



# **Immunologische Bedeutung der sekretorischen Antigene von *Toxoplasma gondii* als Zielstrukturen für die B- und T-Zellantwort**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Julia Nau**

aus Wiesbaden

Düsseldorf, Juni 2015

aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Walter Däubener  
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2015

Für Mama

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Eidesstattliche Erklärung .....	XI
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Der Parasit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	1
1.1.1. Lebenszyklus.....	1
1.1.2. Übertragungswege und globale Verbreitung von <i>T. gondii</i> .....	3
1.2. Sekretorische Organellen und Proteine von <i>T. gondii</i> .....	4
1.2.1. Mikronemen und Mikronemen Proteine .....	4
1.2.2. Rhoptrien und Rhoptrien Proteine.....	4
1.2.3. Dichte Granula und Dichte Granula Proteine.....	5
1.3. Typische und atypische <i>T. gondii</i> Stämme .....	7
1.3.1. Klonale <i>T. gondii</i> Stämme.....	7
1.3.2. <i>T. gondii</i> Virulenzfaktoren.....	7
1.3.3. Atypische <i>T. gondii</i> Stämme.....	8
1.4. Das Immunsystem .....	9
1.4.1. Die angeborene Immunität .....	10
1.4.2. Die adaptive Immunität.....	10
1.5. Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i> .....	11
1.5.1. Angeborene Immunität gegen <i>T. gondii</i> .....	12
1.5.2. Adaptive Immunität gegen <i>T. gondii</i> .....	12
1.6. IFN $\gamma$ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen <i>T. gondii</i> .....	14
1.6.1. Induktion der Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO).....	15
1.6.2. Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) .....	15
1.6.3. IFN $\gamma$ -induzierbare IRGs und GBPs .....	16
1.7. Humane Toxoplasmose .....	17
1.7.1. Postnatale Toxoplasmose .....	17
1.7.2. Kongenitale Toxoplasmose .....	18
1.8. Diagnose einer <i>T. gondii</i> Infektion .....	19
1.9. Zielsetzung der Arbeit .....	20

---

<b>2. Material</b> .....	22
2.1. Verbrauchsmaterial.....	22
2.2. Chemikalien.....	22
2.3. Medien und Puffer .....	24
2.4. Enzyme .....	25
2.5. Zytokine.....	25
2.6. Antikörper .....	25
2.7. Kits.....	25
2.8. Zell-Linien .....	25
2.9. Parasiten Stämme .....	26
2.10. Versuchstiere .....	26
2.11 Geräte.....	26
<b>3. Methoden</b> .....	28
3.1. Zellkulturmethoden.....	28
3.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut .....	28
3.1.2. Aufreinigung von murinen Milz-Zellen.....	28
3.1.3. Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten .....	29
3.1.4. Kultivierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC).....	29
3.1.5. Kultivierung von porcinen epithelialen Zellen (PCP-R Zellen).....	29
3.1.6. Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
3.1.7. Einfrieren und Auftauen von Zellen/Parasiten .....	30
3.1.8. Induktion der proliferativen T-Zellantwort durch TLA bzw. rAG (Zell-Proliferationsassays) .....	30
3.1.9. Analyse der Immunsuppression in murinen Milz-Zellkulturen.....	30
3.1.9.1. Generierung von murinen Milz-Zellüberständen.....	31
3.1.10. Nachweis/Quantifizierung der Zell-Proliferation .....	31
3.1.11. Generieren von Zellkulturüberständen.....	32
3.1.12. Stimulation von HFF und PCP-R Zellen mit anschließender <i>T. gondii</i> Infektion.....	32
3.1.13. Antagonisierung IDO-vermittelter Effekte .....	33
3.1.14. Quantitativer Nachweis der <i>T. gondii</i> -Proliferation.....	33
3.2. Proteinbiochemische Methoden.....	33
3.2.1. Bestimmung der IDO-Aktivität nach Ehrlich (Kynurenin-Messung).....	33
3.2.2. Herstellung von Toxoplasma Lysat Antigen (TLA).....	34
3.2.3. Denaturierende Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> .....	34
3.2.4. Trichloressigsäure-Fällung der isolierten Proteinen .....	35
3.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35

---

3.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	36
3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein Assay.....	36
3.2.8. Immunfluoreszenzanalyse.....	36
3.2.9. Line blot-Analysen.....	37
3.2.10. Diagnose der <i>T. gondii</i> Infektion humaner Blutspender .....	38
3.3. Immunologische Methoden .....	38
3.3.1. Immunmarkierung und Durchflusszytometrie (FACS) .....	38
3.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	39
3.3.3. Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot-Assay) .....	40
3.4. Tierversuche .....	41
3.4.1. Mäuse .....	41
3.4.2. Schweine .....	41
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1. Analyse der immunologischen Relevanz sekretorischer <i>T. gondii</i> Antigene als Zielstrukturen für die humane T- und B-Zellantwort.....	42
4.1.1. Analyse der Relevanz sekretorischer <i>T. gondii</i> Antigene als Zielstrukturen für die humane T-Zellantwort durch Proliferationsassays .....	42
4.1.2. Nachweis der <i>T. gondii</i> -spezifischen T-Zell-Aktivierung durch Nachweis der IFN $\gamma$ Produktion.....	49
4.1.3. Protektiver Effekt des T-Zellüberstandes gegenüber <i>Toxoplasma gondii</i> .....	53
4.2. Analyse der immunologischen Relevanz sekretorischer <i>T. gondii</i> Antigene als Zielstrukturen für die T-Zellantwort in experimentell infizierten Schweinen .....	56
4.2.1. Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch Proliferationsassays .....	57
4.2.2. Nachweis der Toxoplasmen-Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung anhand der IFN $\gamma$ Produktion.....	59
4.2.3. Antiparasitärer Effekt des nativen IFN $\gamma$ im PBMC-Überstand infizierter Schweine .....	60
4.3. Analyse der Toxoplasmen-Antigen-spezifischen T-Zellantwort im Mausmodell.....	65
4.3.1. Nachweis <i>T. gondii</i> -spezifischer T-Zellen in Proliferationsassays .....	66
4.3.2. Antiparasitärer Effekt von IFN $\gamma$ auf unterschiedliche <i>T. gondii</i> Stämme in murinen Zellen.....	72
4.3.3. Infektion von BALB/c Mäusen mit dem atypischen, hoch virulenten <i>T. gondii</i> Stamm B6H6 .....	75
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>78</b>
5.1. Sekretorische <i>T. gondii</i> Antigene als Zielstrukturen für die humane T-Zellantwort.....	78
5.2. Das T-Zell-Produkt (IFN $\gamma$ ) vermittelt protektive Effekte gegenüber <i>Toxoplasma gondii</i> .....	85
5.3. Sekretorische <i>T. gondii</i> Antigene als Zielstrukturen für die porcine T-Zellantwort.....	88

---

5.4. Das von Toxoplasmen-Antigen-spezifischen, porcinen T-Zellen produzierte IFN $\gamma$ induziert antiparasitäre Effekte.....	92
5.5. <i>In vitro</i> T-Zellsuppression als Konsequenz einer <i>T. gondii</i> Infektion in Mäusen .....	93
5.6. Toxoplasmen-Antigen-abhängige T-Zellantwort im Mausmodell.....	94
5.7. IFN $\gamma$ induziert eine <i>T. gondii</i> Typ-spezifische, GTPasen-vermittelte Abwehr in murinen Zellen .....	95
5.8 Induktion einer protektiven Immunität gegen <i>T. gondii</i> Typ-Stämme: Kreuzimmunität gegen atypische <i>T. gondii</i> Stämme? .....	98
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>102</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
<b>Abbildung 1.2:</b> Organellen von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	6
<b>Abbildung 1.3:</b> Zelluläre Quellen von IFN $\gamma$ während der Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	13
<b>Abbildung 1.4:</b> Effektormechanismen der IFN $\gamma$ -vermittelten Eliminierung von <i>T. gondii</i> in infizierten Zellen.....	17
<b>Abbildung 4.1:</b> Aktivierbarkeit spezifischer T-Zellen mit Toxoplasma Lysat Antigen (TLA).....	42
<b>Abbildung 4.2:</b> TLA-spezifische Proliferation in Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender. ....	43
<b>Abbildung 4.3:</b> Zell-Proliferation seropositiver Spender nach Stimulation mit Tachyzoiten Lysaten verschiedener <i>T. gondii</i> Stämme.....	44
<b>Abbildung 4.4:</b> Proliferation seropositiver und seronegativer Spender nach Stimulation mit rAG von <i>T. gondii</i> .....	45
<b>Abbildung 4.5:</b> Bewertung der rAG-spezifischen T-Zell-Reaktivität seropositiver Spender anhand individueller cut-off-Werte. ....	46
<b>Abbildung 4.6:</b> Anzahl der erkannten rekombinanten Antigene in Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender. ....	47
<b>Abbildung 4.7:</b> Präsenz von IgG Antikörpern gegen rekombinante <i>T. gondii</i> Antigene im Serum infizierter Spender.....	48
<b>Abbildung 4.8:</b> Exemplarische photographische Aufnahme eines ELISpots. ....	50
<b>Abbildung 4.9:</b> Gating Strategie zur durchflusszytometrischen Detektion aktivierter, IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen.....	51
<b>Abbildung 4.10:</b> Expression von CD40L und IFN $\gamma$ Produktion nach Stimulation mit Toxoplasmen-Antigen. ....	52
<b>Abbildung 4.11:</b> Vergleichende Darstellung der Frequenz aktivierter, IFN $\gamma$ -produzierender Zellen eines seronegativen und eines seropositiven Spenders.....	53
<b>Abbildung 4.12:</b> Kynurenin Produktion und Parasiten-Wachstum in HFF bei Kultivierung in Anwesenheit von PBMC-ÜS. ....	54
<b>Abbildung 4.13:</b> Kynurenin Produktion in HFF nach Stimulation mit rh IFN $\gamma$ . ....	55
<b>Abbildung 4.14:</b> IFN $\gamma$ -vermittelte Hemmung des Wachstums unterschiedlicher <i>T. gondii</i> Stämme in HFF.....	55
<b>Abbildung 4.15:</b> TLA-spezifische Proliferation in Zellkulturen infizierter und nicht infizierter Schweine. ....	57
<b>Abbildung 4.16:</b> TLA-spezifische Proliferation porciner PBMC im Verlauf einer experimentellen <i>T. gondii</i> Infektion. ....	58
<b>Abbildung 4.17:</b> AG-spezifische Proliferation experimentell infizierter und nicht infizierter Schweine. ....	59

---

<b>Abbildung 4.18:</b> TLA- bzw. GRA1-induzierte IFN $\gamma$ Produktion in Zellkulturen infizierter und nicht infizierter Schweine.....	60
<b>Abbildung 4.19:</b> IFN $\gamma$ -vermittelte Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen.....	61
<b>Abbildung 4.20:</b> IFN $\gamma$ -induzierte Hemmung des <i>T. gondii</i> -Wachstums in PCP-R Zellen.....	62
<b>Abbildung 4.21:</b> Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen bei Kultivierung in Anwesenheit von PBMC-Überständen (TLA). ....	63
<b>Abbildung 4.22:</b> Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen bei Kultivierung in Überständen von <i>T. gondii</i> rAG-stimulierten PBMC-Kulturen.....	64
<b>Abbildung 4.23:</b> Antiparasitärer Effekt der Überstände TLA-stimulierter PBMC infizierter Schweine in PCP-R Zellen. ....	64
<b>Abbildung 4.24:</b> ConA-, TLA- und GRA1-abhängige Proliferation in Milz-Zellkulturen infizierter Mäuse.....	66
<b>Abbildung 4.25:</b> ConA-vermittelte Zell-Proliferation in Kulturen von Milz-Zellen naiver und infizierter Tiere.....	68
<b>Abbildung 4.26:</b> ConA-vermittelte Zell-Proliferation in Milz-Zellkulturen naiver Tiere in An- und Abwesenheit verschiedener Zell-Kulturüberstände. ....	70
<b>Abbildung 4.27:</b> TLA-induzierte IFN $\gamma$ Produktion in murinen Milz-Zellkulturen im Verlauf einer <i>T. gondii</i> Infektion. ....	71
<b>Abbildung 4.28:</b> Lokalisation von mGBP2 in mMSC nach Infektion mit <i>T. gondii</i> Typ I und Typ II..	73
<b>Abbildung 4.29:</b> Quantifizierung der mGBP2-Rekrutierung zur PV unterschiedlicher <i>T. gondii</i> Stämme. ....	74
<b>Abbildung 4.30:</b> Überlebenskurven der BALB/c Mäuse in verschiedenen Infektionsstudien mit unterschiedlich virulenten Toxoplasmen.....	76

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.1:</b> Stamm-spezifische Virulenzfaktoren und ihre Auswirkungen auf die murine Immunantwort .....	8
<b>Tabelle 1.2:</b> Stamm-spezifische Variante von UPS-ROP18 und Virulenz in Balb/c Mäusen.....	9
<b>Tabelle 4.1:</b> Präsenz (+) und Absenz (-) spezifischer T-Zellen in Zellkulturen seropositiver Spender .....	46
<b>Tabelle 4.2:</b> Präsenz (+) und Absenz (-) reaktiver T-Zellen (TZ) und IgG Antikörper (AK) gegen rAG von <i>T. gondii</i> .....	48
<b>Tabelle 4.3:</b> Quantifizierung IL-4 und IFN $\gamma$ positiver Zellen.....	50
<b>Tabelle 5.1:</b> Stamm-spezifische Variante von UPS-ROP18, Virulenz in Balb/c Mäusen und Rekrutierungsverhalten von mGBP2 an die PV des jeweiligen Parasiten.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
%	Prozent
<	kleiner
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich
°C	Grad Celsius
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
APZ	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAG1	Bradyzoiten Antigen 1
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indoly-Phosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
ca	circa
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cmp	counts per minute
ConA	Concanavalin A
CTL	zytotoxische T-Zelle
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISpot-Assay	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
ESAs	excreted secreted antigens
et al	et alii, und andere
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Scann
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärts-Streulicht
GBP	Guanylat-bindende Proteine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRA	Dichte Granula Protein
h	human
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
His-Tag	Histidin-Marker
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSV	Herpes Simplex Virus
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase

IDO <sup>-/-</sup>	IDO-defizient
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbaren Nitric Oxide Synthase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRG	Immune Related GTPasen
K	Kontrolle
kBq	Kilobecquerel
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LD100	Letale Dosis an der 100% der Tiere versterben
m	murin
MAT	modifizierten Agglutinations-Test
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	Mikronemen Protein
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mMSC	Murine mesenchymale Stammzellen
MNN	membranöses nanotubuläres Netzwerk
MYD88	myeloid differentiation factor 88
n	Anzahl
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NCBI	National Center für Biotechnology Information
NF-κB	nuklearer Faktor-κB
ng	Nanogramm
NGS	Ziege-Normal Serum
Ni-NTA	Nickel-NTA
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p	porcin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Periphere Blut Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCP-R Zellen	porcine epitheliale Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PermWash	Permeabilization Wash Buffer
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern Recognition Receptors
PV	parasitophore Vakuole
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
rAG	rekombinantes Antigen
RNS	Ribonukleinsäure
ROP	Rhoprien Protein

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SAG1	Surface Antigen 1
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEB	Staphylokokkus Enterotoxin B
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
sero <sup>-</sup>	seronegativ
sero <sup>+</sup>	seropositiv
SSC	Seitwärts-Streulicht
ST-Ag	soluble toxoplasma antigen
STAT	signal transducer and activator of transcription
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLA	Toxoplasma Lysat Antigen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Temperatur sensitiv
TZ	T-Zelle
ü.N.	über Nacht
UPS-ROP18	upstream von ROP18 codierenden Sequenz
ÜS	Überstand
V	Volt
v.l.	vor Infektion
ViaFs	Viabilitätsfarbstoff
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
μg	Mikrogramm
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
IRF-1	Interferon-regulierender Faktor-1
1MT	1-Methyl-Tryptophan
<sup>3</sup> HT	radioaktiv markiertes Thymidin
<sup>3</sup> HU	radioaktiv markiertes Uracil

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, Juni 2015 \_\_\_\_\_

Julia Nau

## 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Immunabwehr gegen den obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii*. Im Folgenden soll deshalb ein Überblick über die, für die Arbeit relevanten Mechanismen des Immunsystems gegeben werden, außerdem wird der Parasit und seine klinische Relevanz vorgestellt.

### 1.1. Der Parasit *Toxoplasma gondii*

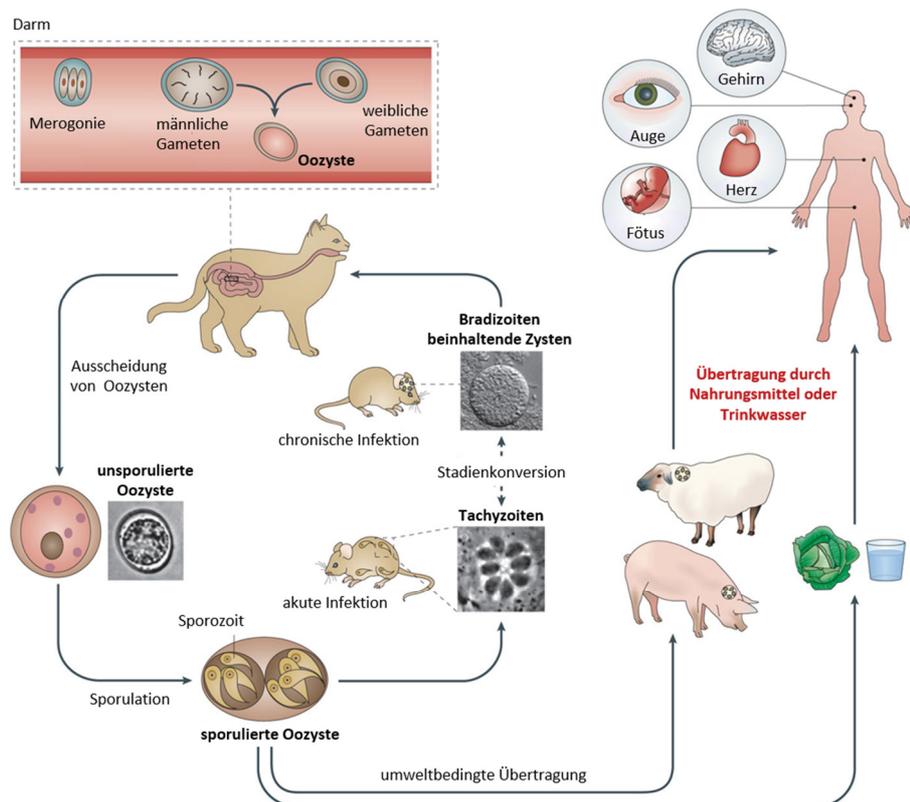
*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der erstmals 1908 beschrieben wurde. Er erhielt seinen Namen aufgrund der gebogenen Form (*toxon*, griechisch= Bogen; *plasma*, griechisch= Form) und dem Nagetier *Ctenodactylus gundi*, in dem er zuerst entdeckt wurde (Frenkel, 1970). Taxonomisch kann *T. gondii* innerhalb der Protozoen dem Stamm der Apicomplexa zugeordnet werden. Zu den Vertretern dieses Stammes zählt beispielsweise auch der humanpathogene Erreger der Malaria, *Plasmodium falciparum*. Namensgebend für den Stamm der Apicomplexa ist eine einzigartige Struktur, der Apikalkomplex, den alle Einzeller innerhalb dieses Phylums besitzen. Er besteht aus einem komplexen mikrotubulären Element, dem Conoid und verschiedenen sekretorischen Organellen. Diese Elemente sind an der Invasion in die Wirtszelle beteiligt und ermöglichen das Etablieren einer parasitophoren Vakuole in der sich der Parasit entwickeln und vermehren kann (Dubey et al., 1998). *Toxoplasma gondii* kann im Stamm der Apicomplexa weiter der Unterklasse der zystenbildenden Coccidien und der Unterordnung der Eimeria zugeordnet werden. Zu dieser Unterordnung gehören auch die humanpathogenen Parasiten *Isospora belli*, *Isospora natalensis* und *Cryptosporidium parvum*, die beim Menschen starke Diarrhoe auslösen können. Außerdem befindet sich in der Unterordnung der Eimeria der tierpathogenen Erreger *Neospora caninum*, welcher der häufigste Verursacher von Aborten bei Rindern ist (Beck et al., 2009).

#### 1.1.1. Lebenszyklus

Der Parasit *Toxoplasma gondii* durchläuft während seines Lebenszyklus verschiedene Stadien (Abbildung 1.1). Die sexuelle Vermehrung findet ausschließlich im Endwirt, der Hauskatze und andere Mitgliedern der Familie der *Felidae* statt (Frenkel, 1970). Nach der oralen Aufnahme von *T. gondii* Zysten, welche sich im Gewebe infizierter Beutetiere befinden, wird die Zysten-Wand durch proteolytische Enzyme im Magen und Dünndarm der Katze aufgelöst und die darin befindlichen Bradyzoiten entlassen. Diese dringen dann in die Epithelzellen des Dünndarms ein und entwickeln sich hier zu fünf morphologisch verschiedenen Stadien. Nach der Replikation dieser Parasiten (Merogonie) kommt es zur Differenzierung in weibliche und männliche Gameten (Gametogonie). Die Verschmelzung der Gameten führt zur Bildung einer diploiden Oozyste. Nach dem Aufplatzen der infizierten Darmepithelzelle wird diese unsporulierte Oozyste in das Dünndarm-Lumen freigesetzt und mit dem Fäzes des Endwirtes in die Umwelt ausgeschieden. *T. gondii* Oozysten sind sehr widerstandsfähig und bleiben in feuchter Umgebung bei Temperaturen zwischen 0 und 45°C über einen langen Zeitraum intakt. Abhängig von Temperatur und Sauerstoffsättigung beginnt die Sporulation der Oozysten ein bis fünf Tage nach der Exkretion und resultiert in der Bildung von zwei Sporoblasten mit je vier hochinfektiösen haploiden Sporozoiten. Die sporulierten Oozysten können dann oral, über kontaminierte Nahrung, Trinkwasser oder Erde von zahlreichen Zwischenwirten

aufgenommen werden. Im Darm des Zwischenwirtes werden die acht Sporozoiten aus der Oozyste freigesetzt und entwickeln sich zu Tachyzoiten, die sich durch schnelle Replikation auszeichnen. Tachyzoiten dringen aktiv in die Zellen des Darmepithels ein (Dobrowolski und Sibley, 1996) und befinden sich nach der Invasion in einer parasitophoren Vakuole, welche den Parasiten vor dem endolysosomalen System der Wirtszelle schützt (Suss-Toby et al., 1996). Während der akuten Phase der Infektion vermehren sich die Tachyzoiten innerhalb der parasitophoren Vakuole rasant und die Wirtszelle zerreißt, wenn sie nicht mehr genug Platz für die steigende Anzahl an Parasiten bietet. Die Tachyzoiten werden in großer Zahl freigesetzt, können das Darmepithel durchdringen und gelangen über den Blutstrom und das lymphatische System in alle Organe des Zwischenwirts. Tachyzoiten können sich in nahezu allen Zellen des Körpers vervielfältigen, jedoch sind in der akuten Phase der Infektion besonders die Leber und die Lunge von der Invasion betroffen (Frenkel, 1988). Um sich der Immunantwort zu entziehen, die im Fortschritt der akuten Infektion vom Wirtsorganismus initiiert wird, differenzieren die Tachyzoiten im Rahmen einer Stadienkonversion zu Bradyzoiten. Diese zeichnen sich durch langsame Replikation, einen verminderten Metabolismus und das Vorliegen in einer Zystenhlle aus. Sie sind verantwortlich für die Manifestation der chronischen Infektionsphase. Durch die Vermehrung der Bradyzoiten wächst die Zyste an und kann je nach Alter und Gewebe mehrere hundert Parasiten beinhalten. Intakte Zysten induzieren keine inflammatorische Immunantwort und können über die gesamte Lebensdauer des Wirtes im Gewebe persistieren ohne klinische Symptome zu verursachen.

Nimmt der Endwirt oral Gewebezysten auf, die sich im Fleisch von Beutetieren befinden, schließt sich der Zyklus und ein neuer Infektionskreislauf wird initiiert. Menschen können sich zum einen durch den Verzehr von rohem oder ungarischem Fleisch, welches *T. gondii* Gewebezysten enthält, infizieren. Zum anderen stellen sporulierte Oozysten in der Umwelt, beispielsweise in Trinkwasser, Erde und Nahrungsmitteln eine zweite wichtige Infektionsquelle dar.



**Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*.** Modifiziert nach Hunter und Sibley 2012. Die Vermehrung des Parasiten unterteilt sich in eine sexuelle und eine asexuelle Phase. Die sexuelle Replikation findet ausschließlich im Endwirt, der Katze, statt. Die dabei entstehenden Oozysten werden mit dem Fäzes als unsporulierte Oozysten in die Umwelt ausgeschieden und durchlaufen hier den Prozess der Sporulation. Die sporulierten Oozysten können dann oral durch kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser von diversen Zwischenwirten, einschließlich Nutztieren, aufgenommen werden. Kurz nach der oralen Aufnahme entwickeln sich die Sporozysten der Oozysten zu schnell replizierenden Tachyzoiten, die sich im Zwischenwirt ungeschlechtlich vermehren. Diese asexuelle Vermehrung des Parasiten kennzeichnet die akute Phase der Infektion. Darauf folgt die Stadikonversion des Parasiten, welche durch die Bildung und Persistenz von Zysten charakterisiert ist und die chronische Infektionsphase darstellt. Der Verzehr von *T. gondii* infizierten Beutetieren durch die Katze schließt den Zyklus. Menschen können sich zum einen durch den Verzehr von ungekochtem Fleisch, welches Gewebezysten enthält infizieren. Zum anderen stellen sporulierte Oozysten in der Umwelt und im Trinkwasser Infektionsquellen dar. Eine Erstinfektion während der Schwangerschaft kann zur kongenitalen Übertragung auf den Fötus und zu Fehlbildungen und Fehlgeburten führen. In immunsupprimierten Patienten kann eine, von Zysten ausgehende Reaktivierungstoxoplasmose zu einer Enzephalitis, Pneumonie oder Myokarditis führen.

### 1.1.2. Übertragungswege und globale Verbreitung von *T. gondii*

Aufgrund seines extrem breiten Wirtsspektrums ist *T. gondii* einer der weltweit am häufigsten vorkommenden Parasiten und kann nahezu alle warmblütigen Vertebraten, einschließlich Haustiere und Nutztiere infizieren. Die Infektion dieser Zwischenwirte erfolgt über die orale Aufnahme von *T. gondii* Oozysten, die ausschließlich von Katzen und katzenartigen Raubtieren (Feliden) ausgeschieden werden. Die Rate infizierter Tiere unter den wildlebenden Vertretern der Familie der *Felidae* ist mit bis zu 100% sehr hoch, während die globale Seroprävalenz von *T. gondii* in Hauskatzen zwischen 30 und 40% liegt (Elmore et al., 2010). Menschen können sich ebenfalls über die orale Aufnahme der Oozysten aus der Umwelt infizieren. Risikofaktoren für eine Infektion mit *T. gondii* Oozysten sind dabei beispielsweise das Spielen in Sandkästen und auf Spielplätzen (dos Santos et al., 2010), Kontakt mit Erde und Gärtnern bzw. Farmarbeit ohne Handschuhe (Cook et al., 2000), kontaminiertes (Trink-) Wasser (Karanis et al., 2013) sowie der Verzehr von

ungenügend gewaschenem Gemüse und Obst (Kapperud et al., 1996). Eine der wichtigsten Infektionsquellen für Menschen stellt jedoch die Präsenz von *T. gondii* Zysten im Fleisch von Nutztieren und der Konsum von rohem oder ungarem Fleisch dar (Schlüter et al., 2014). Die Prävalenz von *T. gondii* Gewebezysten unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Spezies und weist außerdem große regionale Schwankungen auf. In Deutschland wurde 2003 eine relativ hohe *T. gondii* Seroprävalenz von 20,3% in Schweinen beobachtet, die bis zum Jahr 2008 auf 4,1% sank (Dubey, 2009). Bei Geflügel lag die Prävalenz 2011 bei 20,2% für Truthähne (Koethe et al., 2011), 5,7% für Enten und 25,2% für Gänse (Maksimov et al., 2011). Schätzungen nach ist ein Drittel der humanen Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert, wobei starke regionale, geographische und ethnische Schwankungen zu verzeichnen sind. Während die Infektionsrate bei Menschen in feuchtwarmen und heißen Regionen der Erde, beispielsweise Westafrika und Südamerika bei bis zu 80% liegt, sind in den gemäßigten Klimazonen wie Zentraleuropa (einschließlich Deutschland) etwa 40-60% der Bevölkerung mit *T. gondii* infiziert. In den kälteren skandinavischen Ländern liegt die Infektionsrate dagegen bei nur ca. 30% (Tenter et al., 2000).

## **1.2. Sekretorische Organellen und Proteine von *T. gondii***

Der Parasit *Toxoplasma gondii* besitzt drei einzigartige, funktionell unterschiedliche sekretorische Organellen, die Mikronemen, die Rhoptrien und die Dichte Granula, die eine Vielzahl verschiedener Proteine enthalten (Abbildung 1.2). Diese Proteine ermöglichen dem Parasiten die Invasion in die Wirtszelle, die Etablierung einer parasitophoren Vakuole, das Überleben darin sowie die Evasion von *T. gondii* aus der Wirtszelle (Baum et al., 2006).

### **1.2.1. Mikronemen und Mikronemen Proteine**

Die Mikronemen sind längliche Organellen, die vor allem am apikalen Pol des Parasiten lokalisiert sind. Sie sind die ersten sekretorischen Organellen, die bei der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle ihren Inhalt, die Mikronemen Proteine (MIC Proteine) freisetzen. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass MIC Proteine während der Invasion von *T. gondii* die Adhäsion zwischen dem Parasiten und der Wirtszellmembran vermitteln (Lovett et al., 2002). Des Weiteren ermöglichen die MIC Proteine dem Parasiten ein Substrat-abhängiges Gleiten auf der Oberfläche von Wirtszellen (Sibley et al., 1998).

### **1.2.2. Rhoptrien und Rhoptrien Proteine**

Die Rhoptrien besitzen eine lang gezogene, keulenähnliche Form und sind ausschließlich am apikalen Pol des Parasiten zu finden. Sie enthalten die Rhoptrien Proteine (ROP Proteine), die sowohl für die Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle wichtig sind, als auch für dessen Überleben innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Einige ROP Proteine werden unmittelbar nachdem eine feste Verbindung zwischen dem Parasit und der Wirtszelle vorhanden ist ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert (Carruthers und Sibley, 1997), andere binden an die Membran der parasitophoren Vakuole. ROP Proteine sind essentiell für die Etablierung und den Fortbestand der parasitophoren Vakuole während der Infektion (Bradley und Sibley, 2007). So können beispielsweise Subtypen von ROP18 und ROP5 den antiparasitären Effektormechanismus der „Immune Related“ GTPasen (IRGs) und der Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) aufheben (Degrandi et al., 2007; Khaminets et al., 2010; Martens et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt

werden, dass ROP16 mit „Signal transducer and activator of transcription“ 3 (STAT3) und „Signal transducer and activator of transcription“ 6 (STAT6) wechselwirken kann und so Signalwege in der Wirtszelle manipuliert (Ong et al., 2010; Yamamoto et al., 2009).

