wurden 10 ml Medium aus der Petrischale entnommen, zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und das Pellet mit 10 ml frischem Knochenmarks-Medium resuspendiert und wieder in die Petrischale gefüllt. Nach acht, neun oder zehn Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet. Falls das Ernten nach dem neunten Tag erfolgte, wurde am achten Tag erneut ein Mediumswechsel, wie für den sechsten Tag beschrieben, durchgeführt. Die Zellpopulation der nicht adhärenen Zellen enthielt CD11c<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> Zellen. CD11c<sup>+</sup> Zellen (= Dendritische Zellen) wurden über eine MACS-Säule (vgl. 5.1.5) angereichert und von CD11c<sup>-</sup> Zellen (= Dendritischer Zellen-Vorläufer) getrennt. Die so angereicherten Zellen wurden im Durchflusszytometer (vgl. 5.5.5) auf ihren Phänotyp hin untersucht.

### 5.1.5 Isolierung Dendritischer Zellen mittels MACS

Für die Anreicherung und Aufreinigung Dendritischer Zellen aus der Milz, dem Hirn oder dem Knochenmark wurde die Methode des ‚Magnetic Cell Sorting‘ verwendet. Hierzu werden kolloidale super-paramagnetische ‚MicroBeads‘, konjugiert mit einem monoklonalen Hamster anti-CD11c Antikörper, benutzt. Der Antikörper bindet an CD11c<sup>+</sup> Zellen und anschließend können diese Zellen über eine MACS-Säule in einem Magnetfeld von CD11c<sup>-</sup> Zellen getrennt werden. Die mononukleären Hirnzellen (5.1.3.3) oder die Gesamtmilzzellen (5.1.3.2) oder die gemischte Population der Knochenmark-DC (5.1.4.2) wurden in 20 ml MACS-Puffer über ein 40 µm Zellsieb gegeben und gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 1 Teil ‚MicroBeads‘ und 4 Teilen MACS-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 6 bis 12°C inkubiert. Bei den Hirn- und Milzzellen wurden 100 µl ‚MicroBeads‘ pro 10<sup>8</sup> Gesamtzellen eingesetzt. Der Anteil der DC beträgt dort ca. 1 bis 2% von der Gesamtpopulation. Da der Anteil der DC in der Knochenmarkskultur mindestens 50% ist, wurden hier pro 5 x 10<sup>7</sup> Gesamtzellen 500 µl ‚MicroBeads‘ verwendet. Danach wurden die mit ‚MicroBeads‘ behandelten Zellen in 10 bis 20fachem Volumen MACS-Puffer gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C). Die weitere Aufreinigung über die Säulen

erfolgte nach Herstellerangaben der MACS-Säulen (Miltenyi Biotech). Die positiven und negativen Fraktionen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit überprüft (5.5.5).

MACS-Puffer:        0,5% (w/v) BSA (Zellkultur getestet)  
                          5 mM (w/v) EDTA (Zellkultur getestet)  
                          in PBS, entgast und steril filtriert

### 5.1.6 Mastzell-Proliferationstest

IL4 induziert bei Mastzellen eine Proliferation, die mit dem Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen werden kann. Für den Nachweis einer IL4-ähnlichen Aktivität in Toxoplasma-Lysat (5.2.1) wurden Mastzellen mit Lysat von BK-Tachyzoiten inkubiert. Vor diesem Test wurde das Medium 4 Tage lang nicht erneuert. Für den Test wurden Mastzellen geerntet (10 min, 300 x g, RT) und in Mastzell-Medium aufgenommen. Es wurden 3000 Zellen pro 96-well ausgesät. Als Positivkontrolle diente Interleukin-4, was mit einer maximalen Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt und 1:2 weiter verdünnt wurde. Für den Test mit Toxoplasma-Lysat wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe beginnend mit 100  $\mu\text{g/ml}$  aufgestellt. Nach zwei Tagen wurde der Test mit 0,8  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin markiert und nach weiteren 24 Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  gestoppt. Die Messung der inkorporierten Radioaktivität erfolgte wie beschrieben (5.1.2.2).

## 5.2 Präparation von Zell-Lysaten

### 5.2.1 Toxoplasma-Lysat

Für die Präparation von Toxoplasma-Lysat wurden Tachyzoiten des Isolates BK verwendet. Sie wurden nach dem Ernten einmal in PBS gewaschen, zentrifugiert (15 min, 600 x g,  $4^\circ\text{C}$ ) und als Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Pellets wurden nach dem Auftauen in *A. dest.* vereinigt und auf  $10^9$  Toxoplasmen pro ml eingestellt. Diese Suspension wurde in einer ‚French Press Minicell‘ zweifach, einem Druck von 18000 psi ausgesetzt und damit durch die Einwirkung von hohen

Scherkräften zerstört. Bei einer mikroskopischen Kontrolle der Präparation waren keine intakten Toxoplasmen nachweisbar. Für die Verwendung des Lysats in der Affinitätschromatographie (5.5.2) wurde das Lysat durch zweifaches Zentrifugieren von Membranbestandteilen befreit (15 min, 10000 x g und 1 h, 100000 x g, 4°C). Der Proteingehalt wurde in einem Bradford Assay (5.4.5) bestimmt.

### **5.2.2 Zell-Lysat**

Für die Präparation von Zell-Lysat wurden Zellen in PBS gewaschen und in *A. dest.* oder in Medium aufgenommen. Diese Suspensionen wurden dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Zellreste wurden nach den drei Einfrier/Auftau-Zyklen durch zweifache Zentrifugation (20 min, 800 x g, und 15 min, 10000 x g, 4°C) entfernt. Der Proteingehalt wurde in einem Bradford Assay (5.4.5) bestimmt.

### **5.3 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL-Reaktion)**

Zellen bei denen eine Apoptose (programmierter Zelltod) eingeleitet wurde, weisen eine nukleare Disintegrität auf, bei der genomische DNA fragmentiert wird. Der Nachweis von Apoptose in primären Hirnzellen wurde mit dem Kit ‚In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein‘ von der Firma Roche durchgeführt. Mit diesem Kit werden die DNA-Strang Brüche durch Markierung der freien 3' OH Enden nachgewiesen. Die Markierung erfolgt durch die ‚Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), die die Polymerisation der markierten Nukleotide an die freien 3' OH Enden katalysiert (TUNEL-Reaktion). Die eingebauten Fluorescein-markierten Nukleotide können mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Die TUNEL-Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben. Die auf 10 mm Glasplättchen adhärenen primären Hirnzellen wurden zuerst in 4% Paraformaldehyd für 1 h bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS, Permeabilisation (2 min auf Eis) in 0,1% Triton, gelöst in 0,1% Natriumcitrat, und erneutem Waschen in PBS (zweimal) erfolgte die TUNEL-Reaktion für eine Stunde bei 37°C. Dazu wurden die Glasplättchen mit der Zellseite in dem TUNEL-Reaktionsmix (25µl) auf Parafilm in wasserdampfgesättigter

Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Glasplättchen dreimal in PBS gewaschen und in Fluoromount eingebettet (5.5.4). Fluorescein gefärbte Zellkerne wurden im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 488 nm sichtbar gemacht.