### 1.2.3. Dichte Granula und Dichte Granula Proteine

Die Dichte Granula sind kugelförmige Organellen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm, die von einer Membran begrenzt sind und gleichmäßig verteilt auf beiden Seiten des Nukleus vorliegen. Den Namen erhielten sie auf Grund ihrer dicht aneinander gepackten granulären Bestandteile, welche darauf hinweisen, dass die Dichte Granula dem Parasiten als Proteindepot dienen (Mercier und Cesbron-Delauw, 2015). Die Proteine der Dichte Granula (GRA Proteine) werden am Ende des Invasionsprozesses sekretiert, wenn die Etablierung der parasitophoren Vakuole (PV) bereits stattgefunden hat (Carruthers und Sibley, 1997). Nach ihrer Sekretion sind die meisten GRA Proteine innerhalb der PV zu finden, wo sie entweder frei löslich vorliegen oder mit dem intravakuolären Membran-Netzwerk bzw. der PV Membran assoziiert sind (Carruthers, 1999). Diese Verteilung lässt darauf schließen, dass die GRA Proteine eine wichtige Rolle bei der Reifung der PV zu einem metabolisch aktiven Kompartiment spielen und sie außerdem wichtig sind für die Transformation der PV in die persistierende Zystenform von *T. gondii* (Mercier und Cesbron-Delauw, 2015). Einige GRA Proteine verlassen die PV und lokalisieren in den Nukleus der Wirtszelle, wo sie die Genexpression des Wirtes manipulieren können (Bougdour et al., 2014). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 16 GRA Gene sowie deren codierte GRA Proteine identifiziert: GRA1-9, GRA12, GRA14, GRA19-21 sowie GRA23 und GRA25. Die genaue Funktion der einzelnen GRA Proteine konnte bisher nicht aufgedeckt werden, jedoch wird auf Grund ihrer Lokalisation angenommen, dass sie wichtige strukturelle Funktionen innerhalb der PV übernehmen. Außerdem erlaubt die spezielle Lokalisation der GRA Proteine an der Schnittstelle zwischen Wirtszelle und Parasit ihre Interaktion mit Wirtszellmechanismen (Mercier und Cesbron-Delauw, 2015). So wird den „excreted secreted antigens“ (ESAs), die hauptsächlich aus GRA Proteinen bestehen, beispielweise eine immunogene Eigenschaft zugeschrieben: Tiere, die mit ESAs immunisiert werden, überleben eine ansonsten letal verlaufende Infektion mit *T. gondii* (Darcy et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grund dieser immundominanten Eigenschaft, die Relevanz der GRA Proteine GRA1, GRA2, GRA7 und GRA9 als Zielstrukturen für die B- und T-Zellantwort analysiert. Außerdem wurde das, als immundominant beschriebene Antigen surface antigen 1 (SAG1) (Darcy et al., 1992), welches auf der Oberfläche von *T. gondii* Tachyzoiten exprimiert wird, sowie das Bradyzoiten Antigen BAG1 in die Analysen mit einbezogen. Besondere Eigenschaften der verwendeten GRA Proteine sind im Folgenden näher beschrieben.

#### **GRA1:** 190 Aminosäuren; 22 kD

GRA1 liegt nach seiner Sekretion aus den Dichte Granula als lösliches Protein in der PV vor. Als einziges der GRA Proteine besitzt GRA1 mehrere Calcium-bindende Domänen (EF-Motive), die eine potentielle Integration in die Wirtszellmembran ermöglichen, sodass GRA1 auch an der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle beteiligt sein könnte (Cesbron-Delauw et al., 1989).

#### **GRA2:** 185 Aminosäuren; 20 kD

GRA2 liegt nach seiner Sekretion teilweise löslich vor, ist jedoch auch assoziiert mit dem intravakuolären membranösen nanotubulärem Netzwerk (MNN) nachweisbar, welches die Parasiten innerhalb der PV miteinander verbindet. Um die Bindung an diese Membran zu

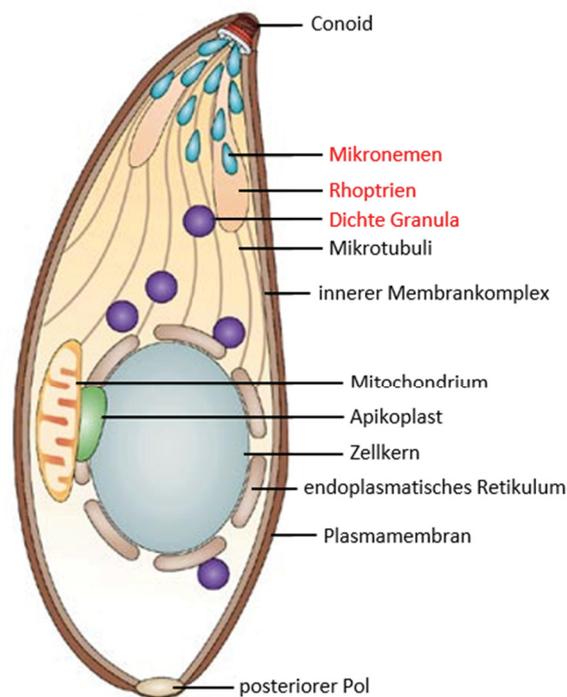
ermöglichen, beinhaltet die Aminosäuresequenz von GRA2 drei amphiphile  $\alpha$ -Helix Domänen (Mercier und Cesbron-Delauw, 2015).

**GRA7:** 236 Aminosäuren; 26 kD

Neben der löslichen Form von GRA7 innerhalb der PV, kann dieses Protein auch außerhalb der PV gefunden werden, wo es im Zytoplasma der Wirtszelle assoziiert an tubulären Strukturen vorliegt. Um seinen Nährstoffbedarf innerhalb der PV zu decken, nutzt *T. gondii* das endolysosomale System der Wirtszelle. Dazu rekrutiert der Parasit aktiv mikrotubuläre Strukturen der Wirtszelle, was zur Attraktion von Endolysosomen zur PV führt. Einstülpungen in der PV Membran dienen als Kanäle für die Aufnahme der Endolysosomen in die PV. An diesen Kanälen ist unter anderem das GRA7 Protein lokalisiert, welches als eine Art „Garotte“ den Inhalt der endozytischen Organellen in die PV überführt (Coppens et al., 2006).

**GRA 9:** 318 Aminosäuren; 35 kD

Auch GRA9 liegt nach seiner Sekretion aus den Dichte Granula zum einen löslich und zum anderen membrangebunden vor. Wie GRA2 ist das Protein dabei am MNN assoziiert und die Aminosäuresequenz von GRA9 beinhaltet ebenfalls eine amphiphile  $\alpha$ -helikale Domäne (Adjogble et al., 2004).



**Abbildung 1.2: Organellen von *Toxoplasma gondii*.** Modifiziert nach Baum et. al 2006. Die schematisch dargestellte Vergrößerung eines *T. gondii* Tachyzoiten zeigt die wichtigsten ultrastrukturellen Merkmale mit Fokus auf die drei sekretorischen Organellen, die Mikronemen, die Rhoptrien und die Dichte Granula.

Um die Relevanz der genannten GRA Proteine bzw. die von BAG1 und SAG1 als Zielstrukturen für die B- und T-Zellantwort zu analysieren, wurden diese Antigene rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die Gensequenzen stammten dabei aus dem Genom eines *T. gondii* Typ I (RH).

### 1.3. Typische und atypische *T. gondii* Stämme

Die geschlechtliche Vermehrung von *T. gondii* ist auf die Vertreter der Familie der *Felidae* beschränkt und verantwortlich für die Entstehung verschiedener Stämme des Parasiten. Dabei kann in Europa und Nordamerika grob zwischen drei klonalen Stämmen, Typ I, Typ II, Typ III und „atypischen“ Stämmen, die keiner der drei Gruppen zuzuordnen sind, unterschieden werden.

#### 1.3.1. Klonale *T. gondii* Stämme

Die Mehrheit der *T. gondii* Stämme, die in Nordamerika und Europa vorkommen, lassen sich den drei Haupt-Genotypen Typ I, Typ II oder Typ III zuordnen (Howe und Sibley, 1995). Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich vor allem in ihrer akuten Virulenz für Mäuse: *T. gondii* Typ I, zu dem die Stämme RH und BK zählen, besitzt eine hohe Virulenz. Schon die experimentelle Infektion mit einem einzigen Typ I Parasiten führt zu einer einhundert prozentigen Mortalität der Tiere ( $LD_{100} = 1$ ) (Sibley und Boothroyd, 1992). *T. gondii* Typ II, dem der Stamm ME49 zuzuordnen ist, ist als mittel virulent definiert und induziert ein vollständiges Versterben infizierter Mäuse ab einer Dosis von mehr als  $10^3$  Parasiten pro Tier ( $LD_{100} > 10^3$ ). *T. gondii* Typ III (z.B. NED) besitzt eine niedrige Virulenz, sodass die einhundert prozentige Todesrate infizierter Mäuse erst ab einer Anzahl von  $10^5$  Parasiten pro Maus erreicht wird ( $LD_{100} > 10^5$ ) (Melo et al., 2011).

Die Virulenz des Parasiten *T. gondii* variiert zusätzlich in den verschiedenen Maus Stämmen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. So versterben Mäuse des C57BL/6 Stammes, nicht jedoch Balb/c Mäuse in der chronischen Phase der *T. gondii* (ME49) Infektion an Toxoplasma-Enzephalitis. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich Balb/c und C57BL/6 genetisch anhand ihrer MHC-Klasse I Haplotypen unterscheiden (Sturge und Yarovinsky, 2014).

#### 1.3.2. *T. gondii* Virulenzfaktoren

Als genetische Grundlage der großen Virulenzunterschiede zwischen den drei verschiedenen klonalen *T. gondii* Stämmen, wurde unter anderem der Gen-Lokus, der für die ROP-Kinase ROP18 codiert, identifiziert (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006). Während der Invasion in die Wirtszelle, entlassen die Rhoptrien, wie oben beschrieben, verschiedene Proteine in die Wirtszelle. Eines dieser Proteine ist ROP18, eine aktive Serin/Threonin-Protein-Kinase, die nach ihrer Sekretion in die Wirtszelle an der Oberfläche der parasitophoren Vakuole zu finden ist. ROP18 ist ein polymorphes Protein, dessen Expressionslevel zwischen starker Expression in Typ I und Typ II Stämmen und schwacher Expression in Typ III Stämmen variiert. Das niedrige ROP18 Expressionslevel in Typ III Stämmen ist auf die Präsenz einer einzigartigen Region upstream der ROP18 codierenden Sequenz (UPS-ROP18) zurückzuführen. Diese Region fehlt in Typ I und Typ II Stämmen (= UPS-ROP18 Typ I/II) (Khan et al., 2009). Ein weiterer Gen-Lokus, der mit den Virulenzunterschieden der drei klonalen *T. gondii* Stämme assoziiert ist, codiert für ROP5 (Behnke et al., 2011; Reese et al., 2011). Dieses Protein wird ebenfalls bei der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszellen sekretiert und reguliert als polymorphe Pseudokinase die Aktivität von ROP18. Während Typ I und Typ III ROP5 die Aktivierung von ROP18 verstärkt, scheint Typ II ROP5 keine verstärkende Aktivität auf ROP18 zu besitzen. Die Proteine ROP18 und ROP5 agieren also gemeinsam und es wird angenommen, dass die beiden Gen-Loki *ROP18* und *ROP5* ca. 90% der akuten Virulenzunterschiede zwischen den drei verschiedenen Stämmen erklären (Hunter und Sibley, 2012).

Als weitere Gene, die für die unterschiedliche Virulenz der drei klonalen Stämme verantwortlich sind, wurden *ROP16* (Saeij et al., 2007), und *GRA15* (Rosowski et al., 2011) identifiziert. Das Genprodukt ROP16 beeinflusst dabei die Aktivitätsdauer der Wirtszell-Transkriptionsfaktoren „Signal transducer and activator of transcription“ 3 (STAT3) und „Signal transducer and activator of transcription“ 6 (STAT6) und damit das Ausmaß der IL-12 Induktion, welches die T<sub>H</sub>1 Zytokinantwort stimuliert (Ong et al., 2010; Yamamoto et al., 2009): Im Gegensatz zu Typ II ROP16, verlängern Typ I und Typ III ROP16 die STAT3 und STA6 Aktivität. Somit wird die Induktion von IL-12 herunter reguliert und die protektive T<sub>H</sub>1 Zytokinantwort des Wirtes limitiert.

GRA15, ein Protein der Dichte Granula beeinflusst über die Aktivierung von NF-κB ebenfalls die IL-12 Expression der Wirtszelle (Rosowski et al., 2011). Typ II GRA15 aktiviert NF-κB, wodurch die Produktion von IL-12 und letztendlich die T<sub>H</sub>1 Zytokinantwort des Wirtes gesteigert wird.

Typ I und Typ III GRA15 besitzt eine solche aktivierende Funktion nicht. In der folgenden Tabelle (Tabelle 1.1) sind die Stamm-spezifischen Virulenzfaktoren und ihre Auswirkung auf die murine Immunantwort zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 1.1: Stamm-spezifische Virulenzfaktoren und ihre Auswirkungen auf die murine Immunantwort** modifiziert nach Sibley und Hunter 2012.

Stamm	Variante des Virulenzfaktors				Effekt im Wirt	Phänotyp
	ROP18	ROP5	ROP16	GRA15		
I	Typ I: starke Expression	Typ I/III: verstärkt ROP18 Aktivität	Typ I/III: verlängert STAT3/STAT6 Aktivierung	Typ I/III: aktiviert NF-κB nicht	niedrige IL-12 Produktion/ reduzierte Parasitenabwehr	hoch virulent
II	Typ II: starke Expression	Typ II: verstärkt ROP18 Aktivität nicht	Typ II: verlängert STAT3/STAT6 Aktivierung nicht	Typ II: aktiviert NF-κB	hohe IL-12 Produktion/ moderate Parasitenabwehr	mittel virulent
III	Typ III: sehr schwache Expression	Typ I/III: verstärkt ROP18 Aktivität	Typ I/III: verlängert STAT3/STAT6 Aktivierung	Typ I/III: aktiviert NF-κB nicht	niedrige IL-12 Produktion/ erhöhte Parasitenabwehr	niedrig virulent

IL-12, Interleukin-12; NF-κB, nuklearer Faktor-κB; STAT, „Signal transducer and activator of transcription“

Zusätzlich zu den hier genannten Genen, sind weitere Genregionen (z.B. BTUB und PK1) als Grundlage der Virulenzunterschiede bekannt, deren Gene bisher jedoch nicht identifiziert wurden.

### 1.3.3. Atypische *T. gondii* Stämme

In den Vertretern der Familie der *Felidae* kann eine sexuelle Rekombination verschiedener *T. gondii* Stämme erfolgen, wenn der Endwirt simultan mit unterschiedlichen Parasiten Stämmen infiziert ist. Somit können atypische *T. gondii* Genotypen entstehen, die sich von den drei klonalen Genotypen (Sibley et al., 1992) unterscheiden. Im Gegensatz zu Nordamerika und Europa, sind in Mittel- und Südamerika, besonders in Brasilien, eines der Länder mit der höchsten *T. gondii* Seroprävalenz, hauptsächlich diese atypischen Stämme zu finden (Dubey et al., 2007; Dubey et al., 2008; Lehmann et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunabwehr gegen verschiedene atypische *T. gondii* Stämme untersucht, welche von Dr. Gereon Schares und dem Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems isoliert und zur Verfügung gestellt wurden (Herrmann et al., 2012). Die genotypisch und

phänotypisch unterschiedlichen Parasiten Stämme waren aus einer einzigen Katzenkot Probe isoliert worden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in der Katze sexuelle Rekombination unterschiedlicher *T. gondii* Stämme stattgefunden hatte. In der folgenden Tabelle (Tabelle 1.2) sind die, in der Arbeit verwendeten atypischen Isolate mit ihrer Virulenz für Balb/c Mäuse und der jeweiligen Variante des Virulenzfaktors UPS-ROP18 dargestellt. Zum Vergleich sind die klonalen *T. gondii* Stämme RH, ME49 und NED ebenfalls aufgeführt.

**Tabelle 1.2: Stamm-spezifische Variante von UPS-ROP18 und Virulenz in Balb/c Mäusen.**

	Bezeichnung	UPS-ROP18	Phänotyp in Balb/c
klonale <i>T. gondii</i> Stämme	RH	Typ I/II	hoch virulent
	ME49	Typ I/II	mittel virulent
	NED	Typ III	niedrig virulent
atypische <i>T. gondii</i> Stämme	28H	Typ III	niedrig virulent
	2C10	Typ I/II	niedrig virulent
	A7	Typ III	mittel virulent
	B6H6	Typ I/II	hoch virulent

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Virulenz der isolierten atypischen Klone nicht immer mit der Präsenz (Typ III) und Absenz (Typ I/II) von UPS-ROP18 übereinstimmt (orange hinterlegt): Der Stamm A7 besitzt trotz der Anwesenheit von UPS-ROP18 keine anzunehmende niedrige, sondern eine mittlere Virulenz in Balb/c Mäusen. Auch für den niedrig virulenten Stamm 2C10 trifft die hohe bzw. mittlere Virulenz-Vorhersage, basierend auf der Abwesenheit von UPS-ROP18, nicht zu.

#### 1.4. Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Moleküle, die im Körper miteinander wechselwirken, um die Erkennung und Beseitigung von Pathogenen und entarteten Zellen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck existieren zum einen Mechanismen, die zur angeborenen Immunität gehören und solche, die der adaptiven (erworbenen) Immunität zugeordnet werden können.

Zellen der angeborenen Immunität übernehmen die erste Abwehrphase nachdem Pathogene natürliche, physikalische und chemische Körperbarrieren, beispielsweise epitheliale Oberflächen überwunden haben. Sie erkennen dabei vor allem körperfremde, konservierte Pathogenstrukturen. Die adaptive Immunantwort wird dann initiiert, wenn sich ein Pathogen erfolgreich dem Zugriff der angeborenen Immunabwehr entziehen konnte. Effektormechanismen der adaptiven Immunität werden durch die Aktivierung hoch spezifischer Lymphozyten realisiert. Die große Mehrzahl dieser Effektorzellen wird nach dem Überwinden der Infektion eliminiert, während eine kleine Population von Gedächtniszellen erhalten bleibt. Diese Population ermöglicht bei einer Infektion mit dem gleichen Pathogen die Einleitung einer raschen, effektiven und hoch spezifischen Immunantwort (Murphy et al., 2008).

### 1.4.1. Die angeborene Immunität

Effektorzellen der angeborenen Immunität sind vor allem Gewebemakrophagen, neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen (DCs). Diese tragen keimbahnkodierte Rezeptoren, die „pattern recognition receptors“ (PRRs), mit denen sie Pathogene anhand konservierter Oberflächenstrukturen („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) als körperfremd erkennen. Durch die Bindung der PAMPs an die PR-Rezeptoren, gehen die Zellen in den aktivierten Zustand über und sezernieren verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und antimikrobielle Moleküle, wodurch eine Entzündung ausgelöst und das Pathogen abgetötet werden kann (Kumar et al., 2011). Außerdem können die sezernierten Zytokine spezielle Lymphozyten, die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren, die beispielsweise Virus infizierte Zellen vernichten können.

Die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) und Interleukin-12 (IL-12) ermöglicht den Übergang zur frühen induzierten Immunantwort, da Zellen der adaptiven Immunität chemotaktisch angelockt und aktiviert werden (Murphy et al., 2008).

### 1.4.2. Die adaptive Immunität

Ein riesiger Pool von Lymphozyten mit hoch spezifischen Rezeptoren ermöglicht der adaptiven Immunantwort die Erkennung einer enormen Vielfalt unterschiedlicher Antigene. Bei einer Infektion müssen diejenigen T- und B-Zellen ausgewählt werden, die die richtige Rezeptorspezifität für die Antigene des vorhandenen Pathogens besitzen. Eine solche Erkennung aktiviert zum einen den Prozess der klonalen Expansion, in deren Rahmen nur die Zellen proliferieren und zu Effektorzellen ausdifferenzieren, welche Rezeptoren für die Antigene des vorhandenen Pathogens tragen. Zum anderen wird ein „immunologisches Gedächtnis“ gebildet.

Abhängig von Art und Lokalisation des Pathogens wirken unterschiedliche Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort: Liegt das Pathogen extrazellulär vor, fungieren Plasmazellen als Effektorzellen, indem sie große Mengen an Antikörpern (Immunglobulinen) sezernieren. Diese vermitteln humorale Effektormechanismen zur Eliminierung des Pathogens. Als Effektorzellen zur Beseitigung intrazellulärer Pathogene dienen T-Zellen, die als zytotoxische T-Zellen (CTL) die Apoptose infizierter Zellen einleiten. Deren antigenspezifische Rezeptoren erkennen Fremdanigene nur dann, wenn sie gemeinsam mit „major histocompatibility complex“ Antigenen (MHC) präsentiert werden.

Neben ihrer Funktion als Vermittler der angeborenen Immunabwehr, sind DCs und Makrophagen potente antigenpräsentierende Zellen (APZ). In der frühen Phase einer adaptiven Immunantwort prozessieren sie aufgenommene Antigene und präsentieren diese über MHC-Klasse I oder II in den peripheren lymphatischen Organen, wo die Aktivierung der entsprechenden antigenspezifischen T-Zellen stattfindet.

MHC-Klasse I Moleküle präsentieren generell Peptide endogenen Ursprungs, die im Zytosol generiert werden. Jedoch können DCs auch aufgenommene Antigene exogenen Ursprungs über MHC-Klasse I Moleküle präsentieren, was als Kreuzpräsentation bezeichnet wird. Komplexe aus MHC-Klasse I Molekül und gebundenem Antigen werden vom Rezeptorkomplex naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Durch costimulatorische Signale der APZ kommt es daraufhin zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen, die im Rahmen der klonalen Expansion proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren. Dieser Zelltyp kann zum einen die Lyse infizierter Zellen vermitteln und sezerniert zum anderen Zytokine wie Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).

Antigene exogenen Ursprungs werden nach ihrer Aufnahme im Endosom prozessiert und von MHC-Klasse II Molekülen auf der Oberfläche professioneller, antigenpräsentierender DCs und Makrophagen präsentiert. MHC-Klasse II/Antigen-Komplexe werden von antigenspezifischen T-Zell Rezeptoren naiver CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>-Zelle) erkannt. In Abhängigkeit costimulatorischer Signale, die APZ an antigenspezifische naive T<sub>H</sub>-Zellen vermitteln, werden diese aktiviert und ihre klonale Expansion eingeleitet. Polarisierende Signale der APZ, die abhängig vom jeweiligen Zytokinmilieu sind und an die naive T<sub>H</sub>-Zelle weitergeleitet werden, entscheiden schließlich darüber, zu welchem Effektorotyp sich die aktivierte T<sub>H</sub>-Zelle (CD4<sup>+</sup> T-Zelle) entwickelt. T<sub>H</sub>-Effektorzellen lassen sich je nach Zytokinrepertoire den verschiedenen Subtypen T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 oder einer Gruppe regulatorischer T<sub>H</sub>-Zellen (T<sub>reg</sub>) zuordnen. Während T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 andere Zellen des Immunsystems durch die Sekretion Subtypen-abhängiger Zytokine typischerweise dazu aktivieren Effektormechanismen auszulösen, supprimieren regulatorische T<sub>H</sub>-Effektorzellen die spezifische Immunantwort.

Zum Zytokinrepertoire einer T<sub>H</sub>1-Zelle gehören beispielsweise „Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor“ (GM-CSF), dessen Sekretion die Bildung von Granulozyten, Makrophagen und DCs stimuliert, Interleukin-2 (IL-2), das die Proliferation von T-Zellen induziert und vor allem IFN $\gamma$ , welches andere Körperzellen aktiviert. Die wichtigste Aufgabe einer T<sub>H</sub>2-Zelle ist die Aktivierung naiver B-Zellen im Lymphknoten. Der T<sub>H</sub>2-Zelle steht ein breites Zytokinspektrum zur Verfügung, um die Aktivierung bzw. Proliferation der B-Zellen zu initiieren und den spezifischen Phänotyp der zuvor naiven B-Zelle zu determinieren (z.B. Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5)). T<sub>H</sub>17-Zellen bilden hauptsächlich IL-17 und können darüber die Aktivität von Zellen der angeborenen Immunität beeinflussen. Regulatorische T<sub>H</sub>-Zellen sezernieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, Interleukin-10 (IL-10) und „Transforming Growth Factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ), die suppressiv auf eine spezifische Immunantwort wirken können.

### 1.5. Immunabwehr gegen *T. gondii*

Bei einer Infektion mit *T. gondii* determinieren die Komponenten des angeborenen Immunsystems die initiale Suszeptibilität der infizierten Organismen. Dagegen ist die adaptive Immunantwort letztendlich für das Überleben der chronischen Phase der Infektion essentiell (Sturge und Yarovinsky, 2014).

Eine primäre Infektion mit *T. gondii* stimuliert Zellen des angeborenen Immunsystems dazu, große Mengen an IL-12 und IFN $\gamma$  zu produzieren. Die kombinierte Wirkung der beiden Zytokine ist für die Resistenz gegen den Parasiten essentiell. So zeigen infizierte IFN $\gamma$ - bzw. IFN $\gamma$ -Rezeptor-defiziente Mäuse eine extrem hohe Suszeptibilität (Deckert-Schlüter et al., 1996; Scharton-Kersten et al., 1996) und auch IL-12-defiziente Tiere versterben rasch an einer *T. gondii* Infektion. IL-12 und IFN $\gamma$  induzieren eine starke T<sub>H</sub>1-basierte und CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort, die ebenfalls durch eine starke Produktion von IL-12 und IFN $\gamma$  gekennzeichnet ist. Um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern, wird den pro-inflammatorischen Effekten dieser Zytokine durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 und Interleukin 27 (IL-27) entgegen gewirkt (Miller et al., 2009).

Das, für das Überleben essentielle Zytokin IFN $\gamma$  wird bei einer *T. gondii* Infektion sowohl von Zellen der angeborenen, als auch von Zellen der adaptiven Immunantwort sezerniert und induziert antiparasitäre Effektormechanismen.

### 1.5.1. Angeborene Immunität gegen *T. gondii*

In der frühen Phase einer murinen *T. gondii* Infektion detektieren in erster Linie Dendritische Zellen mit Hilfe der Toll-like-Rezeptoren (TLR)11 und TLR12 ein *T. gondii*-spezifisches Profilin-ähnliches Protein (Yarovinsky et al., 2005). Des Weiteren wurden TLR7 und TLR9 mit der Detektion von *T. gondii* RNS bzw. genomischer DNS in Verbindung gebracht (Andrade et al., 2013). Zusätzlich zu den endosomalen TLRs, sind während der Infektion die, an der Zelloberfläche gebundenen, TLR2 und TLR4 an der Detektion von Toxoplasma-spezifischem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) beteiligt (Debierre-Grockiego et al., 2007). In Folge der TLR-Aktivierung kommt es über das Adapterprotein „myeloid differentiation factor 88“ (MYD88) schließlich zur Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-12 (Scanga et al., 2002). Obwohl die genannten Rezeptoren auch auf anderen Zellen vorkommen, sind während der murinen Infektion mit *T. gondii* dennoch Dendritische Zellen die primäre Quelle der frühen IL-12 Produktion (Scanga et al., 2002; Yarovinsky et al., 2005). Im menschlichen Genom ist *TLR11* ein nicht funktionelles Pseudogen und *TLR12* fehlt vollständig. Spezifische Sensoren, mit deren Hilfe die Zellen der angeborenen Immunantwort eine *T. gondii* Infektion detektieren, sind für das Humansystem bisher nicht bekannt.

Die infektionsbedingte Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 aktiviert unter anderem NK-Zellen. Diese wirken jedoch nicht nur direkt zytotoxisch auf *T. gondii* infizierte Zellen, sondern vermitteln ihren protektiven Effekt auch über die Sekretion von IFN $\gamma$ . (Denkers et al., 1993; Sher et al., 1993). Dies löst einen positiven „Feedback Mechanismus“ aus, wodurch die inflammatorische Umgebung moduliert wird: Das, von NK-Zellen sezernierte IFN $\gamma$  stimuliert die Reifung von DCs und inflammatorischen Monozyten, verstärkt die IL-12 Sekretion Dendritischer Zellen und bewirkt letztendlich auch die Attraktion von Makrophagen (Goldszmid et al., 2012).

Aktiviert Makrophagen sind die wichtigsten phagozytierenden Zellen während der Infektion mit *T. gondii* und limitieren die initiale Verbreitung des Parasiten. Nach dessen Phagozytose sezernieren Makrophagen verschiedene Zytokine, beispielsweise TNF $\alpha$ , was über einen positiven „Feedback Mechanismus“ die IFN $\gamma$  Sekretion erhöht und somit die Immunantwort verstärkt.

Des Weiteren nehmen neutrophile Granulozyten eine Rolle bei der frühen Produktion von IFN $\gamma$  während einer *T. gondii* Infektion ein. Die IFN $\gamma$  Sekretion dieses Zelltyps scheint nicht von IL-12 und TLR-Aktivierung abzuhängen, sondern stattdessen durch TNF und IL1- $\beta$  reguliert zu sein (Sturge et al., 2013). Die Mechanismen, welche die IFN $\gamma$  Produktion von Neutrophilen im Rahmen der *T. gondii* Infektion regulieren sind jedoch nicht vollständig bekannt.

Durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  und IL-12 werden Zellen der adaptiven Immunität, beispielsweise unreife Dendritische Zellen, zum Ausgangspunkt der Infektion rekrutiert und aktiviert, sodass der Übergang zur adaptiven Immunantwort stattfinden kann.

### 1.5.2. Adaptive Immunität gegen *T. gondii*

Nach ihrer Migration zum Infektionsherd, können unreife Dendritische Zellen entweder aktiv von *T. gondii* infiziert werden oder sie nehmen den Parasiten durch Phagozytose auf. Werden DCs aktiv infiziert, erfolgt die Bildung einer parasitophoren Vakuole. Trotz dieser Barriere zwischen Parasit und Wirtszelle können *T. gondii* Antigene im Lymphknoten über MHC-Klasse I auf der Oberfläche der Dendritischen Zellen präsentiert werden (Gubbels et al., 2005). Gelangt der Parasit dagegen durch Phagozytose in das Phagosom der Dendritischen Zellen, werden parasitäre Antigene über MHC-Klasse II präsentiert.