## 5.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde durch Lyse der Zellen mit Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen (Maniatis *et al.*, 1982). Die GSCN Methode nutzt die Tatsache aus, dass RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte ( $1,9 \text{ g/cm}^3$ ) hat als andere Zellbestandteile und deshalb bei der Zentrifugation pelletiert wird, während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben.

$10^9$  zweifach mit PBS gewaschene Toxoplasmen oder bis zu sechs 24-wells aus einem Toxoplasma-Proliferationstest wurden mit insgesamt 4 ml GSCN-Lösung resuspendiert. Diese Lösung wurde anschließend mit 3 ml DEPC-Wasser gemischt und entweder bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für die Weiterverarbeitung wurde in RNase freie Polyallomer Röhrchen der Firma Beckmann zuerst 3 ml Cäsiumchlorid-Lösung vorgelegt. Darauf wurde vorsichtig die insgesamt 7 ml Zellsuspension pipettiert. Abschließend wurde das Röhrchen mit Paraffinöl komplett gefüllt und austariert. In einer Ultrazentrifuge wurde der Gradient für 16 Stunden bei  $150000 \times g$  bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das RNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das trockne Pellet wurde in 10 bis 20  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration wie unter 5.4.5 beschrieben bestimmt.

GSCN-Lösung:     4 M Guanidinium-Isothiocyanat  
                      20 mM Natrium-Acetat pH 5,2  
                      0,1 mM DTT  
                      0,5% N-Laurylsarkosin

Die fertige Lösung wurde steril filtriert.

CsCl-Lösung: 5,7 M Cäsiumchlorid  
0,1 M EDTA pH 8  
0,002 Vol. DEPC

Die fertige Lösung 30 Minuten stehen lassen und anschließend autoklavieren.

DEPC-Wasser: *Aqua dest.* + 0,1% Diethylpyrocarbonat über Nacht stehen lassen und anschließend autoklavieren.

### 5.4.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung reiner RNA-Lösungen wurde in einem DNA/RNA Calculator II (Pharmacia) mit Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Um im linearen Messbereich zu arbeiten, wurden alle Proben so verdünnt, dass ihre Absorption maximal einen Wert von 1,0 annahm. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O, TE). Zur Berechnung der Konzentrationen wurde, nach Verrechnung des Verdünnungsfaktors, folgende Beziehung verwendet:

$$1,0 A_{260} \cong 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von RNA-Lösungen wurde das Verhältnis der Absorptionwerte bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Reine Präparationen sollten  $A_{260}/A_{280}$ -Werte zwischen 1,7 und 2,1 besitzen, Kontaminationen durch Proteine führen zu deutlich geringeren Quotienten.

### 5.4.3 Herstellung von cDNA

Um bestimmte mRNA-Transkripte in Gesamt-RNA (5.4.1) qualitativ bzw. semiquantitativ nachzuweisen bzw. zu amplifizieren, wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. cDNA wurde ausgehend von 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit dem ‚Advantage™ RT-for-PCR Kit‘ (Clontech, Palo Alto, USA) entsprechend den Herstellerangaben erzeugt. Die Erststrangsynthese erfolgte mit ‚molony murine leukemia virus‘-Reverse Transkriptase und oligo dT-Primer.

#### 5.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Für die DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden 25 ng cDNA (entspricht 2,5 µl des cDNA Ansatzes) eingesetzt. Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen unter Verwendung des ‚high fidelity PCR System‘ (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Primer wurden mit einer Konzentration von je 400 nM, die dNTPs mit je 200 µM und die DNA-Polymerase mit 2,6 U pro 100µl eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (PCR Express Gradient, Hybaid). Nach Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten wurde die DNA in 25 bis 40 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus 1 Minute 95°C, eine Minute 60°C und eine Minute 72°C. Zum Abschluss wurde der Elongationsschritt des letzten Zyklus um sieben Minuten bei 72°C verlängert. Die PCR Produkte wurden bei 4°C gelagert und in einem Agarosegel (5.4.6.1) elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 5.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Gesamt-Proteinkonzentrationen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Der Assay wurde in einer 96-well-Flachboden-Platte (Fa. Greiner) durchgeführt. Als Standard wurde BSA (2 mg/ml) beginnend mit 200 µg/ml bis 10 µg/ml eingesetzt. Die Probe wurde ebenfalls in einer Verdünnungsreihe mit je 20 µl pro well vorgelegt. Danach wurden zu jedem well 200 µl frisch angesetztes Bradford-Reagenz hinzu pipettiert. Anschließend wurde sofort die Farbentwicklung mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung konnte mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden.

Bradford-Reagenz: 3 ml Bradford-Stammlösung  
+ 17 ml A. dest. (autoklaviert)

Bradford-Stammlösung: 100 mg Coomassie Blue G  
+ 50 ml Ethanol 97%  
+ 100 ml Phosphorsäure 85%

Die Stammlösung wurde bei 4°C in einer lichtundurchlässigen Flasche aufbewahrt.

## 5.4.6 Gelelektrophoresen

### 5.4.6.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von PCR-Produkten wurden horizontale Agarosegele mit 1 bis 1,5% (w/v) Agarose in 1x TBE Puffer verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Das aufgekochte Gel wurde mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel in 1x TBE-Puffer eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von ca. 6 V/cm aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel über die Fluoreszenz der in den Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromidmoleküle bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (340 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2035) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer CCD-Kamera (Digit Store Duo von Intas, Göttingen) dokumentiert.

6 x DNA-Probenpuffer:     15% (w/v) Ficoll Typ 400  
                                  0,25% (w/v) Bromphenolblau  
                                  0,25% (w/v) Xylencyanol  
                                  in TBE Puffer

### 5.4.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgelsystem verwendet (Laemmli, 1970). Hierbei wird als denaturierendes Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt, welches als amphiphiles Detergens die native Proteinstruktur auffaltet. Die zu analysierenden Proteine werden aufgrund der denaturierenden Bedingungen (aufkochen in SDS-Puffer, 0,1% SDS im Trenngel) ausschließlich in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 20% SDS-Probenpuffer vermischt und 5 min aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei einer Spannung von 100 V, bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese auf

200 V erhöht. Bei Elektrophoresen über Nacht wurde eine konstante Spannung von 40 V angelegt.

Die Lösungen A bis D sind Stammlösungen, aus denen das Sammelgel und das Trenngel angesetzt wurden.

Lösung A: rotiphorese Gel 30 (Gebrauchsfertige Lösung, 37,5 Teile Acrylamid, 1 Teil 0,8% Bisacrylamid; Fa. Roth, Karlsruhe)

Lösung B: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (entgast)

Lösung C: 10% (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O

Lösung D: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (entgast)

Elektrophoresepuffer: 28,8 g/l Glycin  
6 g/l Tris  
1 g/l SDS

Sammelgellösung: 100 ml Lösung A  
250 ml Lösung D  
10 ml Lösung C  
650 ml H<sub>2</sub>O

Lösung entgasen und in einer Licht undurchlässigen Flasche bei 4°C lagern.

SDS-Probenpuffer: 2 g SDS  
75 ml Lösung D  
25 ml 50% Glycin in H<sub>2</sub>O  
*ad libitum* Bromphenolblau  
(+ 5% β-Mercaptoethanol)

Für ein 15% SDS-Gel wurden folgende Lösungen gemischt:

Trenngel: 10 ml Lösung A  
5 ml Lösung B

0,2 ml Lösung C

5 ml entgastes A. *dest.*

Das gegossenen Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Abschluss zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgenommen, das Sammelgel darüber gegossen und mit einem Kamm wurden die Probenkanäle ausgespart.

Sammelgel:            10 ml Sammelgellösung  
                              + 100 µl 10% APS  
                              + 10 µl TEMED

Die Detektion der Banden erfolgte durch Coomassie-Färbung (5.4.7.1), bei geringen Proteinkonzentrationen mit Hilfe der empfindlicheren Silberfärbung (5.4.7.2).

### **5.4.6.3 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Bei der zweidimensionalen Auftrennung werden Proteingemische in der ersten Dimension in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt und erst in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (O'Farrell, 1975). Dadurch wird eine hochauflösende Proteinauftrennung erreicht. Zur Verbesserung der Auftrennung und der Reproduzierbarkeit der Fokussierung wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode nach O'Farrell die Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten (IPG) verwendet. Für die IEF in immobilisierten pH-Gradienten wurde mit Material und Geräten von Amersham Pharmacia Biotech gearbeitet. Ein Milligramm lyophilisiertes Toxoplasma-Lysat wurde in Rabilloud-Puffer (Rabilloud *et al.*, 1997) gelöst. Für 18 cm lange IPG-Streifen (pH 4-10) wurden 350 µl Rabilloud-Puffer verwendet. Die IPG-Streifen (,Immobiline Dry Strips') wurden über Nacht bei RT mit der gelösten Probe rehydriert. Die Fokussierung erfolgte bei 20°C in der ,Multiphor II'-Elektrophoresekammer bei einer maximalen Spannung von 3500 Volt. Die Spannung wurde bis 3500 V so erhöht, dass ein Grenzwert von 50 µA pro IPG-Streifen nicht überschritten wurde. Die 3500 V wurden gehalten, bis die Stromstärke ihren Minimalwert erreicht hatte. Dann wurde die Fokussierung

abgebrochen und die Streifen entweder direkt in der zweiten Dimension aufgetrennt oder in einer Folie eingeschweißt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Auftrennung nach Molekulargewicht mussten die fokussierten Proteine mit SDS beladen werden. Dazu wurden die IPG-Streifen bei RT 15 Minuten in Äquilibrationpuffer I und 15 Minuten in Äquilibrationpuffer II äquilibriert. Die Streifen wurden anschließend auf das Sammelgel von 1 mm Dicke aufgelegt und mit Agarose fixiert. Die Elektrophorese erfolgte nun wie unter 5.4.6.2 beschrieben. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele entweder geblottet (vgl. 5.4.7.4) oder gefärbt (vgl. 5.4.7).

Rabilloud-Puffer:            0,5% Triton X-100  
                                      2 M Thioharnstoff  
                                      7 M Harnstoff  
                                      4% CHAPS

In 2 ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern. Vor Gebrauch auftauen und mit 20 mg DTT und 20  $\mu\text{l}$  Ampholyte versetzen.

Äquilibrationpuffer:        50 mM Tris-HCl pH 8,5  
                                      2% SDS  
                                      30% Glycerin  
                                      6 M Harnstoff  
                                      Bromphenolblau

Dieser Puffer kann in 10 ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Vor dem Äquilibrieren der Streifen wurde in Äquilibrationpuffer I 10 mg DTT und in Äquilibrationpuffer II 480 mg Iodacetamid zugeben.

Agarose:                        0,5 g Agarose  
                                      12,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8  
                                      1 ml 10% SDS  
                                      36,5 ml A. dest.

## 5.4.7 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

### 5.4.7.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE (5.4.6.2/5.4.6.3) erfolgt über den Farbstoff ‚Coomassie Brilliant Blue R250‘. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Coomassie-Färbelösung über Nacht unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Dann wurde das Gel in einer Entfärbelösung für mindestens 3 h (bis zu 24 h) wieder entfärbt. Bei diesem Entfärbevorgang können die Proteine dann als dunkelblau gefärbte Banden oder Spots vor dem hellblauen Hintergrund detektiert werden. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine ab einer Menge von 300 ng nachgewiesen werden.

Coomassie-Färbelösung: 50% (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

Die so gefärbten Gele, nach einer eindimensionalen Auftrennung, wurden auf Whatman-Papier getrocknet. Die Gele, nach einer zweidimensionalen Auftrennung wurden in Folie eingeschweißt und im Kühlschrank gelagert, um eventuell Proteinspots auszustechen und massenspektrometrisch zu analysieren (5.4.8). Somit konnten die Gele für längere Zeit aufbewahrt werden. Die Digitalisierung der 2D-Gele erfolgte mit einem Durchlichtscanner (Epson GT-9600).