### 1.5.2.1. Zelluläre Immunantwort

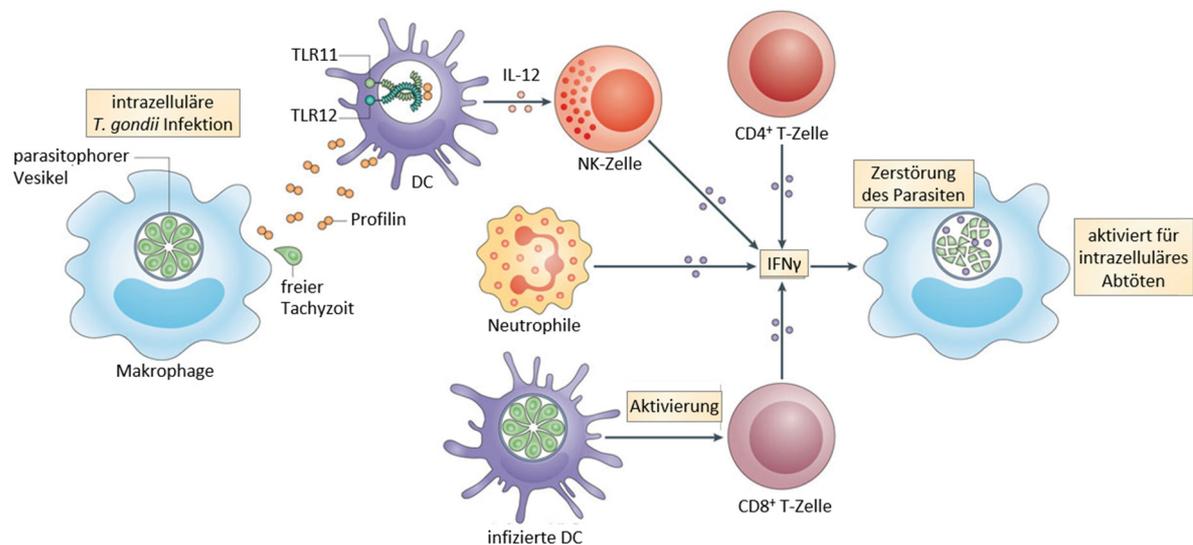
Anhand von Infektionsstudien an immundefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> als auch die von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Kontrolle einer *T. gondii* Infektion essentiell ist. So führte die gleichzeitige Depletion CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer chronischen *T. gondii* Infektion zur Reaktivierung des Parasiten und zum Versterben des Wirtes (Gazzinelli et al., 1992). Außerdem versterben SCID-Mäuse, die keine T-Zellen besitzen, beim Übergang von der akuten in die chronische Phase einer *T. gondii* Infektion (Johnson, 1992).

#### Rolle CD8<sup>+</sup> T-Zellen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine komplexe Rolle bei der Kontrolle einer *T. gondii* Infektion: Sie sezernieren zum einen IFN $\gamma$  und können zum anderen spezifisch infizierte Zellen abtöten. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* direkt zytotoxisch auf infizierte Zellen wirken können (Kasper et al., 1992; Khan et al., 1988b) und dass diese Zytotoxizität abhängig von der Präsentation der Antigene über MHC-Klasse I ist (Hakim et al., 1991).

#### Rolle CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Nach der Phagozytose des Parasiten werden *T. gondii* Antigene von APZ über MHC-Klasse II präsentiert und im lymphatischen Gewebe vom Rezeptorkomplex naiver T<sub>H</sub>-Zellen erkannt. Da das Zytokinmilieu bei der Aktivierung der APZ vornehmlich durch IL-12 und IFN $\gamma$  geprägt ist, entwickelt sich die große Mehrzahl, der von diesen APZ aktivierten naiven T<sub>H</sub>-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Effektorzellen (CD4<sup>+</sup>). Somit induziert die Infektion mit *T. gondii* eine starke adaptive T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort und damit eine hohe Produktion des antiparasitär wirkenden Zytokins IFN $\gamma$ .



**Abbildung 1.3: Zelluläre Quellen von IFN $\gamma$  während der Infektion mit *T. gondii*.** Modifiziert nach Yarovinsky 2014. IFN $\gamma$  ist essentiell für das Überleben einer *T. gondii* Infektion. Die Produktion von IFN $\gamma$  durch NK-Zellen ist abhängig von der TLR11-vermittelten Erkennung von *T. gondii* Profilin durch Dendritische Zellen (DCs). Sowohl die IFN $\gamma$  Produktion von CD4<sup>+</sup> Zellen, als auch das IFN $\gamma$ , welches von CD8<sup>+</sup> Zellen sezerniert wird, ist essentiell für die Resistenz gegen *T. gondii* während der chronischen Phase der Infektion. Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> Zellen wird über *T. gondii* Antigene vermittelt, die von infizierten DCs präsentiert werden. Neutrophile, die zum angeborenen Immunsystem zählen, stellen ebenfalls eine wichtige IFN $\gamma$  Quelle dar.

### **Rolle regulatorischer T-Zellen**

Obwohl IFN $\gamma$ -abhängige pro-inflammatorische Reaktionen essentiell für das Überleben einer *T. gondii* Infektion sind, führt eine unkontrollierte überschießende Immunreaktion zum Versterben des Wirtes. Dieser muss daher die Immunreaktion ausbalancieren, um einerseits eine maximale Eliminierung des Parasiten zu erreichen, andererseits aber eine pathologische Inflammation zu verhindern (Yap et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 essentiell für die Limitation der inflammatorischen Immunantwort gegen *T. gondii* ist. So waren IL-10-defiziente Mäuse nicht in der Lage den inflammatorischen Effekten von IFN $\gamma$ , IL-12 und TNF $\alpha$  entgegenzuwirken, sodass die Tiere während der akuten Phase an einer überschießenden Entzündungsreaktion verstarben (Gazzinelli et al., 1996). Ein anderes anti-inflammatorisches Zytokin, das an der Regulation der Immunpathologie beteiligt ist, ist TGF- $\beta$ . Das Zytokin TGF- $\beta$  wird besonders von intestinalen Lymphozyten sezerniert und kontrolliert die intestinale Pathologie nach einer oralen *T. gondii* Infektion (Mennechet et al., 2004).

#### **1.5.2.2. Humorale Immunantwort**

Der Parasit *T. gondii* induziert neben der zellulären auch eine starke humorale Immunantwort. Mit Hilfe von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen wird die Aktivierung naiver B-Zellen im lymphatischen Gewebe induziert. Aktivierte B-Zellen sezernieren dann große Mengen an spezifischen Antikörpern, die an *T. gondii* binden und so dessen Beseitigung aus dem Körper ermöglichen (Murphy et al., 2008). Die humorale Immunantwort scheint vor allem in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion eine wichtige Rolle einzunehmen: Die Antikörper Produktion in CD4-defizienten Mäusen ist während einer *T. gondii* Infektion extrem eingeschränkt und die Tiere zeigen eine stark verminderte Überlebensrate. Zusätzlich erhöht der Transfer von Serum, welches *T. gondii* spezifische Antikörper enthält, die Resistenz gegen eine akute Infektion (Johnson und Sayles, 2002). In der chronischen Phase einer *T. gondii* Infektion scheint die humorale Immunantwort dagegen keinen bedeutsamen protektiven Effekt zu vermitteln, da eine latente Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten trotz vorhandener, spezifischer Antikörper reaktiviert werden kann.

### **1.6. IFN $\gamma$ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii***

Das Zytokin IFN $\gamma$ , welches als Konsequenz einer *T. gondii* Infektion sowohl von Zellen der angeborenen als auch von Zellen der adaptiven Immunantwort produziert wird, induziert starke antiparasitäre Mechanismen in infizierten Zellen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass IFN $\gamma$  das wichtigste Effektormolekül ist, das die Eliminierung von *T. gondii* in infizierten humanen Makrophagen und somit die Resistenz des Wirtes gegen die parasitäre Infektion vermittelt (Murray et al., 1985; Nathan et al., 1983).

Als IFN $\gamma$ -vermittelte protektive Mechanismen wurde bisher unter anderem die Produktion des mikrobioziden Moleküls NO (Stickstoffmonoxid) beschrieben. Das Wachstum des Parasiten kann aber auch durch den IFN $\gamma$ -vermittelten Abbau von Tryptophan eingeschränkt werden. Außerdem induziert IFN $\gamma$  die Aktivierung der antiparasitär wirkenden GTPasen (Abbildung 1.4). Diese drei Effektormechanismen gegen *T. gondii* sind im Folgenden näher beschrieben.

### 1.6.1. Induktion der Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)

Pfefferkorn et al. konnte bereits 1984 zeigen, dass IFN $\gamma$  das *T. gondii*-Wachstum in humanen Fibroblasten supprimiert, indem es die Wirtszelle dazu aktiviert Tryptophan abzubauen (Pfefferkorn, 1984). Dieser antiproliferative Effekt von IFN $\gamma$  auf den Parasiten wird durch die Induktion des IDO Enzyms vermittelt (Pfefferkorn et al., 1986), welches Tryptophan in Anwesenheit von Sauerstoff zu *N*-Formylkynurenin umsetzt. Da *T. gondii* Tryptophan-auxotroph ist, Tryptophan also nicht selbst synthetisieren kann, führt der Abbau der essentiellen Aminosäure zur Wachstumsinhibierung des Parasiten. Die IDO-Aktivität kann durch den Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan (1MT) gehemmt werden, wodurch das *T. gondii*-Wachstum wieder ungehindert erfolgen kann. Außerdem lässt sich der IDO-vermittelte, antiparasitäre Effekt durch die Zugabe von Tryptophan antagonisieren.

Während die Aktivität des IDO Enzyms seither in vielen verschiedenen humanen Zelltypen, unter anderem in Makrophagen (Murray et al., 1989), mesenchymalen Stammzellen (Meisel et al., 2011) und Glioblastomzellen (Däubener et al., 1993) nachgewiesen wurde, scheint das Enzym in murinen Zellkulturen keine antiparasitäre Aktivität zu vermitteln.

Neben *T. gondii*, können auch andere Tryptophan-auxotrophe Mikroorganismen durch einen IDO-vermittelten Abbau der essentiellen Aminosäure in ihrem Wachstum gehemmt werden. Dazu zählen Bakterien, beispielsweise Chlamydien (Pantoja et al., 2000) oder *Staphylokokkus aureus* (Schroten et al., 2001), außerdem Viren wie das Herpes simplex Virus (Adams et al., 2004) und andere Parasiten, z.B. *Neospora caninum* (Spekker et al., 2009).

Neben seiner antimikrobiellen Funktion, besitzt das IDO Enzym auch immunmodulierende Eigenschaften. Die Bedeutung der Immunregulation durch IDO wurde erstmals 1998 von Munn und seinen Mitarbeitern anhand von murinen Schwangerschaftsmodellen gezeigt. Dabei führte die Blockade der IDO-Aktivität durch 1MT zur Abstoßung allogener, nicht jedoch syngener Föten. Es konnte gezeigt werden, dass IDO durch den Abbau von Tryptophan die Proliferation maternaler T-Zellen hemmt und so Immuntoleranz gegenüber allogener Föten induziert (Munn et al., 1998). Später konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen, Makrophagen und viele Gewebezellen in der Lage sind, durch einen IDO-vermittelten Abbau von Tryptophan die Aktivierung von T-Zellen zu inhibieren (Meisel et al., 2004; Mellor und Munn, 2004; Munn et al., 1999). Die IDO-vermittelte Hemmung der T-Zell-Proliferation und -Aktivität wird nicht nur durch die Tryptophan-Verarmung ausgelöst, sondern auch durch die, beim Abbau der Aminosäure entstehenden Tryptophan-Metabolite, wie z.B. Kynurenin (Fallarino et al., 2002; Grohmann et al., 2003). Zusätzlich fördert das IDO Enzym durch den Abbau von Tryptophan und die Produktion von Kynurenin die Entstehung hoch suppressiver regulatorischer T-Zellen (Grohmann et al., 2003).

### 1.6.2. Produktion von Stickstoffmonoxid (NO)

Ein weiterer antiparasitärer Mechanismus, der durch IFN $\gamma$  vermittelt wird, ist die Induktion des Stoffwechselweges, der L-Arginin zu NO umsetzt (Adams et al., 1990). Dieser Umsatz wird durch die Aktivierung der induzierbaren „Nitric Oxide Synthase“ (iNOS) katalysiert. NO wirkt mikrobizid auf eine Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Pathogene, einschließlich *T. gondii*. NO Intermediate sind außerdem in der Lage die parasitophore Vakuole zu durchdringen und können hier Proteine des Parasiten modifizieren. Insbesondere die Inhibierung metabolischer Enzyme durch NO hat einen wichtigen zytostatischen Effekt auf mikrobielle Pathogene (Fang, 2004). Zusätzlich zum

zytostatischen Effekt der iNOS wirkt der Abbau des Edukts Arginin wachstumshemmend auf die streng Arginin-auxotrophen Toxoplasmen (Fox et al., 2004).

Die Induktion der NO Produktion vermittelt in murinen *in vitro* und *in vivo* Experimenten einen wichtigen antiparasitären Effekt. Für die Kontrolle des Parasiten-Wachstums in humanen *in vitro* Systemen spielt sie jedoch keine Rolle. Wahrscheinlich wird die *T. gondii* Proliferationskontrolle hier von alternativen IFN $\gamma$ -abhängigen Stoffwechselwegen und insbesondere durch die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion derIDO realisiert (Yarovinsky, 2014).

### 1.6.3. IFN $\gamma$ -induzierbare IRGs und GBPs

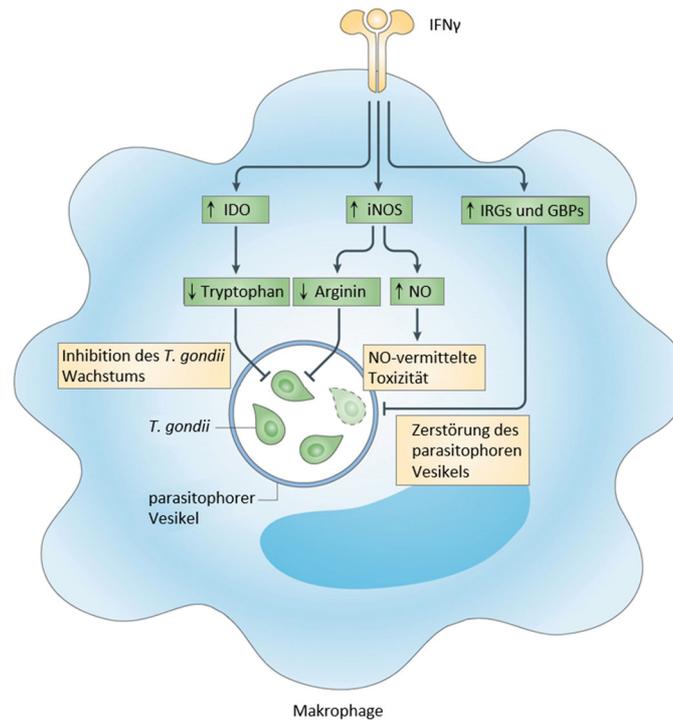
Die „Immune Related“ GTPasen (IRGs) bilden eine Familie von IFN $\gamma$ -induzierbaren Proteinen und sind essentiell für die Resistenz des Wirtes gegen unterschiedliche intrazelluläre Pathogene, einschließlich *T. gondii* (Taylor et al., 2004). Unter Normalbedingungen befinden sich die verschiedenen IRG Proteine in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten oder im Zytosol. Die Infektion mit *T. gondii* resultiert in einer hoch koordinierten Rekrutierung der IRGs an die parasitophore Vakuole (PV) (Khaminets et al., 2010). Die Ansammlung der IRG Proteine an der PV führt zur Zerstörung der Vakuole, wodurch der Parasit ins Zytosol der Wirtszelle freigesetzt und hier in Autophagosom-ähnliche Vesikel eingeschlossen wird. Diese fusionieren mit Lysosomen, in denen *T. gondii* schließlich eliminiert wird (Ling et al., 2006; Martens et al., 2005).

Im Gegensatz zur ihrer Bedeutung in der Maus, wird über eine Rolle für IRGs in humanen Zellen noch diskutiert. Im humanen Genom ist nur ein einziges IRG Homolog vorhanden (Bekpen et al., 2005), welches jedoch keine enzymatische Wirkung besitzt. Eine Rolle des Genproduktes bei der Abwehr von *T. gondii* in humanen Zellen konnte bisher nicht gezeigt werden.

Die p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) sind eine andere Gruppe von Enzymen, die durch IFN $\gamma$  induziert werden und zur Immunabwehr gegen *T. gondii* beitragen (Degrandi et al., 2007). GBPs werden sowohl in murinen als auch in humanen Zellen exprimiert (Cheng et al., 1991) und es wird vermutet, dass diese Proteine an der *T. gondii*-spezifischen Immunantwort bzw. an der IFN $\gamma$ -vermittelten Eliminierung des Parasiten durch die Kooperation mit IRGs beteiligt sind (Degrandi et al., 2013; Haldar et al., 2013; Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012).

Anders als die IRGs sind die p65 GTPasen in Vertebraten weit verbreitet, was darauf hindeutet, dass sie nicht nur in der Maus eine Aufgabe bei der Abwehr gegen Mikroorganismen übernehmen können.

Die Bedeutung der Interaktion zwischen den IRGs/GBPs der Wirtszelle und dem Parasiten, lässt sich anhand der unter 1.3.2. beschriebenen *T. gondii* Virulenzfaktoren ROP5 und ROP18 belegen. Zusammengefasst produzieren Vertreter des hoch virulenten Typ I Stammes Proteine, die das Beladen der PV durch IRGs und GBPs verhindern und somit ihrer Eliminierung entgegenwirken.



**Abbildung 1.4: Effektormechanismen der IFN $\gamma$ -vermittelten Eliminierung von *T. gondii* in infizierten Zellen.** Modifiziert nach Yarovinsky 2014. IFN $\gamma$  induziert die Expression der inhibitorischen Proteine IDO und iNOS sowie die Expression der IRG und GBP Effektorproteine und bewirkt damit eine reduzierte Parasitenreplikation bzw. die Eliminierung von *T. gondii*. IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan, das essentiell für das Wachstum des Tryptophan-axotrophen Parasiten ist. iNOS generiert zum einen hoch toxisches NO und beschränkt ebenfalls die Replikation von *T. gondii*, indem das Enzym die Aminosäure Arginin abbaut, welche für das *T. gondii*-Wachstum ebenfalls essentiell ist. IRGs und GBPs sind verantwortlich für die Zerstörung der parasitophoren Vakuole und ermöglichen so den Abbau des Parasiten.

## 1.7. Humane Toxoplasmose

Obwohl eine Infektion mit *T. gondii* bei Menschen sehr verbreitet ist, verursacht der Parasit als Erreger der Toxoplasmose nur in bestimmten Risikogruppen ernsthafte klinische Symptome, wobei zwischen pränataler (kongenitaler) und postnataler Toxoplasmose unterschieden werden kann.

### 1.7.1. Postnatale Toxoplasmose

In immunkompetenten Individuen verläuft die Erstinfektion mit einem *T. gondii* Stamm für gewöhnlich asymptomatisch. Gelegentlich treten schwache grippeähnliche Symptome, wie Kopfschmerzen, leichtes Fieber und Gliederschmerzen auf. Die wichtigste klinische Manifestation ist jedoch eine schmerzlose Lymphadenopathie, d.h. eine Vergrößerung der Lymphknoten (Bowie et al., 1997). Schwere klinische Symptome, wie Enzephalitis, Myokarditis oder Pneumonie können in Folge einer *T. gondii* Erstinfektion zwar auftreten, sind in immunkompetenten Menschen jedoch sehr selten. Relativ häufig ist neueren Erkenntnissen nach dagegen die Manifestation einer okulären Toxoplasmose (Bowie et al., 1997; Saffra et al., 2013), die sich meist als Chorioretinitis, also eine Entzündung von Chorioidea (Aderhaut) und Retina (Netzhaut) äußert. Der Schweregrad des Krankheitsbildes ist dabei abhängig von der Lokalisation der Läsionen (zentrale oder periphere Retina) und der Intensität der Entzündung, welche zum einen von Alter und Immunstatus des Patienten (Saffra et al., 2013) und zum anderen vom Genotyp des Parasiten (Boothroyd und Grigg,

2002) abhängt. Bei der großen Mehrzahl der immunkompetenten Individuen entstehen nur geringe Netzhaut-Läsionen, die innerhalb von zwei bis vier Monaten abheilen und lediglich kleine Narben hinterlassen, sodass die okuläre Toxoplasmose meist asymptomatisch verläuft und häufig unbemerkt bleibt (Bosch-Driessen et al., 2002).

Verschiedene Studien belegen, dass Infektionen mit atypischen *T. gondii* Genotypen schwere Toxoplasmose Verläufe bei immunkompetenten Menschen auslösen können (Carme et al., 2009; Pomares et al., 2011; Sobanski et al., 2013) und dass diese Stämme häufig für die Manifestation einer schwerwiegenden okulären Toxoplasmose verantwortlich sind (Boothroyd und Grigg, 2002; Khan et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, resultiert die Erstinfektion mit *T. gondii* in einer schützenden Immunantwort und der Ausbildung von persistierenden *T. gondii* Gewebezysten. Da diese sich besonders in neuronalem Gewebe, speziell im Auge aber auch im Gehirn entwickeln, wird ein Zusammenhang zwischen latenten *T. gondii* Infektionen und verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie Depressionen, Schizophrenie und Parkinson (Fabiani et al., 2013; Henriquez et al., 2009; Hinzselch et al., 2010) sowie Persönlichkeits- und Verhaltensveränderungen (Flegr, 2013) diskutiert.

Bei immunsupprimierten Menschen kann eine chronische *T. gondii* Infektion reaktiviert werden. In Folge einer Immunsuppression kommt es beispielsweise bei Transplantat-Empfängern oder Tumor-Patienten zur Manifestation einer okulären Toxoplasmose (Holland, 1989). Der Krankheitsverlauf ist sehr viel schwerer als bei immunkompetenten Individuen und äußert sich in klinischen Symptomen, wie starken Entzündungen und Nekrose der Netzhaut, die letztlich zum Erblinden führen können. Weitere klinische Symptome einer reaktivierten *T. gondii* Infektion sind Enzephalitis und Pneumonie. Eine Immundefizienz liegt auch bei AIDS-Patienten vor, bei denen die Reaktivierung der ausgebildeten *T. gondii* Gewebezysten im Gehirn zu Toxoplasma-Enzephalitis führt (Chirch und Luft, 2007). Weltweit sind davon bis zu 40% aller AIDS-Patienten betroffen, jedoch ist diese Zahl aufgrund neuer Behandlungsmethoden rückläufig (Tenter et al., 2000).

### 1.7.2. Kongenitale Toxoplasmose

Erfolgt die Erstinfektion mit *T. gondii* kurz vor oder während einer Schwangerschaft kann es zur vertikalen Übertragung von *T. gondii* auf den Fötus kommen. Die Manifestation einer kongenitalen Toxoplasmose kann auf vier verschiedenen Wegen erfolgen.

- Die erste Möglichkeit der Übertragung des Parasiten auf den Fötus stellt eine mütterliche Erstinfektion während der Schwangerschaft dar. Erfolgt die Infektion mit einem der drei typischen *T. gondii* Genotypen wird generell angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit einer vertikalen Transmission des Parasiten mit dem Fortschritt der Schwangerschaft steigt, das Risiko einer ersthaften Schädigung des Fötus jedoch sinkt (Lindsay und Dubey, 2011). Demnach treten die schwersten Schädigungen bei der vertikalen Transmission von *T. gondii* im ersten Trimenon der Schwangerschaft auf, dagegen ist nur eine milde klinische Manifestation der Toxoplasmose zu beobachten, wenn die Infektion des Ungeborenen im dritten Trimenon erfolgt. Über die Erstinfektion mit atypischen *T. gondii* Genotypen während der Schwangerschaft und die Folgen der kongenitalen Toxoplasmose für das infizierte Kind ist deutlich weniger bekannt. Jedoch scheint eine kongenitale Toxoplasmose, verursacht durch einen atypischen *T. gondii* Genotyp, schwerer zu sein, als eine kongenitale Toxoplasmose, die von einem typischen Stamm ausgelöst wird (Ajzenberg et al., 2002; Delhaes et al., 2010). Außerdem kann die mütterliche Erstinfektion mit einem atypischen Genotyp im dritten Trimenon in einer schweren klinischen Manifestation der kongenitalen

- Toxoplasmose resultieren, was bei Infektion mit den typischen *T. gondii* Genotypen eher unwahrscheinlich ist (Delhaes et al., 2010).
- Der zweite Weg der Manifestation einer kongenitalen Toxoplasmose ist die vertikale Übertragung des Parasiten von immunkompetenten Schwangeren, bei denen die Infektion mit *T. gondii* nur wenige Monate vor der Schwangerschaft erfolgte. Diese Transmission ist dann möglich, wenn die Persistenz des Parasiten im Blut (Parasitämie) bis zur Empfängnis und der Etablierung der Schwangerschaft anhält (Boumahni et al., 2004; Dollfus et al., 1998; Vogel et al., 1996). Über Unterschiede bezüglich der Dauer der Parasitämie typischer und atypischer *T. gondii* Genotypen und die Rolle, die dies für die kongenitale Toxoplasmose spielen könnte, ist bisher kaum etwas bekannt.
  - Eine dritte Möglichkeit der vertikalen Übertragung von *T. gondii* auf den Fötus bietet sich bei Reaktivierung der Toxoplasmose in HIV infizierten Frauen (Azevedo et al., 2010; Bachmeyer et al., 2006; Fernandes et al., 2012) oder Schwangeren, die aufgrund von Autoimmunerkrankungen oder Tumoren des hämatologischen Systems, erniedrigte Immun-Funktionen besitzen (Lindsay und Dubey, 2011). Die Relevanz des *T. gondii* Genotyps und die Wahrscheinlichkeit, mit der die Reaktivierung unterschiedlicher Genotypen in immunsupprimierten Schwangeren erfolgt, ist bisher nicht bekannt.
  - Beim vierten Weg geht die vertikale *T. gondii* Übertragung von Müttern aus, die Immunität gegen einen typischen Genotyp besitzen, sich während der Schwangerschaft jedoch mit einem atypischen Genotyp infizieren. Dieser kann auf das Ungeborene übertragen werden und schwere fötale Schädigungen verursachen (Lindsay und Dubey, 2011). Über die Fähigkeit eines atypischen Stammes protektive Immunität bei einer erneuten Infektion mit einem atypischen oder typischen *T. gondii* Genotyp zu vermitteln, ist bisher nichts bekannt.

Die Konsequenzen einer Infektion des Ungeborenen variieren je nach Zeitpunkt der Infektion und dem Genotyp des Parasiten zwischen milden Symptomen bis hin zu schwersten Schädigungen, die zu Aborten, Totgeburten und neonataler Letalität führen können. Klassische klinische Symptome der kongenitalen Toxoplasmose sind die Entwicklung eines Hydrozephalus, cerebrale Kalzifizierung und Chorioretinitis. Die meisten pränatal infizierten Neugeborenen sind bei ihrer Geburt asymptomatisch. Klinische Symptome wie geistige Retardierung, Chorioretinitis mit drohender Erblindung, und Taubheit treten erst Monate oder Jahre nach der Geburt auf (Tenter et al., 2000).

### 1.8. Diagnose einer *T. gondii* Infektion

Den serologischen Tests kommt bei der Diagnose einer prä- und postnatalen *T. gondii* Infektion nach wie vor die größte Bedeutung zu. Die Diagnose einer *T. gondii* Infektion erfolgt meist über den serologischen Nachweis Parasiten-spezifischer Immunglobulin G (IgG)- und Immunglobulin M (IgM)-Antikörper. Die alleinige Präsenz *T. gondii*-spezifischer IgG-Antikörper gilt als Hinweis auf eine latente bzw. chronische *T. gondii* Infektion. Sind zusätzlich spezifische IgM-Antikörper detektierbar, weist dies auf eine akute oder reaktivierte Infektion hin. Außerdem werden Toxoplasmen-spezifische IgA- und IgE-Antikörper zur Diagnostik herangezogen, die ebenso wie IgM-Antikörper, Indikatoren für eine kürzlich erworbene Infektion sind (Pinon et al., 1990; Takahashi und Rossi, 1994).

In der Routinediagnostik wird häufig der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) verwendet, der auch in dieser Arbeit für die Unterscheidung *T. gondii* infizierter und nicht infizierter humaner

Blutspender genutzt wurde. Mit Hilfe des IIFT können Toxoplasmen-spezifische IgG-, IgM- und IgA-Antikörper mit einer hohen Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Für das Testverfahren werden abgetötete *T. gondii* Tachyzoiten auf Objektträgern fixiert, die dann mit verschiedenen Verdünnungen des zu testenden Patientensersums inkubiert werden. Mittels Fluoreszin-beladener anti-human-Immunglobulin-Antikörpern und einer Evans Blau Gegenfärbung kann die Präsenz *T. gondii*-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden: Im Fluoreszenzmikroskop sind nur dann grün fluoreszierenden Tachyzoiten zu erkennen, wenn eine Bindung spezifischer Antikörper aus dem Serum eines infizierten Patienten an die fixierten *T. gondii* Tachyzoiten stattgefunden hat.

Obwohl sich eine *T. gondii* Infektion mit Hilfe des genannten Tests in den meisten Fällen zuverlässig nachweisen lässt, haben alle serologischen Methoden auch Nachteile. So ist das serologische Nachweisverfahren nur ein indirekter Hinweis auf eine Infektion und gibt weiterhin keinen Aufschluss über das Vorhandensein *T. gondii*-spezifischer T-Zellen, die für das Überleben während der Infektion essentiell sind (Gazzinelli et al., 1992; Johnson, 1992).

Der serologische Nachweis Toxoplasmen-spezifischer Antikörper ist für die Diagnose einer kongenitalen Toxoplasmose mit einigen Schwierigkeiten verbunden: *T. gondii*-spezifische mütterliche IgG-Antikörper, die über die Plazenta auf das Ungeborene übertragen werden, persistieren mindestens sechs Monate nach der Geburt im Blut des Kindes. Im Gegensatz dazu ist beim Fehlen spezifischer IgM-Antikörper im Blut des Neugeborenen eine kongenitale Infektion nicht ausgeschlossen (Patel et al., 1993; Wilson et al., 1980). Auch bei AIDS-Patienten und Immunsupprimierten ist es häufig, aufgrund des Immunstatus, trotz einer Infektion nicht möglich Toxoplasmen-spezifische Antikörper im Serum nachzuweisen.

Obwohl bei diesen Patientengruppen eine besondere Therapiedringlichkeit besteht, ist der Nachweis der *T. gondii* Infektion daher mittels serologischer Methoden nur bedingt geeignet.

Als eine hoch sensitive und spezifische Methode kann bei nicht eindeutigen serologischen Ergebnissen eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Diagnose herangezogen werden, mit deren Hilfe Toxoplasmen-DNS im Liquor, Fruchtwasser oder in Gewebeproben detektiert werden kann. Der Nachteil dieser Methode ist der hoch invasive Eingriff zur Gewinnung der Proben, die mittels PCR analysiert werden sollen.

## 1.9. Zielsetzung der Arbeit

Die Toxoplasmose ist eine der weltweit am häufigsten vorkommenden Zoonosen, von der Schätzungen nach ca. 30% der Weltbevölkerung betroffen sind. Die Reaktivierung einer Toxoplasmose ist eine der häufigsten Ursachen für die Ausprägung einer Infektion im zentralen Nervensystem bei Immunsupprimierten und AIDS-Patienten. Außerdem verursacht eine pränatale *T. gondii* Infektion den Abort des Ungeborenen oder einen schweren Krankheitsverlauf bei Neugeborenen, der bis hin zur Erblindung führen kann. Die serologische Diagnose einer *T. gondii* Infektion gestaltet sich gerade bei diesen Risikogruppen als schwierig.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Möglichkeit einer T-Zell-basierten Diagnose der parasitären Infektion evaluiert werden. Im Zuge dessen wird analysiert, ob ausgewählte sekretorische *T. gondii* Antigene, die rekombinant hergestellt werden, als Zielstrukturen für die humane T-Zellantwort fungieren können.

Eine wichtige Infektionsquelle für Menschen stellt die Präsenz von *T. gondii* Zysten im Fleisch von Nutztieren und der Konsum von rohem oder ungarischem Fleisch dar. Der Nachweis einer *T. gondii*

Infektion in Nutztieren könnte den Verzehr von kontaminiertem Fleisch einschränken und somit das Risiko einer Infektion herabsetzen. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb überprüft werden, ob sich eine *T. gondii* Infektion bei Schweinen durch eine T-Zell-basierte Diagnostik unter Verwendung der ausgewählten, rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene nachweisen lässt.

Ein besonders wichtiger Zwischenwirt für *T. gondii* ist die Maus, da sie das bevorzugte Beutetier des Endwirtes, der Katze ist. Nach der oralen Aufnahme infizierter Mäuse durch den Endwirt, wird ein neuer *T. gondii* Infektionskreislauf initiiert. Deshalb dient die Maus in der Toxoplasmen-Forschung häufig als Modellorganismus. Aus diesem Grund werden die oben beschriebenen T-Zell-Analysen im dritten Teil der Arbeit auf die Maus übertragen. Dabei wird zusätzlich der Einfluss des immunmodulatorischen Enzyms IDO auf die T-Zellantwort von *T. gondii* infizierten Mäusen untersucht.

IDO vermittelt neben seiner immunmodulatorischen Funktion im Maus-System, antiparasitäre Effekte in humanen Zellkulturen: Nach IFN $\gamma$ -Stimulation exprimiert eine Vielzahl humaner Zellen, darunter Makrophagen, Glioblastomzellen und Fibroblasten das Enzym IDO, welches den Abbau von Tryptophan katalysiert und somit das Wachstum des Tryptophan-auxotrophen Parasiten *T. gondii* hemmt. Diese IDO-vermittelte Wachstumshemmung ist bisher vor allem für humane Zellen und den hoch virulenten *T. gondii* Stamm Typ I beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb untersucht, ob das Enzym IDO auch antiparasitäre Effekte in porcinen Zellkulturen vermitteln kann. Außerdem soll analysiert werden, inwiefern sich die niedriger virulenten *T. gondii* Typ Stämme II und III sowie verschiedene atypische Parasiten Stämme durch die IDO-Aktivität hemmen lassen.

In murinen Zellkulturen spielt das IDO Enzym eine untergeordnete Rolle bei der Parasitenabwehr. Hier ist eine Familie von IFN $\gamma$ -induzierbaren GTPasen essentiell für die Resistenz gegen *T. gondii*. Virulenzfaktoren der drei Typ-Stämme determinieren dabei die Effektivität der GTPasen-vermittelten Abwehr. So können nur Vertreter des hoch virulenten Typ I Stammes nicht, aber die, der niedriger virulenten Typ II und Typ III Stämme der Eliminierung durch GTPasen entgegenwirken. Im Rahmen der Arbeit soll die Effektivität der GTPasen vermittelten Abwehr gegen verschiedene atypische Parasiten Stämme, die sich durch eine nicht typische Zusammensetzung der Virulenzfaktoren auszeichnen, analysiert werden.

## 2. Material

### 2.1. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser (Ø 13 mm)	VWR International, West Chester (USA)
Einfrierröhrchen	NUNC GmbH, Wiesbaden (Deutschland)
Einmalspritzen (1-50 ml)	B. Braun, Melsungen (Deutschland)
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Incorporated, Tewksbury (USA)
Glasfaser-Filter	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim (Deutschland)
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann Techcolor, Eberstadt (Deutschland)
Kanülen Sterican® (versch. Größen)	B. Braun, Melsungen (Deutschland)
Neubauer-Zählkammer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde (Deutschland)
Pipettenspitzen TipOne®	StarLab, Hamburg (Deutschland)
Plastikhüllen	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim (Deutschland)
Polypropylen-Säule	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland); Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Sterilfilter	Millipore, Eschborn (Deutschland)
Zellkulturflaschen (25, 75, 165 cm <sup>2</sup> )	Corning Incorporated, Tewksbury (USA)
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Vertiefungen)	Greiner Bio-one, Frickenhausen (Deutschland)
Zellsieb (40 µm)	Corning Incorporated, Tewksbury (USA)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
	Greiner Bio-one, Frickenhausen (Deutschland)
	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Zentrifugenbecher (500 ml, 50 ml)	Beckman Coulter, Krefeld (Deutschland)

### 2.2. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
1-L-Methyl-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<sup>3</sup> H-Thymidin (Aktivität 0,74 Mbq/ml)	Amersham, Braunschweig (Deutschland)
<sup>3</sup> H-Uracil (Aktivität 1,23 Mbq/ml)	Amersham, Braunschweig (Deutschland)
4-(Dimethylamin)benzaldehyd (Ehrlich's Reagenz)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Aqua dest. 0,5 l steril	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Brefeldin A (1mg/ml in Ethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)
DAPI	Roche, Mannheim (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
e780 Viabilitätsfarbstoff	eBioscience, San Diego (USA)

---

EDTA	Fluka Chemie AG, St. Gallen (Schweiz)
Eisessig (Essigsäure 96%)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt/Main (Deutschland)
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ficoll 400	GE Healthcare, Chalfont St Giles
Fixation Buffer	BioLegend, San Diego (USA)
Fluoromount-G SBA	Southern Biotech, Birmingham (USA)
Fötale Kälberserum (FCS)	Lonza, Rockland (USA)
Gelantine	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
HCl (Salzsäure)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Heparin	Ratiopharm, Ulm (Deutschland)
IMDM	Lonza, Rockland (USA)
Imidazol	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
IPTG	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Kaliumchlorid	Riedel-deHaën, Seelze (Deutschland)
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt (Deutschland)
PBS 0,5 l steril	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
PBS Chemikalienpulver	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Permeabilization Wash Buffer	BioLegend, San Diego (USA)
Red Blood Cell Lysis Buffer	Roche, Mannheim (Deutschland)
Roti Phenol/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
RPMI	Pan Biotech, Aidenbach (Deutschland)
See Blue® Plus 2 Prestained Standard	life technologies, Darmstadt (Deutschland)
SEB	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Stopplösung (ELISA)	R&D Systems, Minnesota (USA)
Substratlösung (ELISA)	R&D Systems, Minnesota (USA)
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim (Deutschland)
Tetramethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Trichloressigsäure (30%)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween 20	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Urea	Merck, Darmstadt (Deutschland)
X-Vivo-15	Lonza, Rockland (USA)
Ziege-Normal Serum (NGS)	Daco, Glostrup (Dänemark)

---

### 2.3. Medien und Puffer

Medium/Puffer	Bestandteile
Coomassie-Färbelösung	0,5 g Coomassie 250 100 ml Eisessig 500 ml Ethanol 500 ml Wasser
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
Entfärbelösung	74,5 ml Eisessig 200 ml Ethanol 725,5 ml Wasser
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl <i>ad</i> 1000 ml mit H <sub>2</sub> O pH 7; autoklaviert
Organverdaupuffer	6% (v/v) Collagenase Typ VIII 1% (v/v) DNase I Lösung 97% (v/v) PBS
Phosphate-buffered saline	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Proteinaufreinigungs-Puffer A	6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris/HCl pH 8
Proteinaufreinigungs-Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris/HCl pH 8
Proteinaufreinigungs-Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris/HCl pH 6,3
Proteinaufreinigungs-Puffer E	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris/HCl 0,25 M Imidazol pH 6,3
SDS-Probenpuffer (5x)	10% SDS 0,4 M Tris/HCl pH 6,8 25% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
Stopp-Puffer (Milz-Zell-Isolierung)	1 x PBS 10 mM EDTA

Tris-Glycerin-Elektrophorese-Puffer	60 g Tris 288 g Glycin 0,1% SDS ad 10 l mit H <sub>2</sub> O
-------------------------------------	---

## 2.4. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DNAse I	Roche, Mannheim (Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,05%)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)

## 2.5. Zytokine

Zytokin	Bezugsquelle
humanes IFN $\gamma$	R&D Systems, Minnesota (USA)
humanes IL-7	R&D Systems, Minnesota (USA)
murines IFN $\gamma$	R&D Systems, Minnesota (USA)
porcines IFN $\gamma$	R&D Systems, Minnesota (USA)

## 2.6. Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
Maus $\alpha$ CD4 (human)	1:10 FACS	BioLegend, San Diego (USA)
Maus $\alpha$ CD40L (human)	1:50 FACS	BioLegend, San Diego (USA)
Maus $\alpha$ IFN $\gamma$ (human)	1:25 FACS	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Maus $\alpha$ <i>T. gondii</i> SAG1	1:1000 Immunfluoreszenz	Abcam, Cambridge (UK)
Kaninchen $\alpha$ mGBP2	1:500 Westernblot	Eurogentec, Seraing (Belgien)
Ziege $\alpha$ Kaninchen Cy2-gekoppelt	1:1000 Immunfluoreszenz	dianova, West Grove (USA)
Ziege $\alpha$ Maus Cy3-gekoppelt	1:1000 Immunfluoreszenz	dianova, West Grove (USA)

## 2.7. Kits

Kit	Bezugsquelle
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Dual-Farben ELISpot IFN $\gamma$ /IL-4 (human)	R&D Systems, Minnesota (USA)
IFN $\gamma$ DuoSet <sup>®</sup> ELISA (murin)	R&D Systems, Minnesota (USA)
IFN $\gamma$ DuoSet <sup>®</sup> ELISA (porcin)	R&D Systems, Minnesota (USA)

## 2.8. Zell-Linien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Humane Vorhautfibroblasten (HFF)	ATTC, Wesel (Deutschland)
PCP-R Zellen	Prof. Dr. Schroten, Heidelberg (Deutschland) (Schroten et al., 2012)
Murine mesenchymale Stammzellen (mMSC)	Dr. Özer Degistirici, Düsseldorf (Deutschland)

## 2.9. Parasiten Stämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm RH	ATTC, Wesel (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm ME49	ATTC, Wesel (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm BK	ATTC, Wesel (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm 28H	Gereon Schares, Insel Riems (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm 2C10	Gereon Schares, Insel Riems (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm A7	Gereon Schares, Insel Riems (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm B6H6	Gereon Schares, Insel Riems (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm NED	Gereon Schares, Insel Riems (Deutschland)
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm BoB	in dieser Arbeit isoliert

## 2.10. Versuchstiere

Verwendete Mauslinie	Bezugsquelle
C57BL/6	Janvier, Saint Berthevin Cedex (Frankreich)
1160 (IDO <sup>-/-</sup> ) C57BL/6 Hintergrund	Jackson Laboratories, Maine (USA)
Balb/c	Janvier, Saint Berthevin Cedex (Frankreich)

## 2.11 Geräte

Gerät	Hersteller
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim (Deutschland)
Binokular Leica MZ 16	Leica, Wetzlar (Deutschland)
Digitalkamera KY-F70B	JVC, Yokohama (Japan)
Drehrad Model L28	Labinco BV, Breda (Niederlande)
Ein- und Multikanalpipetten (Finnpipetten)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Feinwaage Chyo JL 180	Welabo, Düsseldorf (Deutschland)
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules (USA)
Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Inkubator Hera cell 240	Heraeus, Hanau (Deutschland)
LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg (Deutschland)
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Works, Wilmington (USA)
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen (Deutschland)
pH-Messgerät MP 225	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Photometer Sunrise	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Deutschland)
Schüttler 3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (Deutschland)
Schüttler 3019	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (Deutschland)
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules (USA)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim (Deutschland)
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Tischmikroskop	Zeiss, Oberkochen (Deutschland)
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Vortexer MS1 Minishaker	IKA Works, Wilmington (USA)
Waage Precisa 400	Oehmen Labortechnik, Essen (Deutschland)
Wasserbad Laktotherm 1	Winkelberg, Gablingen (Deutschland)

---

Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (Deutschland)
Zeiss LSM 780 (Konfokal-Mikroskop)	Zeiss, Oberkochen (Deutschland)
Zellerntegerät Basic 96 Harvester	Zinser Analytic Skatron, Frankfurt (Deutschland)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, JA-20)	Beckman Coulter, Krefeld (Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge Sorvall RC-4	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen (Deutschland)

---

## 3. Methoden

### 3.1. Zellkulturmethoden

#### 3.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Für die Gewinnung humaner Peripherer Blut Mononukleärer Zellen (PBMC) wurden ca. 50 ml antikoaguliertes venöses Vollblut von gesunden Spendern mit deren Einverständnis verwendet. Die Isolierung der Zellen erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradienten-Separation. Dazu wurde das Blut zunächst in 50 ml Röhrchen überführt und 1:2 mit PBS verdünnt. Mit dem Blut-PBS-Gemisch wurde dann 15 ml Ficoll in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig überschichtet und anschließend für 30 min bei 1300 g ohne Bremse und bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase, das Blutplasma, abgenommen und verworfen. Die mononukleären Zellen, die sich in der Interphase oberhalb des Ficolls befanden, wurden mit Hilfe einer Glaspipette geerntet und in ein neues Röhrchen überführt. Die übrigen Bestandteile (Erythrozyten, Ficoll, Granulozyten und restliches Plasma) wurden verworfen. Die Röhrchen, in denen sich die geernteten Zellen der Interphase befanden, wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen sedimentiert (10 min, 730 g, RT). Es folgten zwei Wasch-Schritte. Dazu wurde der Überstand der pelletierten Zellen entfernt, das Röhrchen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 320 g und RT zentrifugiert. Nach dem zweiten Wasch-Schritt erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 140 g und RT. Die sedimentierten Zellen wurden dann in 1 ml X-Vivo Medium aufgenommen, mittels Neubauer-Kammer gezählt und für Versuche eingesetzt.

Die Gewinnung der Blutproben experimentell infizierter Schweine erfolgte in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Astrid Tenter und der Tierärztlichen Hochschule in Hannover. Für die Blutentnahme am Vortag der unter 3.1.8. beschriebenen Analysen (ca. 20 ml Blut pro Tier) wurden heparinisierte Röhrchen verwendet, die per Post und bei RT über Nacht von Hannover nach Düsseldorf geschickt wurden. Die Isolierung der porcinen PBMC erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll der Isolierung humaner mononukleärer Zellen.

#### 3.1.2. Aufreinigung von murinen Milz-Zellen

Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und in 2-3 ml Organverdaupuffer in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen überführt. Dann wurde das Organ mit Hilfe zweier steriler Pipettenspitzen grob zerkleinert und anschließend für 30 min bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Verdauprozess wurde durch Zugabe von 5 ml Stopp-Puffer beendet, dann wurde so lange resuspendiert, bis eine homogene Suspension entstanden war. Diese wurde über ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt und anschließend für 5 min bei 350 g und RT zentrifugiert. Dann erfolgte die Lyse der, im Zellpellet befindlichen, Erythrozyten. Dazu wurden die Zellen 1-3 min mit 1-3 ml (abhängig von der Größe der Zellpellets) in Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt, dann wurden die Zellen für 5 min bei 350 g und RT erneut sedimentiert. Die pelletierten Milz-Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen, mittels Neubauer-Kammer gezählt und konnten dann für Versuche eingesetzt werden.

### 3.1.3. Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden in IMDM-Medium mit 10% FCS bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> in 165 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Wenn die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Kulturflasche zwei Mal mit PBS ausgewaschen. Um die Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturflasche aufzuheben, wurden sie für 5-10 min mit Trypsin-EDTA (0,05%) inkubiert und durch anschließendes Schlagen gegen die Flasche abgelöst. Durch Hinzufügen von FCS-haltigem Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und sedimentiert (10 min, 350 g, RT). Das Pellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:4 auf neue Kulturflaschen verteilt oder für Versuche eingesetzt.

### 3.1.4. Kultivierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC)

mMSC wurden in IMDM-Medium mit 5-10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (PenStrep) bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Das Passagieren und Ernten der Zellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll, welches unter 3.1.3. für HFF angegeben ist.

### 3.1.5. Kultivierung von porcinen epithelialen Zellen (PCP-R Zellen)

PCP-R Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10% FCS, 0,05% Insulin (Stock 10 mg/ml) und 1% Penicillin/Streptomycin (PenStrep) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> in 165 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Wenn die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie passagiert. Nachdem das Medium abgesaugt und die Kulturflasche mit PBS ausgewaschen worden war, wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> in Anwesenheit von Trypsin-EDTA (0,05%) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 350 g und RT zentrifugiert. Die sedimentierten PCP-R Zellen wurden dann in einem Verhältnis von 1:3 auf neue Kulturflaschen ausplattiert oder für Versuche eingesetzt.

### 3.1.6. Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Die Parasiten aller verwendeten *T. gondii* Stämme wurden im Tachyzoiten-Stadium in HFF in IMDM mit 10% FCS kultiviert und vermehrt. Die Parasiten Stämme BK, RH, ME49 und B6H6 erhielten keinen Antibiotikum-Zusatz. Dem Kulturmedium der *T. gondii* Stämme 28H, 2C10, A7, NED und BoB wurde 1% PenStrep zugesetzt. Zur Kultivierung und Vermehrung der Parasiten wurde ein konfluent HFF-Monolayer in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit ca. 10<sup>6</sup> Tachyzoiten des jeweiligen Stammes infiziert. Nach drei bis vier Tagen hatten die *T. gondii* Tachyzoiten die Wirtszellen vollständig lysiert und konnten zur weiteren Kultivierung bzw. für Versuche genutzt werden. Dazu wurde der Inhalt der Zellkulturflasche mit einer Glaspipette entnommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und anschließend für 10 min und 90 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden verbliebene Wirtszellbestandteile aufgrund ihrer Dichte pelletiert, die leichteren Parasiten befanden sich im Überstand. Dieser Überstand wurde in eine neues 15 ml Röhrchen überführt, anschließend erfolgte die Sedimentation der Parasiten für 10 min bei 2200 g und RT. Die geernteten Tachyzoiten wurden dann in Medium oder PBS aufgenommen. Schließlich wurde ihre Anzahl mittels Neubauer-Zählkammern ermittelt und sie konnten für die *in vitro* Infektionen bzw. die *in vivo* Infektionen von Mäusen verwendet werden.

### 3.1.7. Einfrieren und Auftauen von Zellen/Parasiten

Die verschiedenen Zellen und Parasiten Stämme wurden wie beschrieben geerntet und sedimentiert. Die Pellets wurden dann in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO; steril filtriert) aufgenommen, in Einfrierröhrchen überführt und zügig bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und hier dauerhaft aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen dem Stickstoff entnommen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur angetaut, dann in FCS-haltigem Kulturmedium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Es folgte die Sedimentierung der Zellen bzw. Parasiten, die anschließend im jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen bzw. auf einen konfluenten HFF-Monolayer ausgesät wurden.

### 3.1.8. Induktion der proliferativen T-Zellantwort durch TLA bzw. rAG (Zell-Proliferationsassays)

Um die immunologische Bedeutung verschiedener sekretorischer Antigene des Parasiten *Toxoplasma gondii* als Zielstrukturen für die T-Zellantwort zu ermitteln, wurden *in vitro* Stimulationsversuche durchgeführt. Dabei wurde analysiert, ob latent infizierte Spender T-Zellen besitzen, die TLA (siehe 3.2.2.) bzw. *T. gondii* Antigene (siehe 3.2.3) erkennen. In verschiedenen T-Zell-Proliferationsassays wurden PBMC (Mensch, Schwein) bzw. Milz-Zellen (Maus) in Anwesenheit von TLA oder der rekombinant hergestellten Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1, SAG1 kultiviert. Wenn sich in der PBMC- bzw. Milz-Zell-Kultur T-Zellen befanden, welche TLA bzw. die zu testenden Antigene erkannten, wurden sie in deren Anwesenheit aktiviert und zum Wachstum angeregt. Zur Kontrolle wurden Zellen nicht infizierter (seronegativer) Spender mitgeführt.

Humane PBMC wurden in einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  in 200  $\mu$ l X-Vivo-15-Medium in Rundboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) ausplattiert. Porcine PBMC und murine Milz-Zellen wurden in gleicher Zellzahl in 200  $\mu$ l IMDM mit 5% FCS und 1% PenStrep ausgesät. Die Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen von TLA ( $10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  s. 3.2.2) oder mit je einem der genannten rekombinanten Antigen (1  $\mu$ g/ml) pro Ansatz versetzt. Außerdem wurden Zellen in Zellkulturmedium kultiviert (Negativ-Kontrolle). Zur Überprüfung der Proliferationskapazität (Positiv-Kontrolle) wurden humane PBMC mit dem monoklonalen anti-CD3 Antikörper, OKT3 (Endkonzentration 1:3000) stimuliert. Die Proliferationskapazität porciner PBMC und muriner Milz-Zellen erfolgte durch Stimulation der Zellen mit Concanavalin A (ConA; Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml). Das Lektin aus der Jackbohne stimuliert als Mitogen die T-Zell-Proliferation. Alle Ansätze erfolgten in dreifacher Ausführung. Die Zellen wurden dann für drei, fünf oder sieben Tage bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wurden 7,4 kBq radioaktiv markiertes Thymidin (<sup>3</sup>HT) zugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden die Ansätze eingefroren und bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

### 3.1.9. Analyse der Immunsuppression in murinen Milz-Zellkulturen

Untersucht wurde, ob die Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden, immunsuppressiv auf die Zellen naiver Tiere wirken konnten. Dabei sollte zum einen die Rolle löslicher Faktoren (im Zellkulturüberstand) und zum anderen die Bedeutung von Zell-Zell-Kontakt (in Co-Kulturen) für die Vermittlung einer möglichen Immunsuppression analysiert werden.

### 3.1.9.1. Generierung von murinen Milz-Zellüberständen

C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^5$  ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben unbehandelt. In der frühen Phase der Infektion (Tag 7-11) erfolgte die Entnahme der Milzen und die anschließende Isolierung der Milz-Zellen. Diese wurden dann in der Anwesenheit von ConA (Endkonzentration  $1 \mu\text{g/ml}$ ) bzw. in Zellkulturmedium in einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  in  $200 \mu\text{l}$  IMDM-Medium mit 5% FCS und 1% PenStrep in Rundboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) kultiviert. Nach fünf Tagen wurde der Überstand (ÜS) der Zellkulturen entnommen und gruppenweise gepoolt (ÜS von Zellen infizierter Tiere bzw. ÜS von Zellen naiver Tiere). Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie in den, im Folgenden beschriebenen, Versuchen eingesetzt.

### 3.1.9.2. Kultivierung muriner Milz-Zellen in Anwesenheit von Milz-Zellüberständen

Milz-Zellen naiver Mäuse wurden mit einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  in einem Gesamtvolumen von  $200 \mu\text{l}$  IMDM-Medium mit 5% FCS und 1% PenStrep in Rundboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) ausplattiert und mit den oben beschriebenen, verdünnten Überständen (Endkonzentration 1:5, 1:15, 1:30) versetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen in Zellkulturmedium kultiviert. Alle Kulturen wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$  ConA (Endkonzentration) versetzt und für drei Tage bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am dritten Tag erfolgten die Zugabe von  $7,4 \text{ kBq } ^3\text{HT}$  und eine weitere Inkubation von 24 Stunden. Dann wurden die Zellkulturplatten eingefroren und bis zur Auswertung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.1.9.3. Co-Kultivierung der Milz-Zellen naiver und *T. gondii* infizierter Mäuse

C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^5$  ME49 Tachyzoiten infiziert. In der frühen Phase der Infektion (Tag 7-11) erfolgte die Entnahme der Milzen und die anschließende Isolierung der Milz-Zellen. Parallel dazu wurden Milz-Zellen nicht infizierter Tiere isoliert. Beide Zelltypen wurden dann in unterschiedlichen Kombinationen co-kultiviert. Dazu wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen infizierter Tiere bzw.  $1,5 \times 10^5$  Zellen naiver Tiere als Basis der Kultur in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  IMDM-Medium mit 5% FCS und 1% PenStrep in Rundboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) ausplattiert. Zu den Basis Zellen wurden dann  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$  oder  $8 \times 10^3$  Zellen infizierter Tiere;  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$  oder  $8 \times 10^3$  Zellen naiver Tiere oder keine weiteren Zellen in einem Volumen von weiteren  $100 \mu\text{l}$  hinzugefügt. Alle so entstandenen (Co)-Kulturen wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$  ConA versetzt und drei Tage lang bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am dritten Tag wurde  $7,4 \text{ kBq } ^3\text{HT}$  hinzugegeben und die Kulturen für weitere 24 Stunden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Dann wurden die Ansätze eingefroren und bis zur Auswertung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  verwahrt.

### 3.1.10. Nachweis/Quantifizierung der Zell-Proliferation

Die Messung der T-Zell-Proliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ( $^3\text{HT}$ ), welches als Basenanalogen bei Vermehrung der Zellen in die DNS eingebaut wird. Die Häufigkeit dieses Einbaus kann an einem Beta-Counter gemessen werden und dient zur Quantifizierung der Zell-Proliferation.

Die Mikrotiterplatten, welche die zu analysierenden Zellen enthielten, wurden bei RT aufgetaut. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellerntegeräts auf Glasfaser-Filter übertragen. Die Filter wurden für 30 min bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet, anschließend in 10 ml Szintillationsflüssigkeit getränkt und in Plastikhüllen eingeschweißt. Die so präparierten Filter wurden schließlich in dafür vorgesehenen Kassetten eingespannt und in einem Beta-Counter

ausgewertet. Bei dieser Art der Auswertung wird die sogenannte Cerenkow-Strahlung gemessen. Sie entsteht beim radioaktiven Zerfall des Tritiums ( $^3\text{H}$ ) in der Szintillationsflüssigkeit und wird als „counts per minute“ (cpm) angegeben.

### 3.1.11. Generieren von Zellkulturüberständen

Humane und porcine PBMC bzw. murine Milz-Zellen wurden wie unter 3.1.8. beschrieben ausplattiert, stimuliert und bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellüberstände steril entnommen. Die Überstände aus Dreifachbestimmungen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vereinigt und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Auftauen erfolgte bei RT, Reste der aufgetauten Überstände wurden bei 4 °C verwahrt und innerhalb einer Woche für weitere Experimente verwendet.

### 3.1.12. Stimulation von HFF und PCP-R Zellen mit anschließender *T. gondii* Infektion

#### 3.1.12.1. Stimulation mit IFN $\gamma$

1,5x10<sup>4</sup> HFF bzw. PCP-R Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  in Flachboden-Mikrotiterplatten im jeweiligen Tryptophan-supplementierten Medium ausgesät und mit rekombinantem humanen bzw. porcinen IFN $\gamma$  stimuliert. Die Endkonzentration ist jeweils in der Legende der Abbildungen im Ergebnisteil angegeben. Nach 72-stündiger Kultivierung bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> erfolgte der Nachweis von Kynurenin aus 160  $\mu\text{l}$  der Zellkulturüberstände mittels der Ehrlich-Methode (siehe 3.2.1.), die restliche Kultur wurde verworfen.

Parallel zur Kynurenin-Messung wurden die HFF bzw. PCP-R Zellen, die in einer weiteren Flachboden-Mikrotiterplatte wie in diesem Kapitel, oben beschrieben stimuliert worden waren, mit *T. gondii* infiziert. Dazu wurden die Parasiten der unterschiedlichen *T. gondii* Stämme wie in 3.1.6. beschrieben geerntet, sedimentiert und anschließend in 1 ml Tryptophan-freiem RPMI-Medium resuspendiert. Nach Ermittlung der Parasitenzahl wurden 10<sup>5</sup> *T. gondii* Tachyzoiten in 10  $\mu\text{l}$  Tryptophan-freiem Medium zu den HFF bzw. PCP-R Zellen hinzugegeben. Die infizierten Zellen wurden dann bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sobald parasitäre Vakuolen in den Zellen erkennbar waren (ca. 24 Stunden nach der Infektion) wurden 0,012 MBq radioaktiv markiertes Uracil ( $^3\text{HU}$ ) zugegeben und die Mikrotiterplatten weiterhin bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sobald die vollständige Lyse der Wirtszellen stattgefunden hatte und die Parasiten extrazellulär vorlagen, wurden die Mikrotiterplatten eingefroren und bis zur weiteren Auswertung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.1.12.2. Stimulation mit PBMC-Überständen

HFF bzw. PCP-R Zellen wurden in einer Zelldichte von 3x10<sup>4</sup> in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  in Flachboden-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) im jeweiligen Medium (siehe 3.1.3. bzw. 3.1.5.) ausplattiert und in Anwesenheit von PBMC-Überständen kultiviert. Die Endkonzentration der Überstände ist im Legendentext des jeweiligen Experiments angegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> wurden 160  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstandes entnommen und für den Nachweis von Kynurenin (siehe 3.2.1.) verwendet. Die in den Vertiefungen verbliebenen Zellen wurden im Folgenden, wie oben beschrieben (3.1.12.1.), mit 5x10<sup>4</sup> Parasiten in 50  $\mu\text{l}$  Tryptophan-freiem RPMI-Medium infiziert.

### 3.1.13. Antagonisierung IDO-vermittelter Effekte

1-L-Methyl-Tryptophan (1MT) wurde als spezifischer kompetitiver IDO-Inhibitor verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Zellkulturen wie unter 3.1.12.1. und 3.1.12.2. beschrieben vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen in jeder Vertiefung mit einer Konzentration von 100 µg/ml 1MT versetzt. Die Konzentration der Stocklösung von 1-Methyl-Tryptophan betrug 4 mg/ml. Zur Herstellung wurden 200 mg 1MT in einem 50 ml Röhrchen in 1 ml 1 M NaOH bei 56 °C im Wasserbad gelöst. Dann wurde das Röhrchen mit Tryptophan-freiem RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt, die Lösung steril filtriert und in 5 ml Aliquots bei -20 °C eingefroren. Aufgetautes 1MT wurde mit Tryptophan-freiem Medium auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und in der Zellkultur eingesetzt.

Tryptophan diente zum einen als Substrat des IDO Enzyms zur Bestimmung von dessen Aktivität. Dafür wurden Zellen wie beschrieben ausplattiert und stimuliert, dann erfolgte die Zugabe von Tryptophan (Endkonzentration 100 µg/ml) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte. Zum anderen wurde durch den Zusatz von Tryptophan die IDO-induzierte, antiparasitär wirkende Tryptophan-Verarmung aufgehoben. Dazu wurden pro Vertiefung 100 µg/ml Tryptophan zum Zeitpunkt der *T. gondii* Infektion der Zellen zugegeben. Die Stocklösung (4 mg/ml) wurde durch das Lösen von 200 mg Tryptophan in 50 ml Tryptophan-freiem RPMI-Medium bei 56 °C im Wasserbad und anschließender Sterilfiltration hergestellt. Die Lösung wurde dann in 5ml Aliquots eingefroren, nach dem Auftauen auf 2 mg/ml verdünnt und konnte dann in der Zellkultur verwendet werden.