### 5.4.7.2 Silberfärbung

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung ermöglicht eine empfindlichere Detektion von Proteinbanden als die oben beschriebene Coomassie-Färbung. Hierzu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese für 5 min in Fixierlösung I und anschließend für 5 min in Fixierlösung II unter leichtem Schütteln fixiert. Danach wurde das Gel zweimal in 60°C warmen *A. dest.*

geschüttelt. Es folgte eine Inkubation für 30 Sekunden mit der Reduktionslösung. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung (ca. sechsmal) in 60°C warmen *A. dest.* geschüttelt. Die Färbung in einer Färbelösung erfolgte für zehn bis zwölf Minuten. Vor der Entwicklung wurde das Gel einmal für 90 Sekunden in *A. dest.* gewaschen. Die Entwicklung in der Entwicklerlösung erfolgte bis zur gewünschten Intensität, dabei wurde circa zweimal die Entwicklerlösung gewechselt. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde das Gel circa zehn Minuten in Stopplösung geschwenkt.

Fixierlösung I:                    40% (v/v) Methanol  
    10% (v/v) Essigsäure

Fixierlösung II:                    10% (v/v) Ethanol  
    15% (v/v) Essigsäure

Reduktionslösung:                0,5 g / 250 ml (w/v)  $K_3[Fe(CN)_6]$   
    0,8 g / 250 ml (w/v)  $Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$

Die beiden Lösungen erst kurz vor Gebrauch 1:1 mischen.

Färbelösung:                        2 g/l (w/v) Silbernitrat

Entwicklerlösung:                29 g/l (w/v) Natriumcarbonat  
    0,08% (v/v) Formaldehyd

Stopplösung:                        7% (v/v) Essigsäure

Die so gefärbten Gele wurden auf Whatmanpapier getrocknet und konnten somit für längere Zeit aufbewahrt werden.

#### **5.4.7.3 Zink-Imidazol Färbung**

Die Zink-Imidazol Färbung ist eine Negativfärbung und ermöglicht so den Nachweis von Proteinen ohne deren Anfärbung. Das Prinzip dieser Methode beruht auf

Protein-Salz-Verbindungen (z.B. SDS oder schwere Kationen), die weniger reaktiv sind als freie Salze im Gel. Demzufolge ist die Präzipitation eines unlöslichen Salzes an den Protein besetzten Stellen langsamer als im Gelhintergrund. Diese differentielle Fällungsgeschwindigkeit wird für die Negativfärbung genutzt. Nach der von (Ferrerias *et al.*, 1993) beschriebenen Methode wird Zink als zweiwertiges Kation verwendet. Die Proteine bleiben durchsichtig während die Gelmatrix milchig wird. Durch Auflegen des Geles auf eine schwarze Unterlage erscheinen die Proteine schwarz und die Gelmatrix weiß. Für die Färbung wurde das Gel für fünf Minuten auf einem Horizontalschüttler in 1% (w/v) Natriumcarbonatlösung geschwenkt. Danach wurde das Gel für 15 Minuten in 0,2 M (w/v) Imidazol + 0,1% (w/v) SDS inkubiert. Nach einmaligem Wässern für 10 Sekunden wurde das Gel für 30 bis 60 Sekunden mit 0,2 M (w/v) Zinksulfat gefärbt. Anschließend wurde das Gel erneut zweimal 10 Sekunden und zweimal 5 Minuten gewässert und in 1% Natriumcarbonat aufbewahrt. So gefärbte Gele können nur schlecht aufbewahrt werden, deshalb wurden sie digital gespeichert. Die Digitalisierung der Gele erfolgte mit einem Durchlichtscanner (Epson GT-9600).

Diese Methode ist geeignet, um Spots auszusteichen und diese separat im Western Blot nachzuweisen. Das Gel bzw. die Spots wurden anschließend mit einer Entfärbelösung (3x 10 min) entfärbt. Vor weiterer Anwendung wurde das Gel 10 min äquilibriert (für Western Blot z.B. in Kathodenpuffer).

Entfärbelösung:     0,25 M (w/v) EDTA  
                          0,25 M (w/v) Tris / HCl pH 9

#### **5.4.7.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)**

Zur Identifizierung von Proteinen nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (5.4.6.2) wurden die aufgetrennten Proteine in einem ‚Semi-Dry-Blot‘ (‚CarboGlas‘, Schleicher & Schüll, Dassel) auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Drei Lagen in Kathodenpuffer getränkte Whatman 3 MM Papierstücke, die der Größe des Gels entsprachen, wurden ohne Luftblasen auf die Elektrodenplatte (Kathode) gelegt. Darüber wurde das in Kathodenpuffer getränkte Gel und darauf die mit Anodenpuffer I befeuchtete Membran gelegt. Es folgten drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer I

angefeuchtet wurden. Zum Schluss lagen drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer II getränkt wurden. Der Transfer erfolgte im Konstantstrombetrieb, wobei die Stromstärke  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche betrug. Die Spannung liegt dabei bei ca. 6 V. Die Transferdauer richtet sich je nach Proteingröße und dauerte ca. 30 bis 60 Minuten.

Kathodenpuffer:            25 mM (w/v) Tris  
                                      40 mM (w/v) 6-Aminohexansäure  
                                      20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer I:            30 mM Tris  
                                      20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II:        300 mM (w/v) Tris  
                                      20% (v/v) Methanol

#### 5.4.8 Identifizierung einzelner Proteine im 2D-Gel

Die Identifikation isolierter Proteinspots im 2D-Gel erfolgte durch Massenspektrometrie und/oder durch Immunonachweis (5.5.1). Die Massenspektrometrie wurde im Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) durchgeführt. Für die Massenspektrometrie wurden einzelne Spots aus dem Coomassie-gefärbten 2D Gel ausgestochen und im Gel mit Trypsin verdaut. Die Peptidfragmente wurden aus der Gelmatrix eluiert, lyophilisiert und in 5% Ameisensäure aufgenommen. Nach Entsalzung der Probe über eine ZipTipC<sub>18</sub> Säule wurden die Massenspektren mit einem ‚quadrupole-time-of-flight‘ Massenspektrometer (QSTAR, Applied Biosystems) aufgenommen. Einzelne Peptide wurden durch Tandem-Massenspektrometrie weiter analysiert und die Peptidsequenzen nach manueller Interpretation in der BLAST2-Datenbank identifiziert.

## 5.5 Antigen-Nachweise

### 5.5.1 Immunonachweis von Proteinen

Nach dem Elektrotransfer der Proteine (5.4.7.4) wurde die Membran zunächst zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mindestens eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Primär- und Sekundärantikörper wurden in Blocklösung verdünnt und für jeweils mindestens eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde die Membran 2 x 5 min in PBS gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Chemolumineszenz-Substrat ‚Super Signal‘ (Pierce) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Lumineszenz wurde mit Röntgenfilmen detektiert. Dazu wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und in einer Expositionskassette für eine Sekunde bis maximal eine halbe Stunde exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklerlösung (Kodak) für 1 bis 5 min. Der Entwicklungsprozess wurde nach kurzem Wässern in einem Fixierbad (Kodak) gleichzeitig gestoppt und fixiert (ca. 5 min). Abschließend wurden die Filme mit *A. dest.* gewässert und getrocknet.