### 3.1.14. Quantitativer Nachweis der *T. gondii*-Proliferation

Die Messung der Parasiten-Proliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (<sup>3</sup>HU), (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977) welches von *T. gondii* mit Hilfe des Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase in die RNS eingebaut wird. Die Häufigkeit dieses Einbaus kann an einem Beta-Counter gemessen werden und dient zur Quantifizierung des Wachstums von *T. gondii*.

Die *T. gondii* infizierten Kulturen wurden mit Hilfe eines Zellerntegeräts auf Glasfaser-Filter aufgebracht. Es folgte die Trocknung der Filter für 30 min und 100 °C im Trockenschrank. Die getrockneten Filter wurden dann mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versehen, in Plastikhüllen eingeschweißt und anschließend im Beta-Counter ausgezählt. Gemessen wurde die Cerenkow-Strahlung, welche durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit entsteht und als „counts per minutes“ (cpm) angezeigt wird.

## 3.2. Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1. Bestimmung der IDO-Aktivität nach Ehrlich (Kynurenin-Messung)

Zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) in stimulierten PCP-R Zellen bzw. HFF wurde die Präsenz von Kynurenin im Überstand der Zellkulturen analysiert, da die Konzentration dieses Tryptophan-Abbauproduktes mit der Aktivität der IDO korreliert (Däubener et al., 1994). Der Nachweis von Kynurenin erfolgte mit Hilfe von Ehrlich's Reagenz (4-(Dimethylamin)benzaldehyd). 160 µl der Zellkulturüberstände wurde in eine Spitzboden-Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) überführt und zur Fällung der Proteine mit 10 µl Trichloressigsäure (30%) versetzt. Während der darauf folgenden dreißigminütigen Inkubation bei

50 °C im Wasserbad wurde N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin hydrolysiert. Die Platten wurden dann für 10 min bei 560 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes in die Vertiefungen einer Flachboden-Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) überführt und mit 100 µl Ehrlich's Reagenz (1,2% w/v 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig; für jede Messung frisch angesetzt) versetzt. Die daraus resultierende Reaktion zwischen Kynurenin und dem Ehrlich's Reagenz führte zur Bildung eines gelben Azofarbstoffes, dessen Absorption bei 492 nm im Photometer gemessen werden konnte. Die Intensität der Absorption bei 492 nm korreliert dabei mit der Menge an vorhandenem Kynurenin und damit mit der Aktivität des IDO Enzyms. Die Absorption, die in Überständen unstimulierter Zellen gemessen wurde, diente als Negativ-Kontrolle.

### 3.2.2. Herstellung von Toxoplasma Lysat Antigen (TLA)

Zur Herstellung von Toxoplasma Lysat Antigen wurden extrazelluläre Parasiten der verschiedenen *T. gondii* Stämme wie unter 3.1.6. beschrieben geerntet.  $10^8$  Tachyzoiten wurden dann in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad (37 °C) wurden die Parasiten lysiert. Die so entstandenen Toxoplasma Lysat Antigene der unterschiedlichen *T. gondii* Stämme wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3. Denaturierende Proteinaufreinigung aus *E. coli*

Zunächst wurde eine Übernacht-Kultur von transformierten *E. coli* Stämmen angelegt, welche das Gen für das jeweilige, zu isolierende Protein enthielten. Dazu wurden 5 ml LB Medium mit Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) versetzt und mit *E. coli* aus dem entsprechenden Glycerinstock beimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Außerdem wurden je 500 ml LB-Medium in Kolben überführt, mit Ampicillin versetzt (100 µg/ml Endkonzentration) und ebenfalls über Nacht bei 37 °C vorgewärmt. Am nächsten Tag wurde das vorgewärmte LB-Medium mit jeweils der Hälfte der Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 inkubiert. Nach Entnahme einer Probe für die spätere Analyse im Coomassie-Gel, wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG (2 mM Endkonzentration) induziert. Die IPTG-versetzte Kultur wurde weitere vier Stunden inkubiert, dann wurde erneut eine Probe für die Coomassie-Gel-Analyse entnommen. Anschließend wurde die Bakterienkultur in Zentrifugenbecher überführt und für 15 min bei 11500 g und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die sedimentierten Bakterien in 15 ml Puffer A resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Um die Bakterien zu lysieren, wurde die Suspension dann in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Dann erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei RT auf dem Drehrad. Die Probe wurde bis auf 1 ml erneut in einen Zentrifugenbecher überführt und für 15 min bei 22700 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befanden, wurde entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet. Die, nach Inkubation auf dem Drehrad, zurückgestellte Probe (1 ml) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 5680 g und RT zentrifugiert. Sowohl der dabei entstandene Überstand als auch das in 1 ml Puffer A resuspendierte Pellet, wurde für die spätere Analyse im Coomassie-Gel verwahrt.

Für die anschließende Proteinaufreinigung erfolgte zunächst die Äquilibration der Ni-NTA-Agarose. Dazu wurden 600 µl Ni-NTA-Agarose in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Puffer A versetzt und durch mehrfaches Invertieren sorgfältig vermischt. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 1 min

bei 5700 g und RT. Der Überstand wurde entfernt und verworfen, die sedimentierte Ni-NTA-Agarose erneut sorgfältig in 1 ml Puffer A resuspendiert. Das Gemisch wurde wiederum für 1 min bei 5700 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose konnte dann dem Überstand des Bakterien Lysates zugegeben werden. Während der anschließenden einstündigen Inkubation bei RT auf dem Drehrad konnte das Protein, welches aus dem Bakterien Lysat isoliert werden sollte, mit seinem His-Tag an die Ni-NTA-Agarose binden. Dann wurde das Gemisch auf eine Polypropylen-Säule überführt und darin für fünf Minuten inkubiert, wodurch das Absetzen der Agarose ermöglicht wurde. Anschließend wurde die Säule geöffnet und der Durchlauf in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen. Dieser Durchlauf wurde verwahrt und später im Coomassie-Gel auf die Präsenz des zu isolierenden Proteins analysiert. Der Säule wurden dann in drei Wasch-Schritten je 10 ml Puffer A, Puffer B und Puffer C zugeführt, der Durchlauf wurde jeweils aufgefangen und ebenfalls für die spätere Coomassie-Gel-Analyse aufbewahrt. Dann wurde das Protein, welches an die Ni-NTA-Agarose gebunden war von der Säule eluiert. Dazu wurde in zehn Elutions-Schritten je 0,5 ml imidazolhaltiger Puffer E (pH 4.0) auf die Säule gegeben und das Eluat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen.

#### **3.2.4. Trichloressigsäure-Fällung der isolierten Proteinen**

Um zu überprüfen, ob das Protein in den Eluaten bzw. in den anderen, genommenen Proben (s.o.) vorhanden war, wurden diese für eine anschließende Analyse im Coomassie-Gel aufbereitet. Dazu wurden je 50 µl der Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 5 µl Trichloressigsäure (TCA; 10% Endkonzentration) versetzt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation bei -80 °C, danach wurden die Proben angetaut und anschließend für 15 min bei 15400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Proteine wurden in 70% eiskaltem Ethanol aufgenommen und erneut für 15 min bei 15400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet bei RT vollständig getrocknet und anschließend in 20 µl PBS aufgenommen.

#### **3.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sollte die Präsenz des Proteins in den verschiedenen Proben analysiert werden. Die Methode ermöglicht es Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und Proteine mit Hilfe eines Größenmarker-Vergleichs zu identifizieren. Dazu wurden zunächst SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen, deren Inhaltsstoffe und Zusammensetzung im Folgenden angegeben sind:

Das 9,5 prozentige Trenngel bestand aus 8,5 ml destilliertem, entgastem Wasser, versetzt mit 6,3 ml Rotiphorese Gel 30, 5 ml Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8) sowie 100 µl SDS (10%). Durch die Zugabe von 200 µl APS (10%) und 25 µl TEMED wurde die Vernetzung des Polymers induziert.

Für das Sammelgel wurden 6,5 ml destilliertes, entgastes Wasser mit 2,5 ml Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8), 1 ml Rotiphorese Gel 30, sowie 100 µl SDS (10%) versetzt. Durch die Zugabe von 150 µl Ammoniumperoxidisulfat (APS; 10%) und 15 µl Tetramethyldiamin (TEMED) wurde auch hier die Vernetzung des Polymers induziert.

Die Proben wurden 1:5 mit SDS-Lade-Puffer versetzt und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht, wodurch die Proteine denaturieren. Gleichzeitig lagert sich Natriumdodecylphosphat (SDS) an die hydrophoben Bereiche der Proteine an, wodurch eine gleichmäßige Ladung der Proteine zustande kommt und die Protein-Eigenladung überdeckt wird.

Als Lauf-Puffer für die Gelelektrophorese diente Tris-Glycerin-Puffer. Zur Auftrennung der Proteine wurde über Nacht eine Spannung von 40 V angelegt.

### 3.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Coomassie-Färbebäder gelegt und darin über Nacht bei RT inkubiert. Als Triphenylmethan-Farbstoff lagert sich Coomassie an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt die Proteine somit unspezifisch an. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mehrfach mit Wasser gespült. Dann erfolgte die Inkubation des Gels in einer Entfärbelösung. Diese wurde mehrfach gewechselt, die Inkubation erfolgte so lange, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Entfärbereaktion wurde dann mit Wasser abgestoppt und das Gel in einem Gelrockner getrocknet.

### 3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein Assay

Anhand der Größe der Proteinbanden, die durch Coomassie-Färbung der SDS-Gele sichtbar gemacht wurden, konnte ermittelt werden, in welchen Elutionen sich das gewünschte rekombinante Protein befand. Die entsprechenden Elutionen wurden vereinigt, dann wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kits von Thermo Scientific nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Für den Standard wurde BSA in Puffer E gelöst und in Konzentrationen von 0-2000 µg/ml verwendet.

Die Gensequenzen der aufgereinigten Proteine stammten aus dem Genom eines *T. gondii* Typ I (RH). Neben diesem Stamm existieren jedoch weitere *T. gondii* Stämme, sodass die Testpersonen, deren humorale und zelluläre Immunantwort auf die rekombinant hergestellten Antigene in der vorliegenden Arbeit analysiert werden sollte, potentiell mit unterschiedlichen *T. gondii* Stämmen infiziert sein könnten. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen der verwendeten Antigene mit Hilfe der „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST)-Funktion auf der Homepage des „National Center für Biotechnology Information“ (NCBI) in Typ I und Typ II *T. gondii* Stämmen verglichen. Während sich für GRA2 und BAG1 eine einhundert prozentige Übereinstimmung ergab, wurde für GRA1, GRA7 und SAG1 eine Abweichung von je 3% und für GRA9 eine Abweichung von 1% festgestellt.

### 3.2.8. Immunfluoreszenzanalyse

Um die Lokalisation von mGBP2 in *T. gondii* infizierten murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Zunächst wurden die Vertiefungen einer Mikrotiter-Flachbodenplatte (24 Vertiefungen) mit sterilen Deckgläschen bestückt, die dann für 30 min bei RT mit Gelatine (0,02%) beschichtet wurden. Murine MSC wurden wie in 3.1.4. beschrieben geerntet, ihre Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt und dann in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  in 500 µl IMDM-Medium mit 10% FCS und 1% PenStrep auf die Deckgläschen ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden, in denen sich die Zellen absetzten und adhären wurden, erfolgte die Stimulation mit murinem IFN $\gamma$  (Endkonzentration 100 U/ml): Pro Vertiefung wurden zusätzlich 500 µl Medium mit der entsprechenden Menge an IFN $\gamma$  versetzt und den Zellen hinzugefügt. Zur Kontrolle blieben Zellen unstimuliert und erhielten 500 µl Zellkulturmedium. Darauf folgte eine Inkubation für 16 Stunden bei 37 °C und 10% CO $_2$ .

Anschließend erfolgte die Infektion der mMSC mit verschiedenen *T. gondii* Stämmen (28H, 2C10, A7, B6H6, NED, Me49, RH, BK, BoB). Dazu wurden die Parasiten wie unter 3.1.6. beschrieben geerntet, sedimentiert und in mMSC-Kulturmedium aufgenommen. Die Parasitenzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt. Dann wurden die stimulierten Zellkulturen in jeder Vertiefung mit  $3 \times 10^5$  Toxoplasmen in 100  $\mu$ l Medium versetzt. Der Infektionsansatz wurde für 2-3 Stunden bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert und mikroskopisch kontrolliert.

Sobald die Parasiten mikroskopisch innerhalb der mMSC detektiert werden konnten, erfolgte die Färbung der Zellen. Alle, im Folgenden beschriebenen Inkubations-Schritte erfolgten auf dem Taumler. Zunächst sollten die extrazellulär verbliebenen Parasiten entfernt werden. Dazu wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt, diese mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Fixierung der infizierten Zellen mittels Inkubation in 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (20 min bei RT). Im Anschluss daran wurde das PFA entfernt und die Zellen für 5 min bei RT mit PBS gewaschen. Dann wurden die Wirtszellen und die Parasiten für die anschließende Färbung permeabilisiert. Dazu wurden die Vertiefungen mit 0,02% Saponin in PBS versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Permeabilisierungslösung wurden die Zellen für 5 min bei RT mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung, bei der unspezifische Bindestellen besetzt werden sollten. Dazu wurde 0,002% Saponin in PBS mit 2% Ziegen Serum (= Block-Lösung) versetzt und die Proben darin entweder für 20 min bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Dann wurde eine 1:10 mit PBS verdünnte Block-Lösung hergestellt und mit den Primärantikörpern SAG1 (1: 1000) bzw. mGBP2 (1: 500) versetzt. Die Antikörpermischung wurde zu den infizierten Zellen hinzugegeben, diese für 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (5 min bei RT). Dann erfolgte eine 45-minütige Inkubation der Zellen bei RT (lichtgeschützt) in Anwesenheit der Fluoreszenzmarker-gekoppelten Sekundärantikörper Cy2 und Cy3 (1:1000 Endkonzentration; in PBS mit 10% Block-Lösung). Die Proben wurden im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen (lichtgeschützt, 5 min bei RT) und dann für 5 min mit DAPI (Endkonzentration 0,5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach einem letzten Wasch-Schritt für 5 min bei RT, wurden die Deckgläschen den Vertiefungen entnommen. Verbleibende Flüssigkeit wurde auf einem Papiertuch abgetrocknet und die Deckgläschen mittels Fluoromount-G auf Objektträgern fixiert. Diese wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Analyse und Fotografie der Präparate erfolgte mit dem Konfokalmikroskop LSM 780 von Zeiss. Die repräsentativen Bilder im Ergebnisteil wurden mit der Software Zen 2012 bearbeitet.

### 3.2.9. Lineblot-Analysen

Die Lineblot-Analysen wurden von Dr. Andrea Hotop (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin in Göttingen) durchgeführt. Für den Lineblot-Assay werden verschiedene rekombinant hergestellte *T. gondii* Antigene manuell auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Die Membran wird dann mit dem zu analysierenden Serum inkubiert, um die Bindung spezifischer IgG bzw. IgM Antikörper an die rekombinanten Antigen (rAG) zu ermöglichen. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher mit IgG bzw. IgM-Antikörpern reagiert. Die Peroxidase setzt dann ein Chemilumineszenz-Substrat um. Die daraus resultierende Lichtemission kann mit Hilfe einer Lumineszenz-Apparatur nachgewiesen werden. Der Lineblot-Assay kann unter Verwendung von Computerprogrammen quantifiziert werden. Die Werte, die sich dabei ergeben werden als „Antikörperindex“ ausgedrückt. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens findet sich in der Veröffentlichung (Hotop et al., 2014).

### 3.2.10. Diagnose der *T. gondii* Infektion humaner Blutspender

Die Diagnose der *T. gondii* Infektion erfolgte am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (Abteilung Diagnostik). Den Spendern, deren PBMC wie unter 3.1.8. beschrieben analysiert wurden, wurde ca. 5 ml Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Dazu wurde das Vollblut in ein Plastikröhrchen überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Vollblut zweimal für 10 min bei 350 g und RT zentrifugiert. Der Überstand (das Serum) wurde entnommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und der Abteilung für Diagnostik übergeben. Hier erfolgte die serologische Diagnostik über den Nachweis spezifischer IgG und IgM Antikörper gegen *T. gondii* mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT). Titer, die im IIFT-Test mindestens 1:16 betragen galten als Nachweis einer *T. gondii* Infektion des jeweiligen Blutspenders. Das restliche Serum wurde bei -20 °C gelagert und später für die Lineblot-Analysen verwendet.

## 3.3. Immunologische Methoden

### 3.3.1. Immunmarkierung und Durchflusszytometrie (FACS)

Auch hier sollte die immunologische Bedeutung verschiedener sekretorischer Antigene des Parasiten *T. gondii* als Zielstrukturen für die T-Zellantwort ermitteln werden. T-Zellen in der PBMC-Kultur seropositiver Spender wurden dazu mit TLA bzw. die rekombinant hergestellten Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1, SAG1 stimuliert. Stimulierte T-Zellen exprimieren dann zum einen verschiedene Aktivitätsmarker, beispielsweise CD40L, und produzieren zum anderen Zytokine, z.B. IFN $\gamma$ . Dies kann nach Immunmarkierung und einer intrazellulären Zytokinmarkierung durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

In eine Rundboden-Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) wurden je 100  $\mu$ l RPMI mit 1% Glutamin und 1% PenStrep vorgelegt. Dieses Medium war zuvor mit einer 10<sup>-2</sup> Verdünnung von TLA oder mit je einem Antigen (1  $\mu$ g/ml Endkonzentration) pro Ansatz versetzt worden. Zur Negativ-Kontrolle diente Kulturmedium, zur Positiv-Kontrolle wurde Medium mit Staphylokokkus Enterotoxin B (SEB) in einer Endkonzentration von 15  $\mu$ g/ml verwendet. Alle Ansätze erfolgten in dreifacher Ausführung. Für den Versuch wurden ca. 3 ml antikoagulierte venöses Vollblut von gesunden Spendern mit deren Einverständnis entnommen. Das Vollblut wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit 20 ng/ml IL-7 versetzt. Je 100  $\mu$ l davon wurden dann die Vertiefungen der oben genannten Mikrotiterplatten pipettiert und für ca. 3 Stunden bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde jede Vertiefung der Mikrotiterplatte mit 0,5  $\mu$ l einer 1 mg/ml konzentrierten Brefeldin A-Lösung versetzt und weitere 15 Stunden inkubiert. Brefeldin A verhindert als Transport-Inhibitor letztlich das Freisetzen der Zytokine, die damit intrazellulär akkumulieren und dadurch detektiert werden können.

Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 18 Stunden erfolgt die Immunmarkierung und intrazelluläre Zytokinfärbung: Die Mikrotiterplatte wurde dem Brutschrank entnommen und in einer Plattenzentrifuge für 5 min bei 390 g und 4 °C zentrifugiert, dann wurde der Überstand mit einer Mehrkanalpipette entnommen. Der Viabilitätsfarbstoff e780 wurde in PBS 1:100 verdünnt. Anschließend wurden 0,5  $\mu$ l dieser Verdünnung in jede Vertiefung pipettiert und alle Ansätze gründlich gemischt. Nach einer Inkubation für 15 min bei RT (lichtgeschützt) wurden 180  $\mu$ l PBS zugegeben und die Platte für 5 min bei 390 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes

erfolgte die Lyse der Erythrozyten: Die Zellen wurden sorgfältig in je 100 µl Lyse-Puffer resuspendiert und lichtgeschützt für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 390 g und 4 °C sedimentiert. Nach einem zweiten, identischen Lyse-Schritt folgte das Waschen der Zellen durch die Zugabe von 180 µl PBS und eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 390 g und 4 °C. Der Überstand wurde entnommen, die Ansätze mit 100 µl „Fixation Buffer“ versetzt, bis zur Schaumbildung resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation der Mikrotiterplatte (5 min bei 500 g und 4 °C) wurde sie über einem Abfallgefäß ausgeschlagen und anschließend auf einem Papiertuch abgeklopft, um den Überstand restlos zu entfernen. Es folgte die Permeabilisierung und das Waschen der Zellen: Dazu wurde zunächst der „Permeabilization Wash Buffer“ (PermWash) 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann wurden je 180 µl dieses Puffers in die Vertiefungen pipettiert, die Zellen darin resuspendiert und anschließend für 5 min bei 500 g sedimentiert. Um die Überstände restlos zu entfernen, erfolgte erneut das Ausschlagen der Platte über einem Abfallgefäß und das anschließende Abklopfen auf einem Papiertuch. Die Zellen konnten dann mit Antikörpern gefärbt werden. Zur Herstellung der Antikörpermischung wurde das verdünnte PermWash mit unterschiedlichen Mengen dreier verschiedener spezifischer Antikörper versetzt: So wurden pro Ansatz 0,5 µl anti-CD4, 0,1 µl anti-CD40L, und 0,2 µl anti-IFN $\gamma$  in einem Gesamtvolumen von 5 µl hinzu pipettiert. Dann wurden die Zellen für 30 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. In einem letzten Wasch-Schritt wurde 180 µl PermWash in die Vertiefungen gegeben, die Platten für 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch Ausschlagen und Abklopfen restlos entfernt. Die gefärbten Zellen wurden in 80 µl PBS aufgenommen und konnten anschließend am Durchflusszytometer analysiert werden. Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät LSR Fortessa und der Software FACS Diva II durchgeführt.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Zytokine von Zellen detektiert und quantifiziert werden. Die hierzu verwendeten Antikörper binden an das jeweilige Antigen und sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert: anti-CD4 -> Brilliant Violet (BV) 510, anti-CD40L -> Phycoerythrin (PE), anti-IFN $\gamma$  -> Violet (V) 450. Im Durchflusszytometer werden die markierten Zellen einzeln durch eine Kapillare geführt und in der Messkammer mit einem Laser bestrahlt. Dies erzeugt in Abhängigkeit der Granularität der Zelle ein bestimmtes Seitwärts-Streulicht (SSC) und in Abhängigkeit der Größe ein Vorwärts-Streulicht (FSC). Außerdem werden durch die Laser die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. SSC, FSC und die Fluoreszenz der angeregten Farbstoffe werden detektiert und bezüglich des Farbspektrums und der Intensität ausgewertet. Jede einzelne Zelle wird anhand ihrer spezifischen Parameter von einer Software in ein Koordinatensystem eingeordnet, was ihre individuelle Charakterisierung erlaubt. Durch das Definieren von Analyse-Ausschnitten („Gating“) können spezifische Populationen, die näher analysiert werden sollen, selektiert werden.

Somit ermöglichte die durchflusszytometrische Analyse zunächst die Identifizierung der Lymphozyten-Population anhand ihrer spezifischen Größe und Granularität. Im Weiteren erfolgte dann eine quantitative Bestimmung der Expression von CD40L sowie der Präsenz von intrazellulärem IFN $\gamma$  in der Population der CD4 exprimierenden T-Zellen (siehe auch Gating Strategie im Ergebnisteil).

### 3.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA sollte die Menge an IFN $\gamma$  in den Überständen verschiedener Zellkulturen ermittelt werden. Das Prinzip des hier verwendeten Sandwich-ELISAs beruht darauf, dass das im Überstand vorhandene IFN $\gamma$  an anti-IFN $\gamma$  Antikörper bindet, die auf einer Kunststoffplatte fixiert vorliegen

(Erstantikörper). Ein zweiter IFN $\gamma$ -spezifischer biotinylierter Antikörper wird hinzugegeben und bindet an das vom Erstantikörper erkannte IFN $\gamma$ . Nach einem Wasch-Schritt erfolgt die Zugabe eines Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Konjugats, das durch das Biotin des IFN $\gamma$ -spezifischen Zweitantikörpers gebunden wird. Die Peroxidase setzt dann das farblose Substrat Tetramethylbenzidine (TMB) zu einem blauen Farbstoff um. Die Farbreaktion wird nach 30 min durch die Zugabe von 2 N H $_2$ SO $_4$  abgestoppt, es kommt dann zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Gelbfärbung steigt proportional zur Menge des gebundenen IFN $\gamma$  und kann am Photometer bei 450 nm gemessen werden. Da gleichzeitig ein Standard mit definierter IFN $\gamma$  Konzentration mitgeführt wird, kann anhand einer Standardkurve die genaue IFN $\gamma$  Konzentration jeder Probe ermittelt werden. In der Arbeit wurden porcine und murine IFN $\gamma$  DuoSet<sup>®</sup> ELISA von R&D Systems nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden vor der Zugabe in die Antikörper-beschichteten Platten 1:2, 1:10, 1:25, 1:50 oder 1:100 in PBS verdünnt und in Zweifachbestimmungen gemessen.

### 3.3.3. Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISpot-Assay)

Mit Hilfe eines ELISpot-Assays können individuelle Zellen, die spezifische Zytokine (hier IFN $\gamma$  und IL-4) sekretieren, detektiert werden. Damit ermöglicht diese hoch sensitive Methode die Detektion der Zell-Aktivierung auf Einzelzellniveau. Auch diese Methodik basiert auf einem Sandwich ELISA. Im Fall des hier verwendeten ELISpots sind IFN $\gamma$  und IL-4-spezifische Antikörper an PVDF-beschichteten Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) fixiert. Humane PBMC wurden wie unter 3.1.1. beschrieben isoliert und in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l X-Vivo Medium in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  auf die ELISpot-Mikrotiterplatte ausgesät. Dann wurden die Zellen mit einer  $10^{-2}$  TLA-Verdünnung oder mit 1  $\mu$ g/ml eines der Antigen (GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1, oder SAG1) versetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden PBMC in Zellkulturmedium inkubiert, als Positiv-Kontrolle erfolgte die Kultivierung in Anwesenheit von OKT3 (Endkonzentration 1:3000). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 10% CO $_2$  kultiviert. Während dieser Inkubationszeit binden die immobilisierten IFN $\gamma$ - bzw. IL-4-spezifischen Antikörper, welche sich in der unmittelbaren Umgebung aktivierter Zellen befinden, das sezernierte Zytokin. Nach Entfernen der Zellen in einem Wasch-Schritt erfolgte die Zugabe eines IL-4-spezifischen biotinylierten Antikörpers und die Zugabe eines IFN $\gamma$ -spezifischen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörpers. Beide binden an ihr jeweiliges sezerniertes Zytokin. Anschließend wird ein Konjugat aus Streptavidin-Alkalischer Phosphatase hinzugefügt, welches durch das Biotin der IL-4 Antikörper gebunden wird. Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat BCIP/NBT zu einem blau-schwarzen Bodensatz um, welcher als blauer „Spot“ auf der Membran sichtbar wird und IL-4-sezernierende Zellen repräsentiert. Das Substrat AEC wird von der Meerrettich-Peroxidase zu einem roten Bodensatz umgesetzt, der als roter „Spot“ auf der PVDF-Membran sichtbar wird und IFN $\gamma$ -sezernierende Zellen repräsentiert. Für diese Analysen wurde ein Dual-Farben IFN $\gamma$ /IL-4 ELISpot von R&D Systems verwendet, welcher nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Alle Ansätze wurden in doppelter Ausführung analysiert. Die „Spots“ wurden mit Hilfe eines Binokulars gezählt, die exemplarisch gezeigten Fotos wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen.

### 3.4. Tierversuche

#### 3.4.1. Mäuse

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes § 8 und wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (Projektnummer G271/13).

##### 3.4.1.1. Tierhaltung

Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf im S2-Bereich unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Ernährung erfolgte mit Standardfutter und Wasser *ad libitum*.

##### 3.4.1.2. Infektion mit *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

Die intraperitoneale Infektion der Tiere erfolgte im Alter von 7-9 Wochen. *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten wurden dazu wie in 3.1.6. beschrieben geerntet und sedimentiert. Das Parasitenpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Anzahl der Tachyzoiten bestimmt. Die jeweilige Anzahl an Parasiten, die zur Infektion eines Versuchstiers eingesetzt werden sollte, wurde dann in 200 µl PBS eingestellt. Die individuelle Parasitenzahl sowie der *T. gondii* Stamm mit dem die Tiere in den unterschiedlichen Versuchen infiziert wurden, ist im Legendentext der jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil angegeben. In allen Versuchen wurde mindestens ein Kontroll-Tier mitgeführt, welchem 200 µl PBS injiziert wurde. Der Zustand und das Gewicht der Versuchstiere wurden täglich geprüft, bei schweren Krankheitssymptomen wurden die Tiere schmerzfrei getötet.

#### 3.4.2. Schweine

Die experimentelle Infektion von Schweinen mit *T. gondii* Zysten bzw. Oozysten sowie die Gewinnung der Blutproben der Tiere erfolgte im Rahmen einer, durch das BMBF geförderten Kooperation mit Frau Prof. Dr. Astrid Tenter an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover.

## 4. Ergebnisse

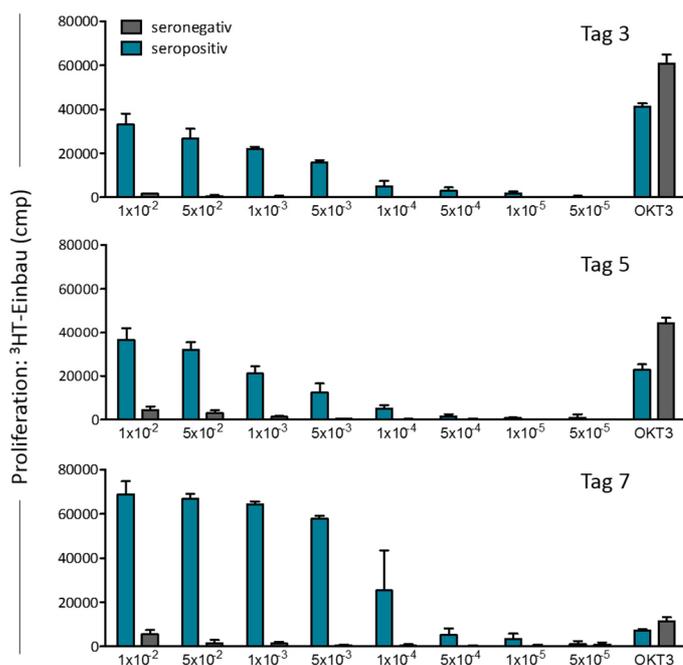
### 4.1. Analyse der immunologischen Relevanz sekretorischer *T. gondii* Antigene als Zielstrukturen für die humane T- und B-Zellantwort

Um die immunologische Bedeutung verschiedener sekretorischer Antigene des Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) als Zielstrukturen für die T- und B-Zellantwort zu ermitteln, wurde analysiert, ob infizierte (seropositive) Testpersonen T-Zellen besitzen, die spezifische Antigene von *T. gondii* erkennen. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern sich der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen für eine diagnostische Unterscheidung seropositiver und seronegativer Testpersonen eignet. Im Zuge dieser Analysen wurden sowohl T-Zell-Proliferationsassays als auch Zytokinbestimmungen durchgeführt.

Um die immunologische Relevanz verschiedener Antigene als Zielstrukturen für die zelluläre Immunantwort zu ermitteln, wurden Periphere Blut Mononukleäre Zellen (PBMC) infizierter (seropositiver) Blutspender in *in vitro* Stimulationsversuchen eingesetzt. Dabei wurde analysiert, ob sich im Pool der zirkulierenden Memory-T-Zellen verschiedener Spender T-Zellen befinden, welche eine Toxoplasmen-Antigen-Spezifität für die zu testenden Antigene aufweisen. Diese T-Zellen können dann *in vitro* reaktiviert werden. Der Nachweis einer solchen Aktivierung erfolgte zunächst durch T-Zell-Proliferationsassays und später anhand der Detektion der Interferon (IFN)  $\gamma$  Produktion.

#### 4.1.1. Analyse der Relevanz sekretorischer *T. gondii* Antigene als Zielstrukturen für die humane T-Zellantwort durch Proliferationsassays

In ersten „Proof Of Principle“-Experimenten wurde die *in vitro* Aktivierbarkeit spezifischer T-Zellen nachgewiesen. Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen T-Zell-Proliferationsassays.



**Abbildung 4.1: Aktivierbarkeit spezifischer T-Zellen mit Toxoplasma Lysat Antigen (TLA).**

Zellen eines seropositiven (blau) und eines seronegativen (grau) Spenders wurden in Anwesenheit der angegebenen TLA-Konzentrationen (Stamm RH) über einen Zeitraum von 3, 5 oder 7 Tagen kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ( $^3\text{HT}$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte der counts pro Minute (cpm)  $\pm$  SED aus Dreifachbestimmungen. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit OKT3 stimuliert. Die Werte der Proliferation in Zellkulturmedium (Negativ-Kontrolle) sind jeweils abgezogen.

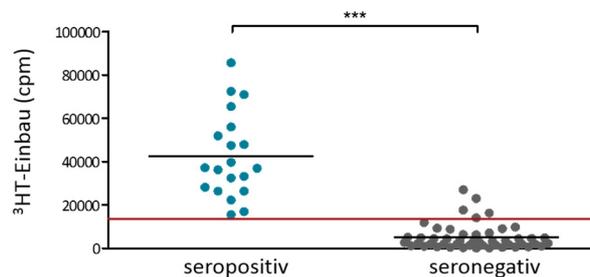
Zellen des seropositiven Spenders proliferierten, wenn sie in Anwesenheit von Toxoplasma Lysat Antigen (Stamm RH) kultiviert wurden. Das Ausmaß der Zell-Vermehrung war abhängig von der Konzentration des TLAs im Stimulationsansatz und erreichte an Tag 5 seinen halbmaximalen Wert bei einer Verdünnung von  $10^5$  lysierten Parasiten pro ml (entspricht einer TLA-Verdünnungsstufe von  $10^{-3}$ ). Die TLA-spezifische Zell-Proliferation stieg außerdem mit der Kultivierungsdauer der Zellen an.

In der jeweils entsprechenden Zellkultur des seronegativen Spenders war, wie die Abbildung 4.1. zeigt, nur eine geringe proliferative Antwort zu beobachten.

Um die prinzipielle Proliferationskapazität der Zellen beider Spender nachzuweisen, wurde eine polyklonale Stimulation mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 durchgeführt (Positiv-Kontrolle). Erwartungsgemäß zeigten die Zellen beider Spender bereits an Tag 3 eine starke Proliferation, die im Verlauf der Kulturdauer abnahm.

Als optimale Versuchsbedingung für die folgenden T-Zell-Proliferationsassays wurde die TLA Konzentration definiert, bei der maximale Proliferation festgestellt werden konnte ( $10^6$  lysierte Parasiten pro ml; entspricht der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ ). Die Standard-Kultivierungsdauer der Zellen wurde in den weiteren Experimenten auf 5 Tage festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt eine starke TLA-spezifische Proliferation und gleichzeitig eine geringe unspezifische Vermehrung der Zellen in der Negativ-Kontrolle detektierbar war.

Abbildung 4.2 zeigt die TLA-spezifische Zell-Proliferation aller 68 Spender, die im Rahmen der Studie untersucht wurden.

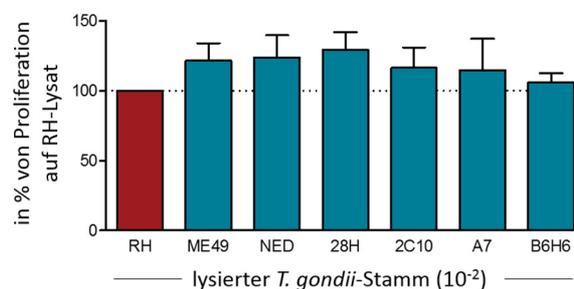


**Abbildung 4.2: TLA-spezifische Proliferation in Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender.** PBMC seropositiver Spender ( $n=20$ ) und seronegativer Spender ( $n=48$ ) wurden in Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml (Stamm RH) kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von  $^3\text{HT}$ . In der Graphik dargestellt sind die Einzelwerte der Spender (Punkte= Mittelwerte von Dreifachbestimmungen), sowie die Mittelwerte beider Gruppen (schwarze Linien). Die Werte der Proliferation in der Negativ-Kontrolle sind jeweils abgezogen. Die rote Linie gibt den ermittelten cut-off-Wert an. Die Proliferationskapazität beider Gruppen war signifikant unterschiedlich (Student's t-Test  $***p < 0.0001$ ).

Wurden PBMC seropositiver und seronegativer Spender in Anwesenheit von TLA kultiviert, konnte im Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen eine signifikant erhöhte Proliferation in Zellkulturen infizierter Spender nachgewiesen werden. Um TLA-spezifische T-Zell-Proliferation von unspezifischen Hintergrundantworten abzugrenzen, wurde ein cut-off-Wert festgelegt. Dieser ergab sich aus dem Mittelwert der Proliferation in TLA-stimulierten Zellkulturen seronegativer Testpersonen, plus der zehnfachen Standardabweichung dieses Mittelwertes.  $^3\text{HT}$  Werte die oberhalb des cut-offs lagen wurden als Nachweis für die Präsenz TLA-spezifischer T-Zellen gewertet, Werte die darunter lagen hingegen als unspezifische Proliferation. Abbildung 4.2 zeigt, dass in 100% der Zellkulturen seropositiver Spender nach Stimulation mit TLA spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten. In vier von achtundvierzig Zellkulturen seronegativer Spender (8,3%) waren

ebenfalls TLA-reaktive T-Zellen detektierbar, jedoch waren diese Proliferationswerte vergleichsweise niedrig.

Die bisher geschilderten Experimente wurden mit dem Lysat des hoch virulenten Toxoplasmen Stammes RH (Typ I) durchgeführt. Die Oberflächenantigene und sezernierten Proteine verschiedener Toxoplasmen Stämme sind von ihrem Antigenaufbau unterschiedlich. Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Lysate anderer typischer Parasiten Stämme (ME49= Typ II und NED= Typ III) und die Lysate verschiedener, atypischer *T. gondii* Stämme (28H, 2C10, A7, B6H6) ebenfalls eine T-Zell-Proliferation in PBMC-Kulturen seropositiver Spender induzieren. Dazu wurde die Zell-Proliferation nach Stimulation mit dem RH Lysat, mit der Vermehrung der Zellen nach Stimulation mit Lysaten der anderen *T. gondii* Stämme verglichen. Abbildung 4.3 zeigt die prozentuale Proliferation nach Stimulation mit den Lysaten der oben genannten *T. gondii* Stämme, bezogen auf die Zell-Vermehrung in Anwesenheit des RH Lysats (= 100%).

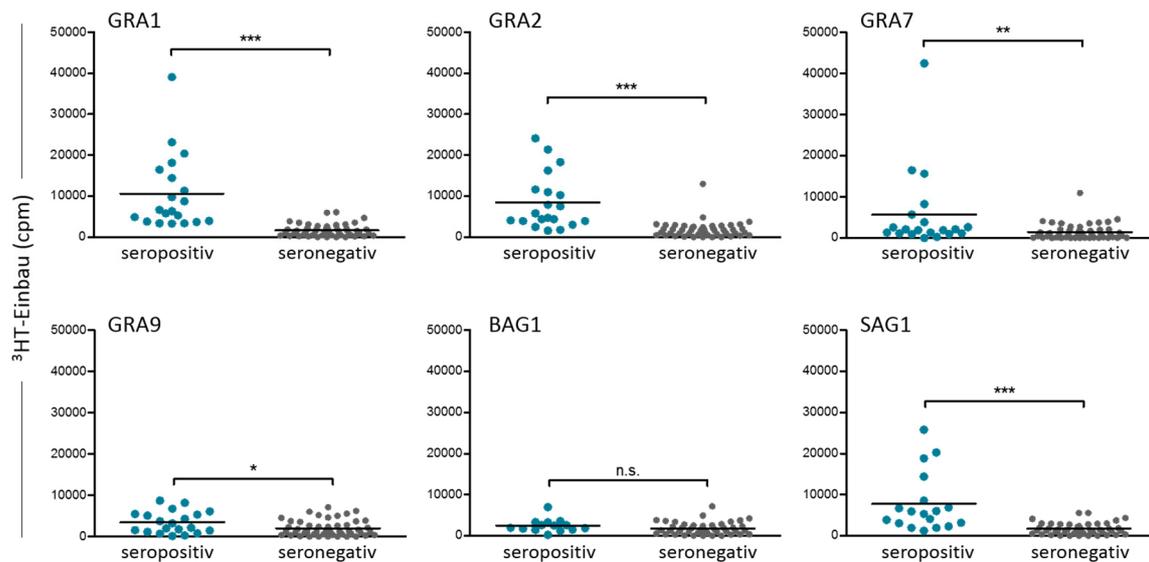


**Abbildung 4.3: Zell-Proliferation seropositiver Spender nach Stimulation mit Tachyzoiten Lysaten verschiedener *T. gondii* Stämme.** Zellen von vier verschiedenen seropositiven Spendern wurden in Anwesenheit von Lysaten unterschiedlicher Parasiten Stämme ( $10^6$  Parasiten pro ml) kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von  $^3\text{HT}$ . Die Proliferation jedes einzelnen Spenders wurde aus Dreifachbestimmungen gemittelt, die Werte der Zell-Vermehrung in der Negativ-Kontrolle wurden jeweils abgezogen. In der Graphik dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte der Proliferation  $\pm$ SEM der vier seropositiven Spender, bezogen auf die Zell-Vermehrung in Anwesenheit des RH Lysats (= 100%).

Die Proliferation von Zellen seropositiver Spender in Anwesenheit der verschiedenen *T. gondii* Lysate (Abbildung 4.3, blaue Balken) war vergleichbar mit der Zell-Vermehrung, die durch Stimulation der Zellen mittels RH Lysat (roter Balken) zu detektieren war. Die Zellkulturen seronegativer Spender zeigten bei vergleichbaren Stimulationsbedingungen nur eine geringe Proliferation (Daten nicht gezeigt).

Da verschiedene Chargen von Toxoplasma Lysat Antigen nicht konstant produziert werden können, wird im Folgenden analysiert, ob seropositive Testpersonen T-Zellen besitzen, welche spezifisch die Toxoplasmen-Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 und SAG1 erkennen. Diese Antigene stellen bekannte immundominante Antigene dar und können in großen Mengen in gleichbleibender Qualität rekombinant hergestellt werden.

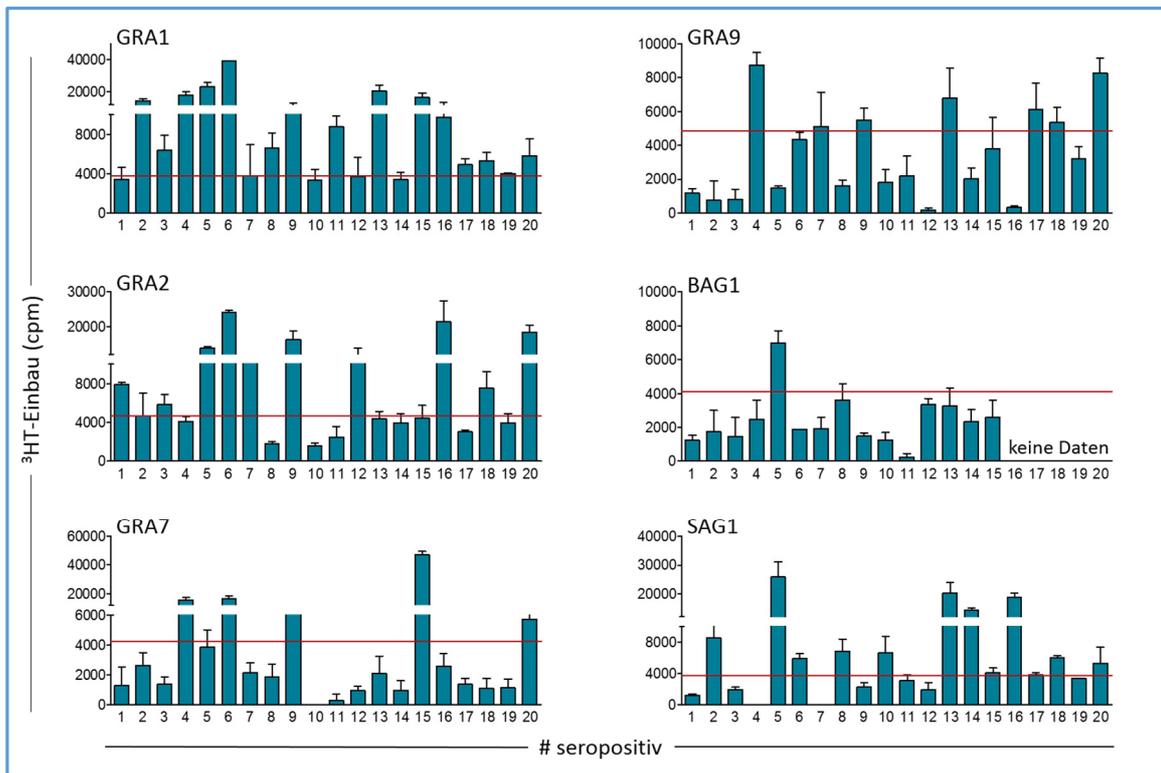
Abbildung 4.4 zeigt die Proliferation von T-Zellen seropositiver und -negativer Testpersonen als Antwort auf Stimulation mit den verschiedenen rekombinanten Antigenen (rAG) von *T. gondii*.



**Abbildung 4.4: Proliferation seropositiver und seronegativer Spender nach Stimulation mit rAG von *T. gondii*.** Zellkulturen seropositiver Spender ( $n=20$ ; blau) und Zellkulturen seronegativer Spender ( $n=48$ ; grau) wurden mit  $1\ \mu\text{g/ml}$  der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 stimuliert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von  $^3\text{HT}$ . In der Graphik dargestellt sind die Einzelwerte der Spender (Punkte), sowie die Mittelwerte beider Gruppen (schwarze Linien). Die Werte der Proliferation in der Mediumkontrolle sind jeweils abgezogen. Signifikant unterschiedliche Ergebnisse sind mit Sternchen gekennzeichnet (Student's t-Test; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

Bei Stimulation von PBMC seropositiver und seronegativer Spender mit GRA1, GRA2, GRA7, GRA9 und SAG1 konnte, im Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen, eine signifikant erhöhte Proliferation in Zellkulturen infizierter Spender nachgewiesen werden. BAG1 stimulierte keine signifikant unterschiedliche Proliferation.

Auch hier wurde die rAG-spezifische Zell-Proliferation von unspezifischer Basalproliferation durch die Festlegung von individuellen cut-off-Werten für jedes einzelne der getesteten Antigene abgegrenzt. Diese cut-off-Werte ergaben sich aus dem jeweiligen Mittelwert der Proliferation in rAG-stimulierten Zellkulturen seronegativer Testpersonen, plus der zehnfachen Standardabweichung dieser Mittelwerte. Wiederum wurden  $^3\text{HT}$  Werte die oberhalb des cut-off-Wertes lagen, als Nachweis für die Präsenz spezifischer T-Zellen gewertet, Werte die darunter lagen galten als negativ. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 4.5 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.



**Abbildung 4.5: Bewertung der rAG-spezifischen T-Zell-Reaktivität seropositiver Spender anhand individueller cut-off-Werte.** Zellkulturen seropositiver Spender (nummeriert von 1-20) wurden mit 1 µg/ml der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 stimuliert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von <sup>3</sup>HT. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte ±SD, die sich aus Dreifachbestimmungen ergaben. Die Werte der Proliferation in der Negativ-Kontrolle sind jeweils abgezogen. Die roten Linien geben den jeweils individuellen cut-off-Wert an. Die in Abbildung 4.5 quantitativ dargestellten Werte sind in Tabelle 4.1 zur besseren Übersicht qualitativ dargestellt.

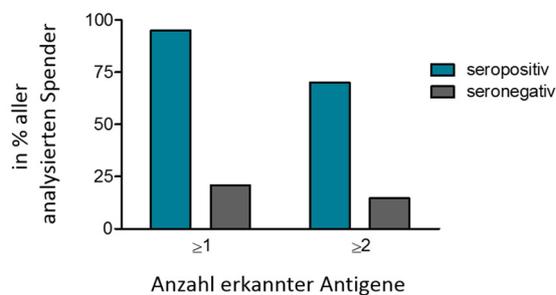
**Tabelle 4.1: Präsenz (+) und Absenz (-) spezifischer T-Zellen in Zellkulturen seropositiver Spender**

Spender #	GRA1	GRA2	GRA7	GRA9	BAG1	SAG1
1	-	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	+	-	-	+	+
6	+	+	+	-	-	+
7	+	+	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	+
9	+	+	+	+	-	-
10	-	-	-	-	-	+
11	+	-	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-	-
13	+	-	-	+	-	+
14	-	-	-	-	-	+
15	+	-	+	-	-	+
16	+	+	-	-	n.d.	+
17	+	-	-	+	n.d.	+
18	+	+	-	+	n.d.	+
19	-	-	-	-	n.d.	-
20	+	+	+	+	n.d.	+
negative	4 von 48	2 von 48	3 von 48	6 von 48	4 von 43	3 von 48

n.d.= nicht durchgeführt

Die Spenderzellen unterschiedlicher seropositiver Testpersonen zeigten individuelle proliferative T-Zellantworten, wenn sie mit den unterschiedlichen Antigenen kultiviert wurden. Am häufigsten konnte die Präsenz GRA1-spezifischer T-Zellen (15 von 20), gefolgt von der SAG1-spezifischer T-Zellen (12 von 20) nachgewiesen werden. In Zellkulturen von zehn der getesteten Spender konnte GRA2-induzierte Proliferation beobachtet werden. Sechs von zwanzig Spendern besaßen GRA9-spezifische, fünf von zwanzig GRA7-spezifische T-Zellen. BAG1 löste nur in einer Probe eine T-Zell-Proliferation aus. Keines der getesteten rekombinant hergestellten Antigene induzierte proliferative T-Zellantwort in Zellkulturen von allen seropositiven Spendern.

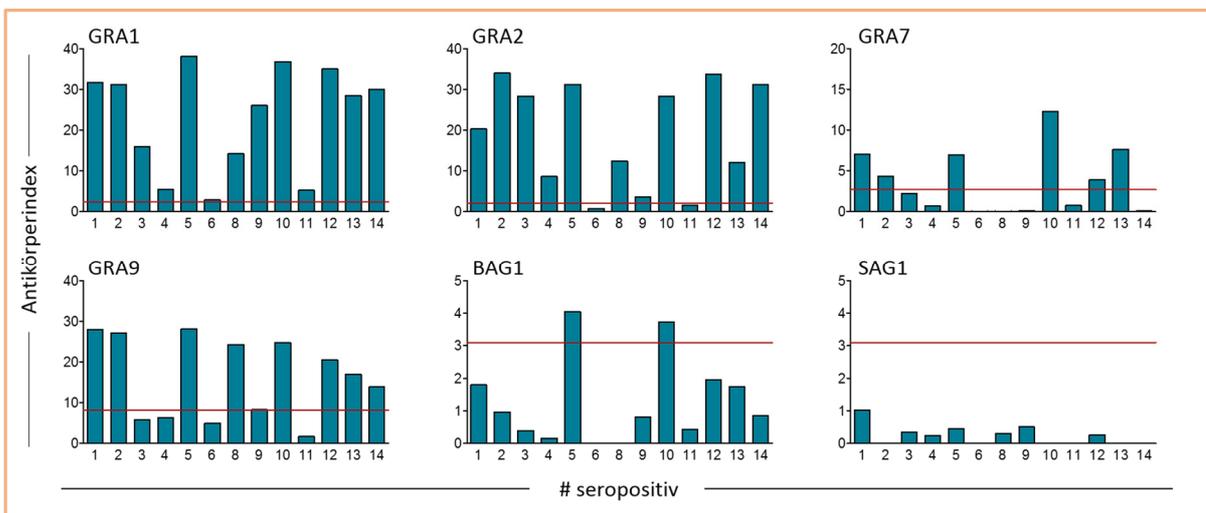
Um zu analysieren ob sich der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen für die Identifizierung einer sattgefundenen *T. gondii* Infektion eignet, wurde der prozentuale Anteil der Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender ermittelt, in denen mindestens eines der getesteten Antigene eine T-Zell-Proliferation induzierte. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 4.6 dargestellt.



**Abbildung 4.6: Anzahl der erkannten rekombinanten Antigene in Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender.** Zellkulturen seropositiver und seronegativer Spender wurden mit 1 µg/ml der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 stimuliert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von <sup>3</sup>HT. Werte die oberhalb der gesetzten cut-off-Werte lagen wurden als spezifische Proliferation gewertet. In der Graphik dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellkulturen, in denen ein oder mehr (≥1) bzw. zwei oder mehr (≥2) rekombinant hergestellte Antigene erkannt wurden.

In 95% aller Zellkulturen der seropositiven Testpersonen erkannten spezifische T-Zellen mindestens eines der rekombinant hergestellten Antigene. 70% der infizierten Spender besaßen T-Zellen, die zwei oder mehr Antigene erkannten. In Zellkulturen der meisten seronegativen Spender waren keine rAG-spezifische T-Zellen detektierbar. In einigen seltenen Fällen (10/48) zeigten die Spenderzellen seronegativer Testpersonen eine proliferative T-Zellantwort, die oberhalb der gesetzten cut-off-Werte lag (siehe auch Tabelle 4.1).

Zusätzlich wurde die Präsenz rAG-spezifischer T-Zellen in Zellkulturen seropositiver Testpersonen mit der Präsenz von IgG Antikörpern gegen diese Antigene (bestimmt mittels Lineblot Analyse) im Serum der einzelnen Spender verglichen. Die Ergebnisse dieser Lineblots sind in Abbildung 4.7 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.2 den Ergebnissen der zellulären Immunantwort gegenübergestellt.



**Abbildung 4.7: Präsenz von IgG Antikörpern gegen rekombinante *T. gondii* Antigene im Serum infizierter Spender.** Die Präsenz von IgG Antikörpern gegen die rekombinanten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7 und GRA9 sowie gegen BAG1 und SAG1 im Serum latent infizierter Spender (nummeriert von 1-14) wurde mittels Lineblot analysiert. Anschließend wurden die Banden densitometrisch quantifiziert. Die Werte der Bandenintensität repräsentieren die Menge an antigenspezifischen IgG Antikörpern, was als „Antikörperindex“ ausgedrückt wird. Die roten Linien geben die jeweiligen cut-off-Werte an. Die Ergebnisse wurden in Kooperation mit Dr. Andrea Hotop (Universitätsmedizin Göttingen) erhalten. Die in Abbildung 4.7 quantitativ dargestellten Werte sind in Tabelle 4.2 zur besseren Übersicht qualitativ dargestellt.

**Tabelle 4.2: Präsenz (+) und Absenz (-) reaktiver T-Zellen (TZ) und IgG Antikörper (AK) gegen rAG von *T. gondii***

Spender#	GRA1		GRA2		GRA7		GRA9		BAG1		SAG1	
	TZ	AK										
1	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
2	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
8	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
9	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
13	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
14	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-

Der Vergleich der Präsenz antigenspezifischer IgG Antikörper im Serum mit dem Vorhandensein reaktiver T-Zellen in Zellkulturen der gleichen seropositiven Spender erlaubte die Einteilung der getesteten *T. gondii* Antigene in drei Gruppen: In der ersten Gruppe befinden sich die Antigene GRA1 und GRA2, die häufig sowohl von T-Zellen als auch von Antikörpern erkannt werden (in der Tabelle grün markiert). GRA7 und GRA9 dienen vorwiegend als Zielstrukturen für die humorale Immunantwort und lassen sich daher einer zweiten Gruppe zuordnen (in der Tabelle rot markiert). SAG1 wird ausschließlich von der zellulären Immunantwort erkannt und gehört damit einer dritten Gruppe an (in der Tabelle dunkel blau markiert).

**Zusammenfassend** ermöglichte der Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch Proliferationsassays die Erkennung *T. gondii* infizierter Spender: Infizierte Testpersonen konnten anhand der Stärke ihrer proliferativen T-Zellantwort auf Toxoplasma Lysat Antigen eindeutig von der nicht infizierten Kontrollgruppe unterschieden werden. Seropositive Spender zeigten eine individuelle zelluläre Immunantwort auf die verwendeten rekombinanten Antigene. 95% aller latent infizierten Testpersonen besaßen spezifische T-Zellen gegen mindestens eines dieser sechs Antigene. Keines der getesteten rekombinant hergestellten Antigene induzierte eine proliferative T-Zellantwort in Zellkulturen aller seropositiven Spender. Zusätzlich ließ sich zeigen, dass insbesondere GRA1, GRA2 und SAG1 als Zielantigene für T-Zellen wichtig sind, während GRA7 und GRA9 eine größere Bedeutung für die humorale Immunantwort besitzen.

#### **4.1.2. Nachweis der *T. gondii*-spezifischen T-Zell-Aktivierung durch Nachweis der IFN $\gamma$ Produktion**

Trotz der positiven Ergebnisse, die durch Proliferationsassays generiert werden konnten, birgt diese Art des Nachweises der T-Zell-Aktivierung in der Routinediagnostik auch einige Nachteile: Neben der langen, sechstägigen Gesamtdauer des Assays, beinhaltet die Verwendung von radioaktiv markiertem Thymidin potentielle Gefahren der Kontamination für Laborpersonal und Umwelt. Ferner gehören proliferative T-Zell-Analysen nicht zu der Standardmethodik in mikrobiologisch-diagnostischen Laboratorien.

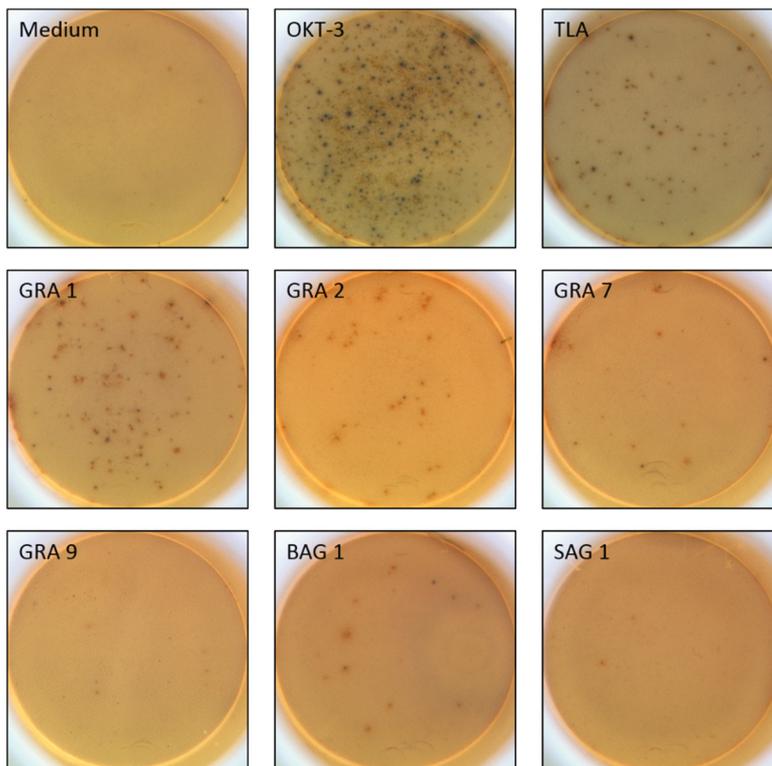
Im Folgenden sollte deshalb alternativ die T-Zell-Aktivierung anhand von praxisnäheren Messmethoden nachgewiesen werden. Dabei wurde die Produktion von IFN $\gamma$  durch antigenspezifische T-Zellen zum einen mit Hilfe des „Enzyme Linked Immuno Spot Assay“ (ELISpot) und zum anderen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) detektiert.

##### **Detektion der IFN $\gamma$ Produktion mittels ELISpot**

Mit Hilfe des ELISpot-Assays können individuelle Zellen, die spezifische Zytokine sekretieren, detektiert werden. Damit ermöglicht diese Methode quantitative Aussagen zur antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung.

Zum Nachweis der T-Zell-Aktivierung wurde ein kommerziell erhältliches Dual-Farben IFN $\gamma$ /Interleukin 4 (IL-4) ELISpot-System verwendet, mit dessen Hilfe simultan die Frequenz IFN $\gamma$ - und IL-4-sezernierender Zellen quantifiziert werden kann. Die Zytokin Produktion aktivierter Zellen wird mittels Antikörpern als farbige Punkte (Spots) auf einer Membran sichtbar gemacht. Dabei repräsentiert in erster Näherung jeder blaue Punkt eine IL-4-sezernierende Zelle, jeder rote Punkt eine IFN $\gamma$ -sezernierende Zelle.

In Abbildung 4.8 ist exemplarisch das Ergebnis einer ELISpot-Untersuchung eines seropositiven Spenders gezeigt. Die Ergebnisse sechs latent infizierter (Spender #2/ #5/ #6/ #7/ #8, s.o.) und zweier nicht infizierter Testpersonen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.



**Abbildung 4.8: Exemplarische photographische Aufnahme eines ELISpots.** Zellen eines seropositiven Spenders wurden mit  $10^6$  lysierten RH Parasiten pro ml (TLA) oder  $1 \mu\text{g/ml}$  der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 versetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit OKT3 stimuliert, als Negativ-Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte die Entwicklung des ELISpots nach Herstellerangaben. Dabei repräsentieren die blauen Spots IL-4 positive Zellen, die roten IFN $\gamma$ -produzierende Zellen.

**Tabelle 4.3: Quantifizierung IL-4 und IFN $\gamma$  positiver Zellen in Zellkulturen sechs seropositiver Testpersonen (sero<sup>+</sup>; 2/8/7/9/5/6) und zweier seronegativer Spender (sero<sup>-</sup>). PBMC wurden wie in Abbildung 4.8 beschrieben kultiviert und die Spots mit Hilfe eines Binokulars visuell quantifiziert. In der Tabelle aufgeführt sind die Mittelwerte, die sich bei der Auszählung von Zweifachansätzen ergaben. In der OKT3-Positiv-Kontrolle waren bei allen Spendern mehr als einhundert blaue und rote Spots vorhanden (Daten in der Tabelle nicht gezeigt). Als cut-off-Wert wurde die höchste Anzahl an detektierbaren Spots innerhalb der seronegativen Gruppe festgelegt (zwei Spots), sodass drei oder mehr Spots als Nachweis der T-Zell-Aktivierung galten. Werte, die oberhalb des cut-offs lagen, sind in der Tabelle fett gedruckt.**

# sero <sup>+</sup>	2		8		7		9		5		6		sero <sup>-</sup>		sero <sup>-</sup>	
	b	r	b	r	b	r	b	r	b	r	b	r	b	r	b	r
Negativ-Kontrolle	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
TLA	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	1	<b>8</b>	1	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>43</b>	0	0	0	0
GRA1	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	0	0	1	0	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	0	0	0	0
GRA2	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	0	<b>5</b>	1	<b>9</b>	0	0	0	0
GRA7	2	0	0	0	2	<b>8</b>	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0
GRA9	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BAG1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	<b>3</b>	0	0	0	0
SAG1	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	<b>3</b>	<b>5</b>	0	1	0	2	0	0

Tendenziell konnten in nahezu allen Ansätzen mehr rote als blaue Spots und damit eine höhere Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Zellen im Vergleich zur Frequenz IL-4-produzierender Zellen detektiert werden. Da antiparasitäre Effekte hauptsächlich von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen ausgelöst werden, wird diesen Zellen in der Routinediagnostik besondere Bedeutung zugemessen. In Zellkulturen aller seropositiven Spender bildeten sich nach Stimulation mit TLA mindestens 8 rote Spots, die für IFN $\gamma$ -produzierende T-Zellen stehen. Somit konnten in allen sechs Zellkulturen seropositiver Spender eindeutig aktivierte, IFN $\gamma$ -produzierende T-Zellen nachgewiesen werden. Zellen der seronegativen Kontrollgruppe dagegen blieben inaktiv und produzierten unter den gleichen Kultivierungsbedingungen keine roten oder blauen Spots.