### 5.5.2 Immunoaffinitätschromatographie

Für die Aufreinigung und Anreicherung von Zytokinen aus Hybridomüberständen oder von Zytokin-ähnlichen Proteinen aus Toxoplasma-Lysat (5.2.1) wurde eine ‚HiTrap‘ NHS-aktivierte Affinitätssäule (Amersham Pharmacia) verwendet. Diese Säule enthält 5 ml NHS-aktivierte Sepharose, an die eine kovalente Kopplung von Liganden mit primären Aminogruppen möglich ist. Die Säule wurde nach Herstellerangaben vorbereitet, der Ligand gekoppelt, gewaschen und deaktiviert. Der monoklonale anti-Interleukin-4 Antikörper 11B11 wurde als Ligand verwendet. Nach der Bindung des Antikörpers wurde das Zytokin aus dem Hybridomüberstand oder aus Toxoplasma-Lysat über die Säule aufgereinigt. Dafür wurde die Säule gemäß den Herstellerangaben äquilibriert und anschließend die Probe unter Verwendung einer Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 6,5 Tropfen pro Minuten über die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit 50 ml PBS gewaschen (6,5 Tropfen pro min) und anschließend mit 100 mM Glycin pH 2 mit 14 Tropfen pro Minuten

eluiert. Es wurden 6 Fraktion mit je 5 bis 6 ml gesammelt. Um eine neutrale Umgebung zu schaffen, wurden die einzelnen Fraktionen mit 1 M Tris/HCl pH 9 versetzt (auf 10 ml 340 µl Tris/HCl pH 9). Da dieses Eluat weder im ELISA (5.5.3) noch im Zelltest verwendet werden konnte, wurde es über 5 kDa Filter umgepuffert und aufkonzentriert.

### **5.5.3 ‚Enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA)**

Die Anwesenheit von Zytokinen in Proteinfractionen und Zellüberständen wurde mittels ELISA untersucht. Der Nachweis erfolgt photometrisch mit Hilfe von monoklonalen anti-Zytokin Antikörpern und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern nach enzymatischer Umsetzung eines Chromogens. Es gibt zwei verschiedenen ELISA-Verfahren. Bei einem ‚Sandwich-ELISA‘ wurde ein Primärantikörper (in PBS pH 9 titriert) an eine ELISA-Mikrotiterplatte (‚Maxi-Sorp‘, Nunc, Wiesbaden) bei 4°C über Nacht angelagert. Nach der Anlagerung erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit der Blocklösung für mindestens eine Stunde bei 37°C. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C mit einem Zytokin-Standard und der titrierten Probe wurde der Ansatz fünfmal gewaschen und danach mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C mit Streptavidin-Peroxidase. Nach dem letzten Waschgang wurde durch Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) eine Farbentwicklung (blau) bei RT beobachtet. Diese Reaktion wurde mit der Stopplösung gestoppt, wenn der Leerwert anfing, sich zu verfärben. Die Produktmenge wurde über die Extinktion bei 450 nm im Photometer (Rainbow, Tecan) bestimmt.

Bei dem zweiten ELISA-Verfahren handelt es sich um den so genannten ‚Festphasen-ELISA‘. Im Unterschied zum ‚Sandwich-ELISA‘ wurde hier direkt die Proteinfraction an eine ELISA-Mikrotiterplatte in titrierter Konzentration in PBS über Nacht bei 4°C angelagert. Nach der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper. Der weitere Ablauf erfolgte wie beim ‚Sandwich-ELISA‘ beschrieben. Zur Auswertung der ELISA-Daten wurde die Software von Tecan (Easy win fitting) und zur Darstellung ‚Graphpad Prism‘ verwendet (Graphpad Software, SanDiego, USA).

Blocklösung: 4% (w/v) BSA in PBS

Waschlösung: 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS

Stopplösung: 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 5.5.4 Immunfluoreszenzanalysen

Bei dieser Färbemethode werden die Zellkerne mit DAPI und die intrazellulären Toxoplasmen mit anti-Toxoplasma Antikörper inkubiert und die Bindung mit TRITC-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Dabei wurden aus den 24-wells, die die Glasplättchen mit den infizierten Kulturen enthielten, das Medium entfernt und mit 2 ml 4% Paraformaldehyd (in PBS) für zehn bis 20 Minuten fixiert. Die Permeabilisation der Zellen erfolgte danach mit 2 ml 0,25% Triton X-100 (in PBS) für zehn Minuten. Anschließend wurden die Zellen für eine halbe Stunde mit 2 ml 1% (w/v) BSA in PBS geblockt. Für die primäre Färbung wurden 25 µl des biotinylierten anti-*T. gondii* Antikörpers (1: 100) auf Parafilm gegeben, darauf das Glasplättchen plaziert und in einer feuchten Umgebung für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Glasplättchen wieder in ein 24-well überführt und dreimal mit 3 ml PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. Die sekundäre Färbung erfolgte wie die primäre Färbung, nur dass diesmal TRITC-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper (1 : 200 in BSA / PBS) verwendet wurde. Nach dieser Färbung wurde das Glasplättchen viermal mit 3 ml PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. Für die nukleare Färbung wurde bei dem ersten Waschvorgang 2 µl von 2 mg/ml DAPI hinzu gegeben. Die gefärbten Glasplättchen wurden kurz in Wasser getaucht und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Fluoromount gelegt und getrocknet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die DAPI Färbung mit einer Wellenlänge von 365 nm und die anti-*T. gondii* Färbung mit der Wellenlänge 546 nm angeregt.

### 5.5.5 Durchflusszytometrischer Nachweis von Zelloberflächen-Antigenen

Analysen mit dem ‚fluorescence-activated cell sorter‘ (FACS) ermöglichen die Charakterisierung von Zellen durch die Analyse von Oberflächenmoleküle. Dafür werden Oberflächenmoleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und im FACS detektiert. Durch eine Kapillare wird die Zellsuspension vereinzelt, die Zellen passieren nacheinander Laserstrahlen. An den Zellen kommt es zur Lichtstreuung, und die Farbstoffmoleküle, die an die Zelle gebunden sind, werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht. Ersteres liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der markierten monoklonalen Antikörper und damit die Expression der Oberflächenproteine in jeder Zelle.