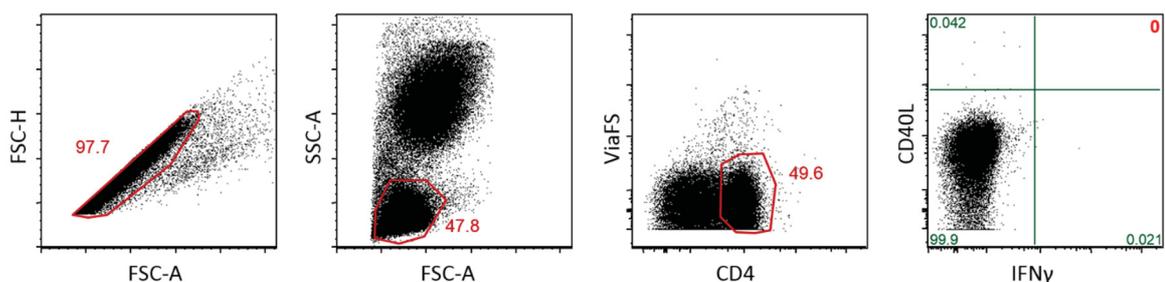
Bei der Analyse der Reaktivität mit den rekombinanten Antigenen waren IFN $\gamma$ -produzierende Zellen am häufigsten nach einer Stimulation mit GRA2 (5 von 6), GRA1 (4 von 6) und SAG1 (3 von 6) detektierbar. Die besondere Bedeutung dieser Antigene für die zelluläre Immunantwort wurde auch vorher anhand der Proliferationsassays (Tabelle 4.1) gezeigt. Die Kultivierung der Zellen seropositiver Spender in Anwesenheit von BAG1 und GRA7 führte in jeweils einer von sechs Zellkulturen zur IFN $\gamma$  Sekretion. GRA9 konnte in keinem Fall eine IFN $\gamma$  Produktion auslösen. Keines der getesteten, rekombinant hergestellten Antigene induzierte eine Aktivierung IFN $\gamma$ -produzierender Zellen in Kulturen aller seropositiven Spender, jedoch besaßen alle infizierten Testpersonen spezifische T-Zellen gegen mindestens eines der Antigene. PBMC der zwei seronegativen Spender blieben nach Stimulation mit allen rAG inaktiv und produzierten kein IFN $\gamma$ .

### Detektion der IFN $\gamma$ Produktion mittels Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

Eine weitere Methode um die Aktivierung von T-Zellen und die damit verbundene IFN $\gamma$  Produktion nachzuweisen, bietet die durchflusszytometrische Analyse. Die Vorteile einer FACS-Messung gegenüber Proliferations- und ELISpot-Assays liegen zum einen in der kurzen Gesamtdauer der Analyse (ca. 24 Stunden) und zum anderen in der einfachen Handhabung: Im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden kann für die FACS-Analyse mit Vollblut gearbeitet werden, sodass die zeitaufwändige Aufreinigung der PBMC entfällt. Außerdem ist in durchflusszytometrischen Analysen eine Quantifizierung aktivierter, IFN $\gamma$ -produzierender Zellen möglich.

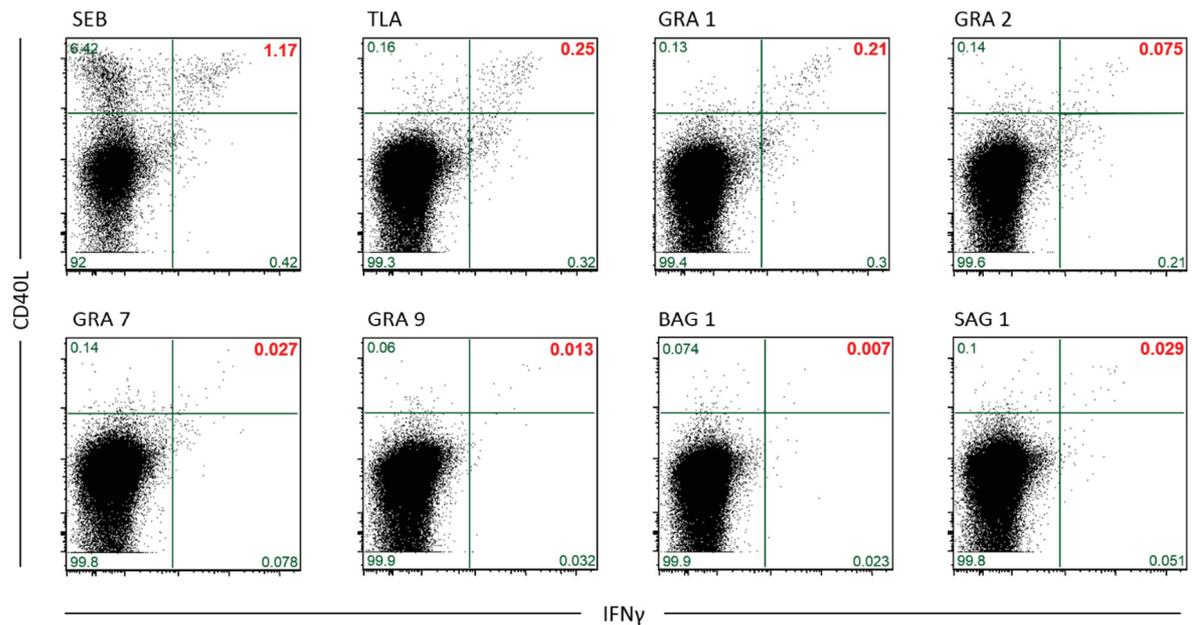
Die Aktivierung der T-Zellen wurde anhand der Expression von CD40L erfasst. Durch Kultivierung der Zellen in Anwesenheit eines Sekretionsinhibitors konnte gleichzeitig intrazellulär die Produktion von IFN $\gamma$  detektiert werden.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse von Zellen eines seropositiven Spenders sind exemplarisch in den Abbildungen 4.9 und 4.10 dargestellt. Abbildung 4.11 vergleicht zusätzlich die Ergebnisse dieses infizierten Spenders mit den Ergebnissen eines nicht infizierten Spenders.



**Abbildung 4.9: Gating Strategie zur durchflusszytometrischen Detektion aktivierter, IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen.** Vollblut eines seropositiven Spenders wurde mit einem Viabilitätsfarbstoff (ViaFS) sowie CD4, CD40L und IFN $\gamma$ -spezifischen Antikörpern gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Im ersten Schritt wurde „Forward Scatter Area“ (FSC-A) gegen „Forward Scatter Height“ (FSC-H) aufgetragen, um so Zell-Aggregate auszuschließen und nur die Einzelzellen in die Analyse einzuschließen. Anhand der Analyse der Einzelzellen im Kanal FSC-A gegen SSC-A wurden dann die Lymphozyten anhand ihrer Granularität und Größe definiert. Mittels der Gegenüberstellung von ViaFS gegen CD4 erfolgte die Abgrenzung lebender, CD4 positiver T-Zellen. Anhand der Analyse der Farbstoffe für den CD40L und den IFN $\gamma$  Antikörper wurden schließlich CD40L/IFN $\gamma$  doppelt positive von CD40L bzw. IFN $\gamma$  einfach positiven und CD40L/IFN $\gamma$  doppelt negativen T-Zellen unterschieden. Abgebildet sind hier Zellen eines *T. gondii* seropositiven Spenders, die nicht mit Antigenen aktiviert wurden und somit die Negativ-Kontrolle darstellen.

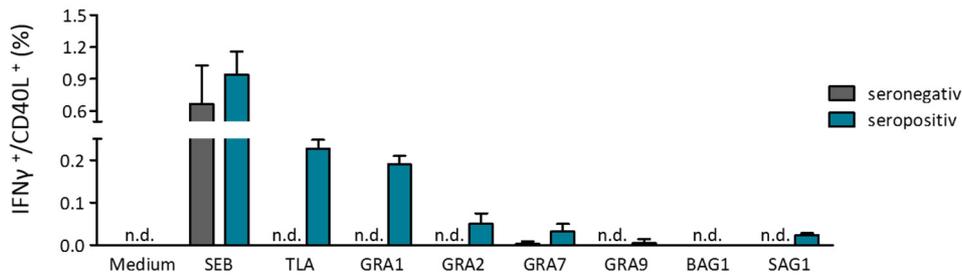
Wurden die Zellen eines *T. gondii* infizierten Spenders ohne einen Stimulus kultiviert, konnten keine aktivierten, IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen detektiert werden.



**Abbildung 4.10: Expression von CD40L und IFN $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit Toxoplasmen-Antigen.** Vollblut einer seropositiven Testperson wurde über Nacht in Anwesenheit der angegebenen, rekombinanten *T. gondii* Antigene bzw. in Anwesenheit von Staphylokokkus Enterotoxin B (SEB; Positiv-Kontrolle) oder Toxoplasma Lysat Antigen (TLA) kultiviert. Zusätzlich wurden alle Kulturen mit dem Sekretionshemmer Brefeldin A versetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Zellen mit einem Viabilitätsfarbstoff (ViaFS) sowie CD4, CD40L und IFN $\gamma$  spezifischen Antikörpern. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die Gating Strategie erfolgte wie in Abbildung 4.9 beschrieben. Hier dargestellt ist die Gegenüberstellung der CD40L und der IFN $\gamma$  Expression. Die in der Abbildung beispielhaft dargestellten FACS Plots repräsentieren die Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Ansätzen.

Nach Stimulation der PBMC mit Staphylokokkus Enterotoxin B (SEB), konnte in 1,17% der CD4 positiven T-Zellen sowohl die Expression des Aktivierungsmarkers CD40L als auch die Präsenz von intrazellulär angefärbtem IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. Dies entsprach dem erwarteten Wert einer SEB-Positiv-Kontrolle, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass sowohl die Kultivierung als auch die Färbung der Zellen gelungen war und somit auch alle weiteren Messungen auswertbar waren.

Bei Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von Toxoplasma Lysat Antigen exprimierten, bei gleichzeitiger Produktion von IFN $\gamma$ , 0,25% der Zellen den Aktivierungsmarker CD40L. Die Frequenz CD40L/IFN $\gamma$  doppelt positiver Zellen, die nach Stimulation der Zellen mit den verschiedenen rekombinanten *T. gondii* Antigenen detektiert werden konnte, variierte: Die meisten aktivierten, IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen waren nach Kultivierung des Vollblutes in Anwesenheit von GRA1 (0,21%), gefolgt von Kultivierung in Anwesenheit von GRA2 (0,075%) detektierbar. Stimulation mit GRA7 bzw. SAG1 induzierte eine geringere Anzahl von Zellen, die simultan CD40L exprimierten und IFN $\gamma$  produzierten (0,027% bzw. 0,029%). Nach Inkubation des Vollblutes in Anwesenheit von GRA9 bzw. BAG1 waren kaum CD40L/IFN $\gamma$  doppelt positive Zellen detektierbar (0,013% bzw. 0,007%).



**Abbildung 4.11: Vergleichende Darstellung der Frequenz aktivierter, IFN $\gamma$ -produzierender Zellen eines seronegativen und eines seropositiven Spenders.** Vollblut einer infizierten (blau) und einer nicht infizierten Testperson (grau) wurde wie in Abbildung 4.10 beschrieben kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. In der Graphik abgebildet ist der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, bei denen sowohl die Expression des Aktivierungsmarkers CD40L als auch die Produktion von IFN $\gamma$  nachgewiesen werden konnte. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SD, die sich aus Dreifachbestimmungen ergaben. n.d.= nicht detektierbar

Bei Kultivierung des Vollbluts beider Spender (*T. gondii* seropositiv und -negativ) in Anwesenheit von SEB konnte ein vergleichbarer prozentualer Anteil an aktivierten Zellen detektiert werden, die ebenso IFN $\gamma$  produzierten. In den Mediumkontrollen beider Testpersonen konnten dagegen keine aktivierten, IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen detektiert werden.

Während 0,25% der Zellen des latent infizierten Spenders bei Kultivierung in Anwesenheit von TLA den Aktivierungsmarker CD40L, bei gleichzeitiger IFN $\gamma$  Produktion exprimierten, waren in TLA-versetzten Zellkulturen des nicht infizierten Spenders keine CD40L/IFN $\gamma$  doppelt positiven Zellen messbar. Ebenso konnten in Zellkulturen des seronegativen Spenders nach Stimulation mit den rekombinanten Antigenen, im Gegensatz zu Zellkulturen des seropositiven Spenders, keine CD40L/IFN $\gamma$  doppelt positiven Zellen detektiert werden.

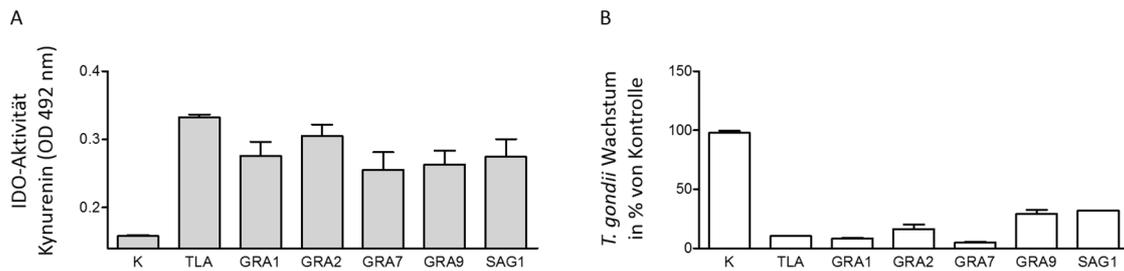
**Zusammenfassend** ermöglichte sowohl die ELISpot-Methode als auch die durchflusszytometrische Analyse die Detektion einer *T. gondii* antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung und IFN $\gamma$  Produktion. Beide Methoden eignen sich daher, um nach Stimulation der Zellen mit TLA bzw. rAG, infizierte Testpersonen eindeutig von nicht infizierten Spendern zu unterscheiden: Infizierte Spender zeigten erneut eine individuelle T-Zell-Aktivierung und IFN $\gamma$  Produktion als Immunantwort auf die getesteten rekombinanten Antigene. Keines der getesteten Antigene induzierte die IFN $\gamma$  Produktion in Zellkulturen aller seropositiven Spender, jedoch besaßen alle getesteten Spender reaktive T-Zellen gegen mindestens eines dieser rekombinanten Antigene.

#### 4.1.3. Protektiver Effekt des T-Zellüberstandes gegenüber *Toxoplasma gondii*

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass *Toxoplasma*-antigenspezifische T-Zellen IFN $\gamma$  produzieren. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob das native IFN $\gamma$  im PBMC-Überstand (ÜS) seropositiver Testpersonen ausreicht, um antiparasitäre Effekte gegenüber *T. gondii* auszulösen. Dazu wurden humane Fibroblasten (HFF) als Wirtszellen für *T. gondii* verwendet. Für diese Zellen ist bekannt, dass IFN $\gamma$  die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert, die im Kulturmedium vorhandenes Tryptophan abbaut. Der Mangel der essentiellen Aminosäure Tryptophan führt dann zur Hemmung des Parasiten-Wachstums.

In Abbildung 4.12 dargestellt ist die IDO-Aktivität sowie das prozentuale Parasiten-Wachstum in HFF, wenn diese in Anwesenheit der ÜS von *Toxoplasma*-Antigen-stimulierten PBMC kultiviert

wurden. Als 100% Wachstum wurde die jeweilige *T. gondii*-Proliferation definiert, die in HFF, welche im ÜS unstimulierter PBMC kultiviert worden waren, gemessen werden konnte.



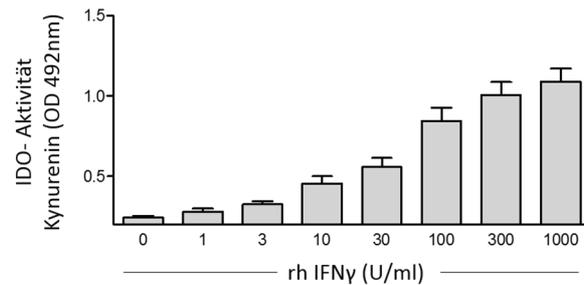
**Abbildung 4.12: Kynurenin Produktion und Parasiten-Wachstum in HFF bei Kultivierung in Anwesenheit von PBMC-ÜS.** PBMC seropositiver Spender wurden mit TLA oder den angegebenen rAG (1 µg/ml) stimuliert. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturüberstände geerntet und 1:4 verdünnt zur Kultivierung von HFF verwendet. Nach 72 Stunden erfolgte der Nachweis des Tryptophan-Abbauproduktes Kynurenin im Überstand der HFF mittels der Ehrlich-Methode (A). Die Graphik zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus den gemittelten Doppelbestimmungen bei Kultivierung der HFF in Anwesenheit der Überstände von 8 unterschiedlichen seropositiven Testpersonen ergaben. Gleichzeitig mit der Kynureninmessung erfolgte die Infektion der HFF mit  $5 \times 10^4$  *T. gondii* Typ I Parasiten (RH; Abbildung B). Das Parasiten-Wachstum wurde nach weiteren drei Tagen über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil ( $^3\text{H}$ U) quantifiziert. Die Graphik zeigt repräsentativ das Ergebnis der Parasiten-Proliferation in HFF, die im Überstand eines seropositiven Spenders kultiviert worden waren (Mittelwerte  $\pm$ SD von Doppelbestimmungen).

Wurden humane Fibroblasten in Anwesenheit von PBMC-Überständen kultiviert, die nach TLA-Stimulation bzw. rAG-Stimulation von Zellen seropositiver Testpersonen geerntet wurden, so konnte eine Produktion von Kynurenin nachgewiesen werden. Bei Kultivierung der HFF im Überstand von nicht stimulierten PBMC (K), konnte keine, über der Mediumkontrolle liegende, Kynurenin Produktion gemessen werden (Abbildung 4.12 A). Wie erwartet konnten nur die HFF, die nach Stimulation mit den Überständen Kynurenin produzierten, das Wachstum von Toxoplasmen hemmen (Abbildung 4.12 B). Dies lässt vermuten, dass natives IFN $\gamma$ , das als Konsequenz einer TLA- bzw. Antigen-vermittelten Aktivierung von Memory-T-Zellen seropositiver Spender im Zellüberstand präsent war, die Aktivität des IDO Enzyms induzierte, welches seinerseits antiparasitär gegen *T. gondii* Typ I (RH) wirkte.

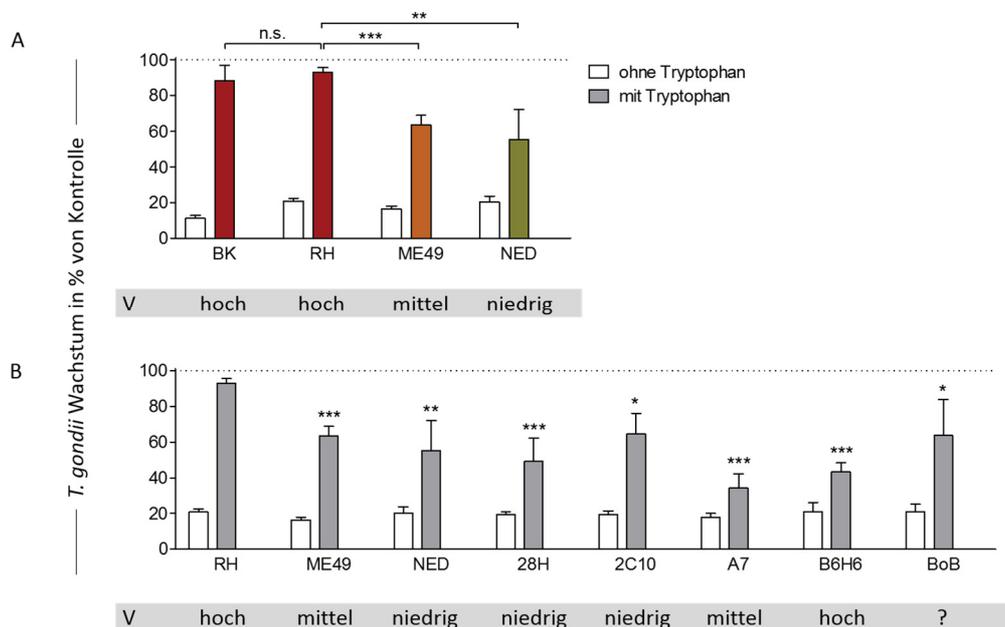
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die IFN $\gamma$ -induzierte Aktivität des IDO Enzyms auch antiparasitäre Effekte gegen die anderen typischen (BK, ME49 und NED) und atypischen (28H, 2C10, A7, B6H6, BoB) *T. gondii* Stämme vermitteln kann.

Abbildung 4.13 zeigt zunächst die Aktivität des IDO Enzyms nach Stimulation humaner Fibroblasten mit rekombinantem, humanem IFN $\gamma$  (rh IFN $\gamma$ ).

In Abbildung 4.14 ist das prozentuale Parasiten-Wachstum der unterschiedlichen *T. gondii* Stämme in humanen Fibroblasten dargestellt. Als einhundert prozentiges (maximales) Wachstum wurde die jeweilige *T. gondii*-Proliferation definiert, die in unstimulierten HFF und in Abwesenheit von Tryptophan detektiert werden konnte. Die Abbildung zeigt, zu welchem prozentualen Anteil das Wachstum der unterschiedlichen *T. gondii* Stämme bei einer IFN $\gamma$ -induzierten Parasiten-Hemmung von ca. 80% (weiße Balken) durch die Zugabe von Tryptophan wiederhergestellt werden konnte (gefüllte Balken).



**Abbildung 4.13: Kynurenin Produktion in HFF nach Stimulation mit rh IFNγ.** Humane Fibroblasten wurden für drei Tage in Anwesenheit verschiedener IFNγ Konzentrationen (0-1000 U/ml) in Tryptophan-supplementiertem Medium (100 µg/ml) inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die Messung der IDO-Aktivität über die Quantifizierung von Kynurenin im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Ehrlich-Methode. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, die sich aus Mittelwerten von Triplikaten aus drei unabhängigen Versuchen ergaben.



**Abbildung 4.14: IFNγ-vermittelte Hemmung des Wachstums unterschiedlicher T. gondii Stämme in HFF.** Humane Fibroblasten wurden drei Tage lang in Anwesenheit von IFNγ kultiviert. Am dritten Tag erfolgte die Infektion mit  $10^5$  Parasiten des jeweils angegebenen Stammes. Die Quantifizierung der Parasiten-Proliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv-markiertem Uracil ( $^3\text{H}$ U). Die gepunktete Linie gibt das Wachstum der Parasiten an, das bei Kultivierung der Zellen in Zellkulturmedium gemessen werden konnte (100%). In die Auswertung aufgenommen wurden nur solche Proben, bei denen die verwendete IFNγ Dosis eine ca. achtzig prozentige Hemmung des Parasiten-Wachstums vermittelte (weiße Balken). Die unterschiedlich farbig gefüllten Balken geben die jeweilige prozentuale T. gondii-Proliferation an, die nach Tryptophan-Supplementierung (100 µg/ml) dieser Zellkulturen gemessen wurde. Außerdem ist die individuelle in vivo Virulenz (V) der unterschiedlichen Parasiten Stämme mit hoch, mittel oder niedrig angegeben. In (A) ist das Wachstum der typischen und in (B) zusätzlich das der atypischen T. gondii Stämme dargestellt. In den Graphiken gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM, die sich aus gemittelten Werten von Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ergaben. Signifikante Unterschiede der Tryptophan-Antagonisierbarkeit unterschiedlicher Toxoplasmen Stämme sind mit Sternchen markiert. In (B) beziehen sie sich auf die Tryptophan-Antagonisierbarkeit des RH Stammes (Student's t-Test \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.01$ ).

Wie aus vorherigen Veröffentlichungen bekannt, induziert die Stimulation humaner Fibroblasten mit rekombinantem IFNγ die Aktivität des IDO Enzyms. Dies konnte durch die Präsenz von Kynurenin im Zellkulturüberstand auch in diesem Experiment nachgewiesen werden. Die Menge an produziertem Kynurenin stieg mit der Konzentration des eingesetzten IFNγ an (Abbildung 4.13).

Bei den beiden hoch virulenten Typ-Stämmen, BK und RH, führte die Zugabe von Tryptophan zu einer vollständigen Aufhebung des antiparasitären Effekts (Abbildung 4.14 A, rote Balken). Im Gegensatz dazu konnte das Wachstum der geringer virulenten *T. gondii* Stämme ME49 und NED signifikant schlechter antagonisiert werden (63% bzw. 55%).

Bei keinem der atypischen Stämme konnte eine Tryptophan-Supplementation eine vollständige Aufhebung der Parasiten-Hemmung vermitteln (Abbildung 4.14 B; graue Balken). Die höchste prozentuale Parasiten-Proliferation ließ sich nach Zugabe von Tryptophan in BoB und 2C10 infizierten Zellkulturen detektieren (ca. 65%). Das Wachstum des *T. gondii* Stammes 28H konnte durch Tryptophan-Zugabe zu ca. 49%, das des B6H6 Stammes zu 43% wiederhergestellt werden. In Tryptophan-supplementierten Zellkulturen, die mit dem atypischen Parasiten Stamm A7 infiziert waren, wurde ein Wachstum von ca. 34% erreicht. Somit liegt die Vermutung nahe, dass neben derIDO ein weiterer IFN $\gamma$ -vermittelter antiparasitärer Effektormechanismus auf die niedriger virulenten Stämme wirkt.

Vergleicht man die genotypisch hoch virulenten *T. gondii* Stämme RH/BK mit dem atypischen B6H6 Stamm zeigt sich, dass das Ausmaß der Tryptophan-Antagonisierbarkeit keinen Rückschluss auf ihre phänotypische Virulenz zulässt.

**Zusammenfassend** zeigen die Daten, dass T-Zellen nach Stimulation mit Toxoplasmen-Antigen in ausreichenden Mengen IFN $\gamma$  produzieren, um IDO-abhängige, antiparasitäre Effekte gegenüber *Toxoplasma gondii* Typ I zu vermitteln. Zusätzliche Analysen zeigen, dass es in humanen Fibroblasten neben der IDO einen weiteren Abwehrmechanismus geben muss, der selektiv gegen niedrig virulente Toxoplasmen Stämme aktiv ist.

#### **4.2. Analyse der immunologischen Relevanz sekretorischer *T. gondii* Antigene als Zielstrukturen für die T-Zellantwort in experimentell infizierten Schweinen**

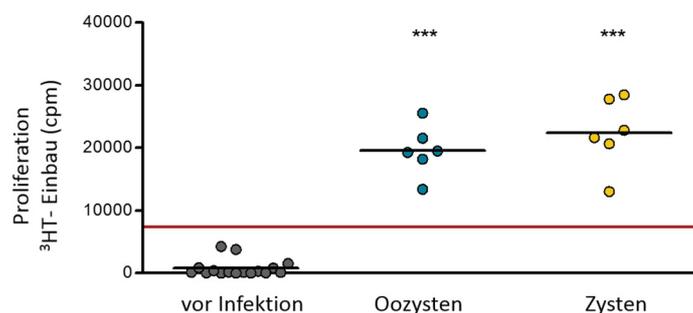
Die Toxoplasmose ist eine Zoonose, was bedeutet, dass die Parasiten vom Tier auf den Menschen übertragen werden können. Eine der wichtigsten Infektionsquellen für Menschen stellt die Präsenz von *T. gondii* Zysten im Fleisch von Zwischenwirten dar. Durch den Konsum von rohem oder ungesundem Fleisch kann *T. gondii* auf den Menschen übertragen werden. Da in Deutschland Schweinefleisch den größten Anteil des konsumierten Fleisches einnimmt, soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob sich eine *T. gondii* Infektion bei Schweinen durch eine T-Zell-basierte Diagnostik unter Verwendung von TLA bzw. der ausgewählten, rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene nachweisen lässt.

Zu diesem Zweck wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Astrid Tenter (Tierärztliche Hochschule, Hannover) Schweine experimentell mit *T. gondii* Zysten bzw. Oozysten infiziert. Im Verlauf der experimentellen Infektion wurden regelmäßig Blutproben entnommen, PBMC isoliert und in *in vitro* Stimulationsversuchen eingesetzt. Der Nachweis einer Aktivierung antigenerfahrener Lymphozyten erfolgte durch T-Zell-Proliferationsassays, sowie anhand der Detektion von IFN $\gamma$  mittels ELISA.

#### 4.2.1. Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch Proliferationsassays

In ersten Experimenten wurde die TLA-abhängige *in vitro* Aktivierbarkeit von spezifischen T-Zellen aus experimentell infizierten Schweinen nachgewiesen. Für die T-Zell-Proliferationsassays wurde eine TLA-Konzentration von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml eingesetzt, da bei dieser Verdünnung in Vorversuchen maximale Proliferation zu detektieren war. Die Kulturdauer der Zellen wurde ebenfalls in Vorversuchen auf 3 Tage festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine starke TLA-spezifische Proliferation und gleichzeitig eine geringe unspezifische Vermehrung der Zellen in Kulturmedium beobachtet werden. Wurde eine längere Kulturdauer gewählt, so war die unspezifische Zell-Vermehrung stärker ausgeprägt.

Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch die TLA-spezifische T-Zell-Proliferation in Zellkulturen von Schweinen vor Infektion sowie 21 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii* Oozysten bzw. Zysten.



**Abbildung 4.15: TLA-spezifische Proliferation in Zellkulturen infizierter und nicht infizierter Schweine.** PBMC von Tieren vor Infektion (grau) bzw. von Schweinen 21 Tage nach Infektion mit *T. gondii* Oozysten ( $n=6$ ; blau) oder Zysten ( $n=6$ ; gelb) wurden in Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml (Stamm RH) kultiviert. Nach drei Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von  $^3\text{HT}$ . In der Graphik dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere (Punkte; Mittelwerte von Dreifachbestimmungen), sowie die Mittelwerte aller Gruppen (schwarze Linien). Die Werte der Proliferation in Kulturmedium (Negativ-Kontrolle) sind jeweils abgezogen. Die rote Linie gibt den cut-off-Wert an. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test nachgewiesen und beziehen sich auf die Werte vor Infektion (\*\*\*) ( $p < 0.0001$ ).