In dieser Arbeit wurden Dendritische Zellen und B-Zellen analysiert. Dafür wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen (Fa. Sarstedt) mit mindestens  $0,2 \times 10^6$  Zellen pro Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden 8 min mit  $400 \times g$   $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der erste Schritt der Färbung war das Absättigen der Fc-Rezeptoren mit dem Fc-Block, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dazu wurde  $1 \mu\text{l}$  pro Ansatz (in  $25 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen) für 15 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte die Antikörperfärbung, die für mindestens 30 min auf Eis durchgeführt wurde. Wenn diese Antikörper alle mit FITC oder Phycoerythrin (PE) konjugiert waren, war hiermit die Färbung abgeschlossen. Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern wurden nach dem ersten Färbeschritt die Zellen mit  $2 \text{ ml}$  FACS-Puffer gewaschen ( $8 \text{ min}$ ,  $400 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Danach folgte eine mindestens halbstündige Sekundärfärbung mit FITC-, PE- oder APC-gekoppelten Streptavidin. Zum Schluss wurden die Zellen erneut gewaschen und in  $500 \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Kurz vor der Messung wurde zu jeder Probe Propidiumiodid hinzugefügt, um tote Zellen zu markieren. Bei den Messungen wurden nur lebendige Zellen gewertet. Die Analyse der maximal vier Fluoreszenzintensitäten (FITC, PE, APC und Propidiumiodid) wurden mit dem Durchflusszytometer ‚FACScan‘ (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Je Probe wurden die Fluoreszenzsignale von 10000 Zellen detektiert und mit der Cellquest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

FACS-Puffer:        0,1% (w/v) BSA  
                          0,05% (w/v) Na-Azid  
                          in PBS, steril filtriert

## 5.6 Nachweis von Effektormolekülen

### 5.6.1 Stickstoffmonoxid

Die Biosynthese von NO durch Zellen ist über das in den Kulturüberstand freigesetzte  $\text{NO}_2^-$  indirekt nachweisbar (Ding *et al.*, 1988). Der Nachweis des akkumulierten  $\text{NO}_2^-$  erfolgte photometrisch mit Hilfe des Griess-Reagenz und beruht auf der Reduktion des Indikators, der dabei einen violetten Farbstoff ausbildet.

In 96-well-Mikrotiterplatten wurden der Standard  $\text{NaNO}_2$  in einer Verdünnungsreihe von 1 mM bis 0,05  $\mu\text{M}$  und der zu untersuchende Zellüberstand vorgelegt. Je 100  $\mu\text{l}$  Standard, Probe oder Kulturmedium (Leerwert) wurden mit 60  $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz versetzt und die Extinktion im Photometer bei 550 nm gemessen.

Zur Auswertung der Daten wurde die Software von Tecan (Easy win fitting) und zur Darstellung ‚Graphpad Prism‘ verwendet (Graphpad Software, San Diego, USA).

Griess-Reagenz:    2 Teile        2,5% (w/v) Sulfanilamid in 15% HCl  
                          1 Teil        0,1% (w/v) N-1-naphthylethylasediamine in *A. dest.*

Diese beiden Lösungen wurden immer erst kurz vor Gebrauch gemischt.

Die Aktivität der induzierbaren NO-Synthase wurde durch kompetitive Hemmung der NO-Biosynthese mit Hilfe des Substratanalogons  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (NMMA) nachgewiesen. Dazu wurden Infektionsansätze von Makrophagen und Toxoplasmen beziehungsweise Toxoplasmen-Proliferationstests mit NMMA, titriert von 3 bis 1200  $\mu\text{M}$ , versetzt. Messstrecke war die Aufhebung der Toxoplasmastase über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uracil (5.1.2.2).

### 5.6.2 Wasserstoffperoxid

In Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) wird das fluoreszierende Scopoletin durch Wasserstoffperoxid oxidiert und verliert dadurch seine Fluoreszenz (Clifford und Repine, 1984; Root *et al.*, 1975).

3 ml der Probe wurden mit 6  $\mu\text{M}$  Scopoletin gemischt und die Fluoreszenz bestimmt. Danach wurden 1, 5 U HRP hinzugefügt gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Messung mit einem Perkin-Elmer LS-5-Luminescence Spektrometer. Die Messung wurde mit einer Fluoreszenz von 460 nm und der Anregung bei 350 nm durchgeführt. Dabei waren die Emissions- als auch die Anregungsspaltbreiten minimal. Die Differenz der beiden Werte ergeben die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration. Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0 bis 100  $\mu\text{M}$ ) in dem gleichen Lösungsmittel wie die Probe. Der Hintergrund wurde durch Messung von 20  $\mu\text{l}$  DMSO und 10  $\mu\text{l}$  HRP im Lösungsmittel bestimmt.

Lösungen: 30 mM Scopoletin in DMSO  
150 U / ml Meerrettichperoxidase

## 6 Literaturverzeichnis

- Ajioka, J., Fitzpatrick, J., and Reitter, C. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* 01: 1.
- Akbari, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D., and Stockinger, B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189: 169.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. 1998a. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188: 1359.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. 1998b. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 392: 86.
- 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., CR, E. S., 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.*
- Aline, F., Bout, D., and Dimier-Poisson, I. 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect. Immun.* 70: 2368.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature.* 362: 761.
- Austyn, J. M., Kupiec-Weglinski, J. W., Hankins, D. F., and Morris, P. J. 1988. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell- dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J. Exp. Med.* 167: 646.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245.

- Beaman, M. H., Araujo, F. G., and Remington, J. S. 1994. Protective reconstitution of the SCID mouse against reactivation of toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 169: 375.
- Beller, D. I., Springer, T. A., and Schreiber, R. D. 1982. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* 156: 1000.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., and Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 161: 370.
- Bender, A., Bui, L. K., Feldman, M. A., Larsson, M., and Bhardwaj, N. 1995. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J. Exp. Med.* 182: 1663.
- Berchtold, S., Muhl-Zurbes, P., Heufler, C., Winklehner, P., Schuler, G., and Steinkasserer, A. 1999. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett.* 461: 211.
- Bilzer, T., Stavrou, D., Dahme, E., Keiditsch, E., Burrig, K. F., Anzil, A. P., and Wechsler, W. 1991. Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established *in vitro*. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 418: 281.
- Bliss, S. K., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J. Immunol.* 165: 4515.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K., and Howard, J. C. 1998. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* 161: 6715.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., and Heesemann, J. 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* 16: 1221.
- 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.
- Carlow, D. A., Marth, J., Clark-Lewis, I., and Teh, H. S. 1995. Isolation of a gene encoding a developmentally regulated T cell-specific protein with a guanine nucleotide triphosphate-binding motif. *J. Immunol.* 154: 1724.

- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 388: 782.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189: 821.
- Chang, H. R. and Pechère, J. C. 1989. Macrophage oxidative metabolism and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Microb. Pathog.* 7: 37.
- Chao, C. C., Anderson, W. R., Hu, S., Gekker, G., Martella, A., and Peterson, P. K. 1993. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67: 178.
- Clifford, D. P. and Repine, J. E. 1984. Measurement of oxidizing radicals by polymorphonuclear leukocytes. *Methods Enzymol.* 105: 393.
- 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.
- Conrad, D. H., Waldschmidt, T. J., Lee, W. T., Rao, M., Keegan, A. D., Noelle, R. J., Lynch, R. G., and Kehry, M. R. 1987. Effect of B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) on Fc epsilon and Fc gamma receptor expression on murine B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.* 139: 2290.
- Darde, M. L., Bouteille, B., and Pestre-Alexandre, M. 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 551.
- Darde, M. L., Bouteille, B., and Pestre-Alexandre, M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78: 786.
- Däubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., and Hadding, U. 1996. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* 26: 487.
- Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., and Schrotten, H. 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular

- endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 69: 6527.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184: 1413.
- Dimier, I. H. and Bout, D. T. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology.* 94: 488.
- 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.
- Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27: 2417.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157: 541.
- Ferreras, M., Gavilanes, J. G., and Garcia-Segura, J. M. 1993. A permanent Zn<sup>2+</sup> reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 213: 206.
- Finkelman, F. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Holmes, J. M., Boiani, N., Katona, I. M., and Maliszewski, C. R. 1993. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of *in vivo* effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J. Immunol.* 151: 1235.
- Fischer, H. G., Bielinsky, A. K., Nitzgen, B., Daubener, W., and Hadding, U. 1993. Functional dichotomy of mouse microglia developed *in vitro*: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J. Neuroimmunol.* 45: 193.
- 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. and Reichmann, G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 166: 2717.
- Fratazzi, C., Arbeit, R. D., Carini, C., and Remold, H. G. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J. Immunol.* 158: 4320.
- Frenkel, J. K. 1973. Toxoplasma in and around us. *Bio. Science.* 23: 343.
- Freund, Y. R., Zaveri, N. T., and Javitz, H. S. 2001. *In vitro* investigation of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in microglia of BALB/c and CBA/Ca mice. *Infect. Immun.* 69: 765.
- Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H., and Seishima, M. 2002. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 70: 779.
- Gallin, J. I., Goldstein, I. M., and Snyderman, R. 1992. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Raven Press, New York.
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. 1994. Defensins. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 584.
- Gazzinelli, R., 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.
- Gazzinelli, R. T., Eltoun, I., Wynn, T. A., and Sher, A. 1993. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.* 151: 3672.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146: 286.
- 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.

- Gilly, M. and Wall, R. 1992. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J. Immunol.* 148: 3275.
- Goebel, S., Gross, U., and Luder, C. G. 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J. Cell Sci.* 114: 3495.
- Grencis, R. K. and Entwistle, G. M. 1997. Production of an interferon-gamma homologue by an intestinal nematode: functionally significant or interesting artefact? *Parasitology.* 115 Suppl: S101.
- Gross, U., Bohne, W., Luder, C. G., Lugert, R., Seeber, F., Dittrich, C., Pohl, F., and Ferguson, D. J. 1996. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 114S.
- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B., and Wagner, H. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17: 6230.
- Hakansson, S., Charron, A. J., and Sibley, L. D. 2001. Toxoplasma vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20: 3132.
- Halonen, S. K., Taylor, G. A., and Weiss, L. M. 2001. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* 69: 5573.
- Halonen, S. K. and Weiss, L. M. 2000. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect. Immun.* 68: 3426.
- Hartmann, G., Weiner, G. J., and Krieg, A. M. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 9305.
- Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R. A., and Himeno, K. 1997. Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 159: 2375.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561.

- 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.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., and Byrns, R. E. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8103.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.* 178: 479.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, 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.
- Jackson, S. H., Gallin, J. I., and Holland, S. M. 1995. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* 182: 751.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 375: 151.
- Johnson, L. L. 1992. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect. Immun.* 60: 3719.
- Joiner, K. A. and Roos, D. S. 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* 157: 557.
- Kang, H. and Suzuki, Y. 2001. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Infect. Immun.* 69: 2920.
- Kasper, L. H., Currie, K. M., and Bradley, M. S. 1985. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 3426.
- Khan, I. A., Matsuura, T., Fonseka, S., and Kasper, L. H. 1996. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1<sup>-/-</sup> mice. *J. Immunol.* 156: 636.

- Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A., and Issels, R. D. 2001. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* 31: 1602.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.
- Lane, A., Soete, M., Dubremetz, J. F., and Smith, J. E. 1996. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol. Res.* 82: 340.
- Langermans, J. A., Van der Hulst, M. E., Nibbering, P. H., Hiemstra, P. S., Fransen, L., and Van Furth, R. 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 148: 568.
- Larson, R. S. and Springer, T. A. 1990. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114: 181.
- Leenen, P. J., Radosevic, K., Voerman, J. S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: *in vivo* phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* 160: 2166.
- 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.
- Liles, W. C. 1997. Apoptosis - role in infection and inflammation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10: 165.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods.* 223: 77.
- Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G., and Austyn, J. M. 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 30: 1813.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. 1996. A life stage of particle-laden rat dendritic cells *in vivo*: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* 183: 1865.
- Mehlhorn, H. and Walldorf, V. 1988. Life cycles. In: *Parasitology in Focus. Facts and Trends*. Mehlhorn, H. (ed.); Springer Verlag, Berlin: 1.
- Moll, H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today.* 14: 383.
- Morrisette, N. S. and Sibley, L. D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 21.
- Mühlradt, P. F. and Frisch, M. 1994. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect. Immun.* 62: 3801.
- Mühlradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R., and Jung, G. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 185: 1951.
- Mühlradt, P. F., Quentmeier, H., and Schmitt, E. 1991. Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect. Immun.* 59: 3962.
- Mühlradt, P. F. and Schade, U. 1991. MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to *in vitro* interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect. Immun.* 59: 3969.
- Murray, H. W. and Cohn, Z. A. 1979. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150: 938.
- Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M., and Jaffee, E. A. 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 1982.
- 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.

- Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Jr., Gu, H., and Paul, W. E. 1997. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 10838.
- Noelle, R., Krammer, P. H., Ohara, J., Uhr, J. W., and Vitetta, E. S. 1984. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 6149.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007.
- Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., Camus, D., and Dubremetz, J. F. 1996. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82: 237.
- Orlowsky, A., Somogyi, R. D., Weiss, L. M., and Prysowsky, M. B. 1999. The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J. Immunol.* 163: 412.
- Pamer, E. and Cresswell, P. 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 323.
- Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., and Remington, J. S. 1994. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66: 283.
- Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C. 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* 24: 449.
- Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 388: 787.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 18: 307.
- Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. 1999. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today*. 20: 200.

- Roos, D. S., Donald, R. G., Morrisette, N. S., and Moulton, A. L. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* 45: 27.
- Root, R. K., Metcalf, J., Oshino, N., and Chance, B. 1975. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* 55: 945.
- Ruschmeyer, D., Thude, H., and Mühlradt, P. F. 1993. MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7: 223.
- 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. *Journal of the National Cancer Institute.* 9: 229.
- 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., 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.
- Schmitt, E., Fassbender, B., Beyreuther, K., Spaeth, E., Schwarzkopf, R., and Rude, E. 1987. Characterization of a T cell-derived lymphokine that acts synergistically with IL 3 on the growth of murine mast cells and is identical with IL 4. *Immunobiology.* 174: 406.
- Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S., and Gazzinelli, R. T. 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires

- both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 150: 3982.
- Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82.
- Silva, N. M., Rodrigues, C. V., Santoro, M. M., Reis, L. F., Alvarez-Leite, J. I., and Gazzinelli, R. T. 2002. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.* 70: 859.
- Smith, J. E. 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25: 1301.
- Sorace, J. M., Johnson, R. J., Howard, D. L., and Drysdale, B. E. 1995. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J. Leukoc. Biol.* 58: 477.
- 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.
- 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.
- Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K. 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156: 25.
- Stryer, L. 1994. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 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.
- Suzuki, Y. 2002. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 2: S234.
- Suzuki, Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. 1989. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol.* 143: 2045.

- Suzuki, Y. and Remington, J. S. 1988. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. *J. Immunol.* 140: 3943.
- Taylor, G. A., Collazo, C. M., Yap, G. S., Nguyen, K., Gregorio, T. A., Taylor, L. S., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E. A., Reid, S. W., Tessarollo, 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. Sci. USA.* 97: 751.
- Taylor, G. A., Jeffers, M., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Woude, G. F. 1996. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* 271: 20399.
- Taylor, G. A., Stauber, R., Rulong, S., Hudson, E., Pei, V., Pavlakis, G. N., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. 1997. The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J. Biol. Chem.* 272: 10639.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251.
- Turco, J. and Winkler, H. H. 1986. Gamma-interferon-induced inhibition of the growth of *Rickettsia prowazekii* in fibroblasts cannot be explained by the degradation of tryptophan or other amino acids. *Infect. Immun.* 53: 38.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D. J., Ardavin, C. F., Wu, L., and Shortman, K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176: 47.
- Waldschmidt, T. J., Conrad, D. H., and Lynch, R. G. 1989. Expression of B cell surface receptors. II. IL-4 can accelerate the developmental expression of the murine B cell IgE Fc receptor. *J. Immunol.* 143: 2820.
- Weiss, L. M. and Kim, K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 5: D391.
- Williams, G. T. 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* 2: 463.

- Wilson, C. B. and Remington, J. S. 1979. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 140: 890.
- Winser, J., Verlinde, J. D., Van Thiel, P. H., Davel, J., and Van der Elst, P. 1948. Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of living infant in holland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67: 292.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185: 317.
- Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184: 903.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 286: 525.
- 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. S., Scharton-Kersten, T., Charest, H., and Sher, A. 1998. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase *in vivo*. *J. Immunol.* 160: 1340.
- Yung, Y. P. and Moore, M. A. 1985. Mast-cell growth factor: its role in mast-cell differentiation, proliferation, and maturation. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 10: 147.
- Zal, T., Volkmann, A., and Stockinger, B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180: 2089.
- Zhou, L. J., Schwarting, R., Smith, H. M., and Tedder, T. F. 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* 149: 735.

Zhou, L. J. and Tedder, T. F. 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 2588.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

-/-	,knock out'
A	Adenosin
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260nm
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	,bradyzoite antigen'
BMDC	,bone marrow dendritic cells'
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	,cluster of differentiation'
CCR	,cystein-cystein-chemokine receptor'
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	,counts per minute'
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorid hydrate
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytodintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyriobnuklease
dNTP	Desoxynukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	,enzyme linked immunosorbent assay'
ESI-MS/MS	,electro spray ionization tandem mass spectrometry'
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	,fluorescence-activated cell sorter'
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GRA	,dense granule'

GM-CSF	'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor'
GSCN	Guanidinium-Isothiocyanat
GTP	Guanosintetraphosphat
h	Stunde(n)
HPLC	'high performance liquid chromatography'
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
hu	human
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IGTP	induzierbares GTP-bindendes Protein
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco's Medium
IPG	immobilisierter pH-Gradient
k	Kilo ( $10^3$ )
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	'magnetic cell sorting'
MAG	'matrix antigen'
MHC	'major histocompatibility complex'
min	Minute
mm	Millimeter
mu	murin
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD <sub>450</sub>	Optische Dichte 450 nm
p	Pico ( $10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	'phosphate buffered saline'
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PV	parasitophore Vakuole
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	'rounds per minute'
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAG	'surface antigen'
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin
t	Zeit
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TBE	Tris Borat EDTA
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

---

TL	Toxoplasma-Lysat
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (Enzymeinheit)
U	Uridin
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	‚volume per volume‘
W	Watt
WDT	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG.
w/v	‚weight per volume‘
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Fischer für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung sowie seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Wagner danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich Heine-Universität.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer möchte ich dafür danken, dass ich die letzten drei Jahre in einem sehr guten Arbeitsklima verbringen konnte.

Weiterhin danke ich auch den anderen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie für die gute Zusammenarbeit und den einen oder anderen guten Rat.

Für die Einführung in die Kunst der Immunoaffinitätschromatographie möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Edgar Schmitt aus Mainz ganz herzlich bedanken.

Ein herzlicher Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. med. U. Hadding, dessen großzügige Unterstützung zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonders danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors, ohne deren Unterstützung und Rücksicht diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gebührt Martin Gastens, der viel Geduld und Verständnis für mich aufgebracht hat und ein steter Rückhalt war, auf den ich mich immer verlassen konnte.

### **7.3 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 01. Mai 2003