Wurden porcine PBMC vor der experimentellen Infektion mit *T. gondii* isoliert, konnte bei Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von Toxoplasma Lysat Antigenen nur eine basale Zell-Vermehrung detektiert werden. Nach der experimentellen Infektion mit Oozysten bzw. Zysten war im Gegensatz dazu eine deutliche, signifikant höhere T-Zell-Proliferation in TLA-versetzten Zellkulturen zu beobachten.

Nach Festlegung eines cut-off-Wertes (Mittelwert der Proliferation in TLA-versetzten Zellkulturen nicht infizierter Tiere plus der fünffachen Standardabweichung) konnte deutlich zwischen TLA-spezifischer und unspezifischer Zell-Vermehrung unterschieden werden. Nach Stimulation mit TLA konnten somit in allen Zellkulturen der experimentell infizierten Tiere, nicht jedoch in Zellkulturen der Tiere vor Infektion, spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Das Ausmaß der TLA-spezifischen Proliferation als Konsequenz einer Infektion mit *T. gondii* Oozysten unterschied sich nicht signifikant von der Zell-Vermehrung, die nach Infektion mit Zysten zu detektieren war.

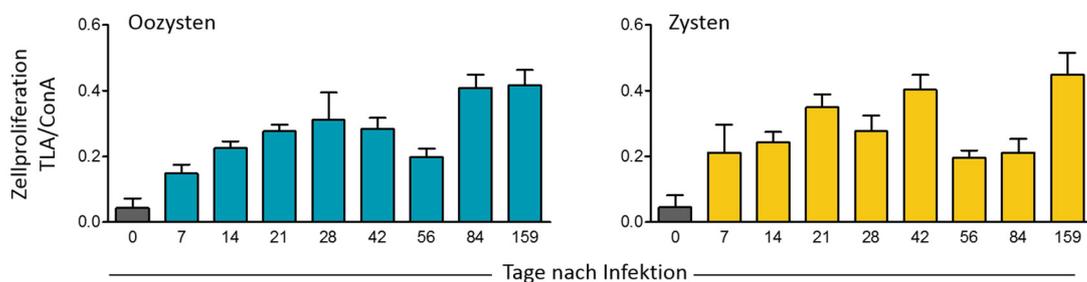
Im Folgenden sollte die Proliferationskapazität TLA-spezifischer T-Zellen im Verlauf der Infektion analysiert und quantifiziert werden. Dazu wurden in den ersten vier Wochen nach Infektion wöchentlich PBMC aus Blutproben der infizierten Tiere isoliert (7, 14, 21, 28 Tage nach Infektion). Ab der fünften Infektionswoche erfolgte die Entnahme in einem zeitlichen Abstand von zwei

Wochen (42, 56 Tage nach Infektion). Die vorletzten Proben wurden 84 Tage, die letzten 159 Tage nach Infektion entnommen.

Aufgrund der langen Zeitspanne, über die sich die beschriebene Analyse zog, war es nicht möglich alle Reagenzien in identischen Chargen zu verwenden: So mussten beispielsweise verschiedene Chargen an Fötalem Kälberserum (FCS) zur Kultivierung der PBMC verwendet werden. Die Konzentration an Inhaltsstoffen kann sich in verschiedenen FCS Chargen unterscheiden. Auch das verwendete  $^3\text{HT}$  und das selbst hergestellte TLA unterliegen Qualitätsschwankungen.

Um diese Unterschiede zumindest teilweise auszugleichen, wurde die TLA-spezifische Proliferation ins Verhältnis zur Proliferation der Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA) gesetzt. Das Lektin ConA stimuliert als Mitogen die Proliferation aller T-Zellen und kann somit für die Analyse der generellen Proliferationskapazität der Zellen verwendet werden.

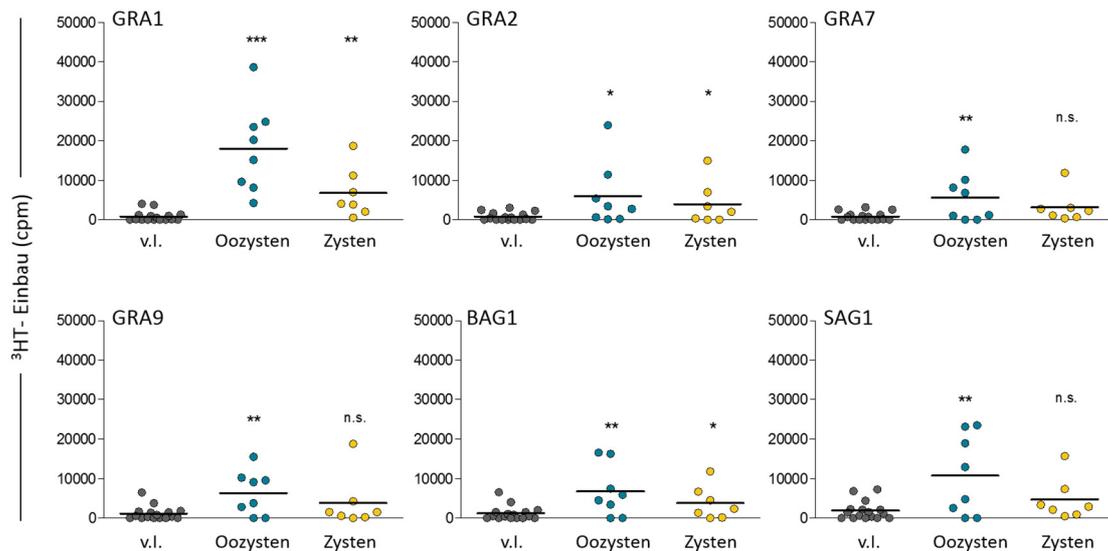
In Abbildung 4.16 ist die TLA-induzierte T-Zell-Proliferation im Verhältnis zur Zell-Vermehrung nach ConA Stimulation im Verlauf der Infektion mit Oozysten (blau) und Zysten (gelb) dargestellt.



**Abbildung 4.16: TLA-spezifische Proliferation porciner PBMC im Verlauf einer experimentellen *T. gondii* Infektion.** PBMC von Tieren, die mit *T. gondii* Oozysten (blau) oder Zysten (gelb) infiziert worden waren, wurden an den angegebenen Tagen nach der Infektion isoliert und in Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml (Stamm RH) kultiviert. Nach drei Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von  $^3\text{HT}$ . Alle Proliferationswerte, die in TLA-versetzten Zellkulturen gemessen wurden, sind im Verhältnis zur Zell-Vermehrung in Anwesenheit von ConA dargestellt. In der Graphik zusammengefasst sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus gemittelten Triplikaten von mindestens vier einzelnen Tieren ergaben. Die Werte der Proliferation in Kulturmedium (Negativ-Kontrolle) sind jeweils abgezogen.

Die Infektion mit *T. gondii* Oozysten und Zysten war zu jedem analysierten Zeitpunkt anhand der TLA-spezifischen T-Zell-Proliferation erkennbar: Während in TLA-versetzten Zellkulturen nicht infizierter Schweine nur eine basale Zell-Vermehrung gemessen wurde (0 Tage nach Infektion; graue Balken), konnte eine weitaus stärkere Proliferation detektiert werden, wenn Zellen infizierter Tiere in Anwesenheit des Lysats kultiviert wurden. Überraschenderweise konnte bereits sieben Tage nach der Infektion eine starke TLA-spezifische Proliferation beobachtet werden. Tendenziell stieg die Proliferationsrate in Zellkulturen infizierter Tiere im Verlauf der Infektion an, wobei kein Unterschied zwischen der Infektion mit Oozysten und der Infektion mit Zysten festgestellt werden konnte.

Des Weiteren wurde analysiert, ob experimentell infizierte Schweine T-Zellen besitzen, die eine Spezifität für die Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 und SAG1 aufweisen. Abbildung 4.17 zeigt exemplarisch die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf Stimulation mit den verschiedenen rekombinanten Antigenen (rAG) 28 Tage nach der Infektion.



**Abbildung 4.17: AG-spezifische Proliferation experimentell infizierter und nicht infizierter Schweine.** Zellkulturen von Schweinen, die experimentell mit *T. gondii* Oozysten (blau) oder Zysten (gelb) infiziert worden waren bzw. Zellkulturen derselben Tiere vor der Infektion (grau; v.l.), wurden mit 1 µg/ml der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 versetzt. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von <sup>3</sup>HT. In der Graphik dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere (Punkte) sowie die jeweiligen Mittelwerte der drei Gruppen (schwarze Linien). Die Werte der Negativ-Kontrolle sind jeweils abgezogen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test nachgewiesen und beziehen sich jeweils auf die Werte vor Infektion (\*\**p* < 0.0001, \*\**p* < 0.001, \**p* < 0.01).

Bei Kultivierung porciner PBMC in Anwesenheit der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene konnte in Zellkulturen der experimentell infizierten Schweine tendenziell eine signifikant erhöhte Proliferation, bezogen auf die Zell-Vermehrung vor Infektion, gemessen werden.

Die Stimulation der Spenderzellen unterschiedlicher Schweine mit den zu testenden Antigenen induzierte individuelle, proliferative T-Zellantworten. Keines der getesteten, rekombinant hergestellten Antigene wurde in Zellkulturen aller infizierten Schweine erkannt. Besonders häufig konnte jedoch die Präsenz GRA1-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden.

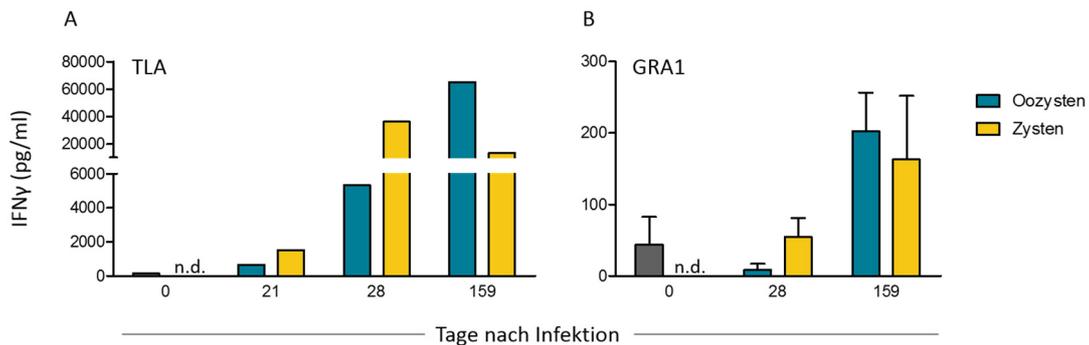
Die beschriebene Präsenz antigenspezifischer T-Zellen in Zellkulturen experimentell infizierter Tiere wurde ab der dritten Woche der Infektion regelmäßig analysiert. Die exemplarisch gezeigte antigenspezifische T-Zell-Aktivierung (28 Tage nach der Infektion) konnte dabei stets in ähnlicher Form induziert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2. Nachweis der Toxoplasmen-Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung anhand der IFN $\gamma$ Produktion

Neben der bereits erwähnten langen Gesamtdauer des Proliferationsassays, sowie den potentiellen Gefahren, die von radioaktiv markiertem Thymidin ausgehen, zeichnete sich bei der Analyse der proliferativen T-Zell-Aktivierung porciner Zellen ein weiterer Nachteil ab: Für die Kultivierung der porcinen PMBC war der Zusatz von FCS zum Medium essentiell, induzierte aber gleichzeitig, abhängig von der Kulturdauer eine unspezifische Zell-Vermehrung im Kulturmedium.

Im Folgenden sollte die T-Zell-Aktivierung deshalb mit Hilfe einer anderen Messmethode, der Detektion von produziertem IFN $\gamma$  mittels „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) nachgewiesen werden. In Abbildung 4.18 ist die TLA- bzw. GRA1-induzierte IFN $\gamma$  Produktion im

Verlauf der Infektion mit Oozysten und Zysten dargestellt. GRA1 wurde ausgewählt, weil das Antigen besonders häufig von T-Zellen erkannt worden war (siehe Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.18: TLA- bzw. GRA1-induzierte IFN $\gamma$  Produktion in Zellkulturen infizierter und nicht infizierter Schweine.** PBMC von Tieren, die mit *T. gondii* Oozysten (blau) oder Zysten (gelb) infiziert worden waren, wurden an den angegebenen Tagen nach der Infektion bzw. vor Infektion (grau) isoliert und in Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml (A; Stamm RH) oder in Anwesenheit von  $1\mu\text{g/ml}$  GRA1 (B) kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen. Die Überstände von Zellen, die mit TLA inkubiert worden waren, wurden gruppenweise gepoolt (3 Gruppen: vor Infektion/ Infektion mit Oozysten/ Infektion mit Zysten). In den gepoolten Überständen wurde dann mittels ELISA die Menge an produziertem IFN $\gamma$  quantifiziert. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte, die sich aus Doppelbestimmungen ergaben. Die Menge an IFN $\gamma$  in Zellüberständen aus individuellen, GRA1-stimulierten Kulturen wurde einzeln analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus gemittelten Dubletten von mindestens vier einzelnen Tieren ergaben. Die IFN $\gamma$  Produktion, die in der Negativkontrolle detektierbar war, ist jeweils abgezogen.

Wurden PBMC experimentell infizierter Tiere in Anwesenheit von Toxoplasma Lysat Antigen (TLA) kultiviert, konnte IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand zu jedem analysierten Zeitpunkt (21/ 28/ 159 Tage nach Infektion) detektiert werden. Im Gegensatz dazu war im Überstand von TLA-stimulierten Zellkulturen derselben Tiere vor Infektion nur eine basale IFN $\gamma$  Konzentration messbar. Die Menge an IFN $\gamma$  in TLA-stimulierten Zellkulturen von Tieren, die mit Oozysten bzw. Zysten infiziert worden waren, stieg im Verlauf der Infektion an. Zu frühen Zeitpunkten war in den TLA-stimulierten Zellkulturen der Schweine, die mit Oozysten infiziert worden waren, eine tendenziell höhere IFN $\gamma$  Konzentration detektierbar als in Zellkulturen der mit Zysten infizierten Tiere. In der späten Phase der Infektion (159 Tage nach Infektion) war dieses Verhältnis umgekehrt.

Die Kultivierung der PBMC infizierter Schweine in Anwesenheit der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene induzierte zu jedem analysierten Zeitpunkt eine IFN $\gamma$  Produktion, die zwar signifikant, jedoch nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze lag. Gezeigt sind hier ausschließlich die Daten für GRA1, da mittels der Proliferationsassays besonders häufig die Präsenz GRA1-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 4.17).

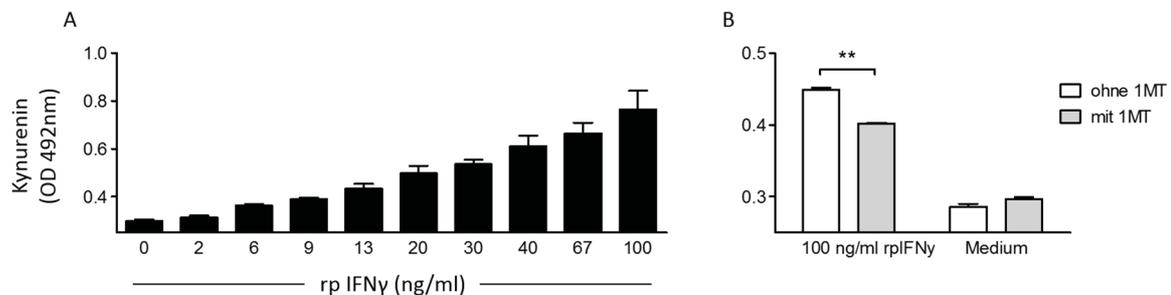
#### 4.2.3. Antiparasitärer Effekt des nativen IFN $\gamma$ im PBMC-Überstand infizierter Schweine

In den vorangegangenen Analysen konnte natives IFN $\gamma$  in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, wenn PBMC infizierter Schweine in Anwesenheit von Toxoplasmen-Antigen kultiviert wurden. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob der Überstand dieser Zellen antiparasitäre Effekte gegenüber einer *T. gondii* Infektion porciner Zellen auslösen kann und ob diese Wirkung auf die Induktion des Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) zurückzuführen ist.

Wie oben bereits erwähnt, vermittelt das Enzym IDO im humanen System IFN $\gamma$ -abhängig den Abbau von Tryptophan und damit einen antiparasitären Effekt gegen *T. gondii*. Diese Aktivität kann durch

den Tryptophan-Antagonisten 1-Methyl-Tryptophan (1MT) gehemmt werden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die antiparasitäre Aktivität des IDO Enzyms auch in der zur Verfügung stehenden, porcinen epithelialen Zell-Linie PCP-R vorhanden ist.

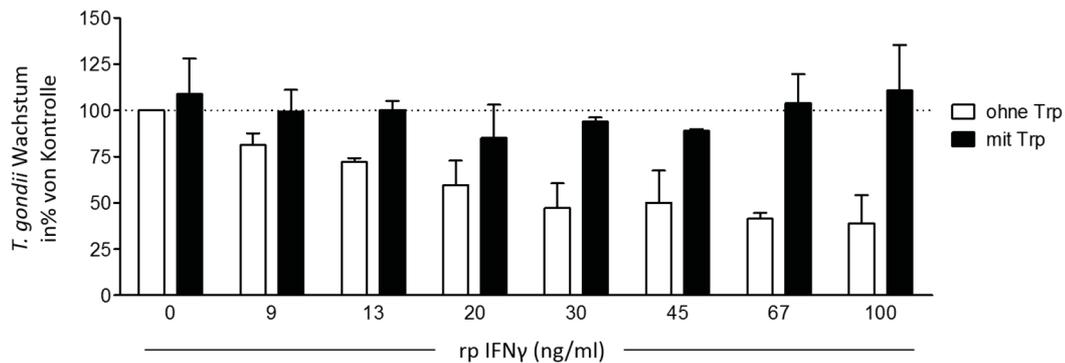
Abbildung 4.19 zeigt daher zunächst die Aktivität des IDO Enzyms nach Stimulation porciner PCP-R Zellen mit rekombinantem, porcinen IFN $\gamma$  (rp IFN $\gamma$ ).



**Abbildung 4.19: IFN $\gamma$ -vermittelte Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen.** Porcine PCP-R Zellen wurden in Anwesenheit der angegebenen IFN $\gamma$  Konzentrationen in Tryptophan-supplementiertem Medium (100  $\mu$ g/ml; A) bzw. ohne den Zusatz von Tryptophan, in An- oder Abwesenheit des IDO-Inhibitors 1MT (B) kultiviert. Nach drei Tagen erfolgte die Messung der IDO-Aktivität über die Quantifizierung von Kynurenin im Zellkulturüberstand mittels der Ehrlich-Methode. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus Mittelwerten von Triplikaten aus drei unabhängigen Versuchen ergaben (A) bzw. die Mittelwerte  $\pm$ SD von Dubletten eines repräsentativ dargestellten Versuches (B). Signifikante Unterschiede wurde mit dem Student's t-Test berechnet und sind mit Sternchen markiert (\*\* $p < 0.001$ ).

Die Stimulation mit rekombinantem IFN $\gamma$  bewirkte eine deutlich messbare Kynurenin Produktion, die wahrscheinlich auf eine IDO Induktion in den porcinen Epithelzellen zurückzuführen ist. Die Menge an Kynurenin, die im Überstand der Zellen messbar war, stieg mit der Dosis des eingesetzten IFN $\gamma$  an (Abbildung 4.19 A). Wurden die PCP-R Zellen dagegen in Medium ohne IFN $\gamma$  inkubiert, war nur eine basale Kynurenin Produktion detektierbar. Bei Kultivierung der Zellen in gleichzeitiger Anwesenheit von IFN $\gamma$  und 1MT konnte, im Vergleich zu Zellkulturen die ausschließlich mit IFN $\gamma$  stimuliert worden waren, eine signifikante IDO Inhibition erreicht werden (Abbildung 4.19 B). Nachdem damit eine IFN $\gamma$ -abhängige Aktivierbarkeit des IDO Enzyms porciner PCP-R Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob der damit verbundene Abbau von Tryptophan ausreichend ist, um einen antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* auszulösen.

In Abbildung 4.20 ist das prozentuale Parasiten-Wachstum in porcinen Epithelzellen dargestellt. Als 100% Wachstum wurde die jeweilige *T. gondii*-Proliferation definiert, die in unstimulierten PCP-R Zellen und in Abwesenheit von zusätzlichem Tryptophan (Trp) gemessen werden konnte (Positiv-Kontrolle).



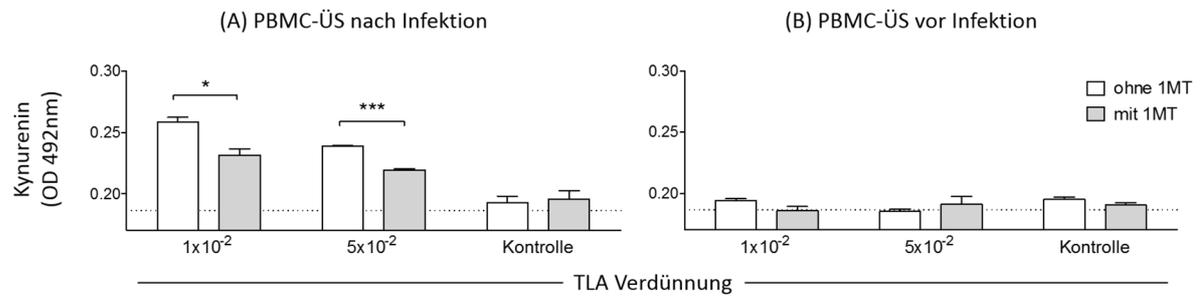
**Abbildung 4.20: IFN $\gamma$ -induzierte Hemmung des *T. gondii*-Wachstums in PCP-R Zellen.** Porcine Epithelzellen wurden in Anwesenheit der angegebenen IFN $\gamma$  Konzentrationen kultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte die Infektion mit je  $10^5$  Typ I *T. gondii* (Stamm RH) pro  $3 \times 10^4$  PCP-R Zellen. Unmittelbar nach der Infektion wurden die Zellkulturen mit Tryptophan supplementiert ( $100 \mu\text{g/ml} = 0,5 \text{ mM}$ ; schwarze Balken) oder blieben unbehandelt (weiße Balken). Das Parasiten-Wachstum wurde nach weiteren drei Tagen über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil ( $^3\text{HU}$ ) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert die *T. gondii* Proliferation, die bei Kultivierung der Zellen in Zellkulturmedium (unstimuliert und nicht supplementiert) gemessen wurde (100%). In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Parasiten-Wachstums  $\pm$ SEM, die sich aus gemittelten Triplikaten von zwei unabhängigen Versuchen ergaben.

Während *Toxoplasma gondii* RH Tachyzoiten in unstimulierten PCP-R Zellen wachsen konnten, war die Parasiten-Proliferation in IFN $\gamma$ -stimulierten, porcinen Epithelzellen erniedrigt. Das Ausmaß dieses antiparasitären Effekts nahm mit der Dosis des eingesetzten IFN $\gamma$  zu und erreichte sein Maximum bei einer IFN $\gamma$  Konzentration von 67 bis 100 ng/ml. Bei dieser Konzentration war das *T. gondii*-Wachstum um mindestens 50% verringert (weiße Balken).

Bei Zugabe von Tryptophan zum Zeitpunkt der Infektion erreichte der Parasit ein Wachstum, welches vergleichbar mit der *T. gondii*-Proliferation in der Positiv-Kontrolle war. Durch Tryptophan-Supplementierung konnte demnach die IFN $\gamma$ -vermittelte Wachstumshemmung des Parasiten vollständig aufgehoben werden (schwarze Balken).

In den beschriebenen Analysen wurde also nachgewiesen, dass die IDO auch im porcinen System wirksam ist. Des Weiteren konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass im Überstand der PBMC infizierter Schweine IFN $\gamma$  vorhanden ist, wenn die Zellen in Anwesenheit von TLA kultiviert wurden (s.o.). Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob dieses native IFN $\gamma$  in ausreichenden Mengen vorliegt, um antiparasitäre Effekte zu vermitteln und inwiefern dabei die Aktivität des IDO Enzyms eine Rolle spielt.

Abbildung 4.21 zeigt die Kynurenin Produktion und die damit verbundene IDO-Aktivität in PCP-R Zellen, die in Anwesenheit von Überständen (ÜS) porciner PBMC kultiviert wurden.

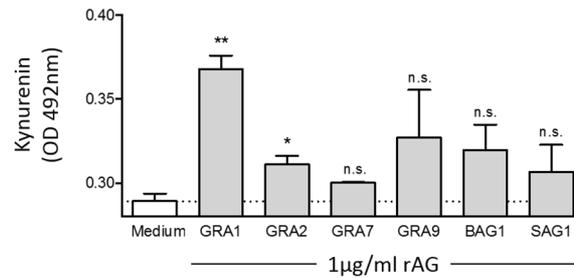


**Abbildung 4.21: Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen bei Kultivierung in Anwesenheit von PBMC-Überständen (TLA).** PBMC von Tieren nach *T. gondii* Infektion (A) bzw. PBMC unbehandelter Tiere (B) wurden in Anwesenheit von TLA (Konzentrationen angegeben) bzw. in Kulturmedium (Kontrolle) kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Überstände von Zellen, die mit gleicher TLA Konzentration stimuliert worden waren, gepoolt (PBMC-ÜS nach Infektion und PBMC-ÜS vor Infektion). Die gepoolten Überstände wurden dann 1:4 in Kulturmedium verdünnt und zur Kultivierung von PCP-R Zellen verwendet. Zusätzlich wurden diese Zellkulturen mit 100 µg/ml 1MT versetzt (graue Balken) oder blieben unbehandelt (weiße Balken). Die gestrichelte Linie gibt die OD bei 492nm an, die bei Kultivierung der Zellen in Medium gemessen werden konnte. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, die sich aus Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen ergaben. Der signifikante Unterschied wurde mit dem Student's t-Test nachgewiesen (\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Wurden porcine Epithelzellen in Anwesenheit von PBMC-Überständen kultiviert, die nach TLA-Stimulation der Zellen infizierter Tiere abgenommen wurden, so konnte eine Produktion von Kynurenin nachgewiesen werden (weiße Balken, Abbildung 4.21 A). Die Menge an Kynurenin, die im Überstand der PCP-R Zellen nachweisbar war, war dabei abhängig von der TLA Konzentration, die zur Stimulation der PBMC verwendet worden war. Je höher konzentriert TLA zur porcinen PBMC-Kultur zugesetzt wurde, desto höher war auch die Kynurenin Produktion, die durch den gewonnenen Überstand induziert werden konnte. In PCP-R Zellkulturen, die zusätzlich mit 1MT versetzt waren, konnte, im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit von 1MT, eine signifikant geringere Produktion von Kynurenin im Überstand detektiert werden (graue Balken, Abbildung 4.21 A).

Bei Kultivierung porciner Epithelzellen in Anwesenheit von PBMC-Überständen, die von TLA-versetzten Zellkulturen nicht infizierter Tiere abgenommen wurden, konnte dagegen keine gesteigerte Kynurenin Produktion detektiert werden: Die Menge an Kynurenin im Überstand dieser Zellkulturen entsprach der, die bei Inkubation der PCP-R Zellen in Kulturmedium messbar war (Abbildung 4.21 B).

Die Menge an IFN $\gamma$ , die im Überstand von PBMC-Kulturen infizierter Tiere nach Stimulation der Zellen mit rekombinanten *T. gondii* Antigenen gemessen werden konnte, lag wie in Abbildung 4.18 B für GRA1 gezeigt, nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Anhand einer Stichprobe sollte ermittelt werden, ob dieser Überstand dennoch eine Kynurenin Produktion induzieren kann. Ausgewählt wurden dazu die Überstände von Zellen eines infizierten Schweines, das 28 Tage nach Infektion mit Oozysten gut auf verschiedene rekombinante *T. gondii* Antigene reagierte. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

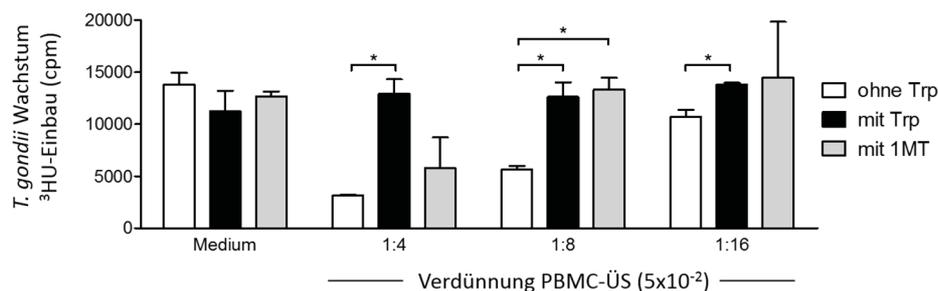


**Abbildung 4.22: Kynurenin Produktion in PCP-R Zellen bei Kultivierung in Überständen von *T. gondii* rAG-stimulierten PBMC-Kulturen.** Porcine PBMC wurden 21 Tage nach Infektion mit *T. gondii* isoliert und in Anwesenheit von 1 µg/ml der angegebenen, rekombinant hergestellten Antigene ohne die zusätzliche Beigabe von Tryptophan kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, 1:4 mit Kulturmedium verdünnt und zur Stimulation von PCP-R Zellen verwendet. Dargestellt ist die Kynurenin Produktion der PCP-R Zellen bei Kultivierung in Anwesenheit dieser PBMC-Überstände (graue Balken) sowie bei Inkubation in Medium alleine (weißer Balken). In der Graphik zusammengefasst sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus gemittelten Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Versuchen mit Zellen der gleichen Tiere ergaben. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test nachgewiesen und beziehen sich jeweils auf die Mediumkontrolle. Für  $p$  ergab sich  $**p < 0.001$ ,  $*p < 0.01$ .

Bei Kultivierung der PCP-R Zellen in Anwesenheit der Überstände von GRA1-stimulierten PBMC-Kulturen, konnte im Vergleich zur Mediumkontrolle eine signifikant erhöhte Produktion von Kynurenin in PCP-R Kulturen detektiert werden. Auch die Überstände, die nach Kultivierung der PBMC in Anwesenheit des rekombinant hergestellten GRA2 Antigens genommen wurden, induzierten eine signifikant erhöhte Kynurenin Produktion. Wurden die PBMC des infizierten Tieres in Anwesenheit von GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 kultiviert, konnten die gewonnenen Überstände keine signifikant erhöhte Produktion von Kynurenin auslösen.

In der vorangegangenen Analyse wurde die Aktivierbarkeit des IDO Enzyms porciner PCP-R Zellen durch die Überstände von TLA- bzw. rAG-stimulierten PBMC infizierter Schweine gezeigt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die damit einhergehende Reduktion von Tryptophan einen antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* vermitteln konnte.

In Abbildung 4.23 ist das Parasiten-Wachstum in porcinen Epithelzellen, die in An- oder Abwesenheit der Überstände von TLA-stimulierten PBMC kultiviert wurden, dargestellt.



**Abbildung 4.23: Antiparasitärer Effekt der Überstände TLA-stimulierter PBMC infizierter Schweine in PCP-R Zellen.** PBMC von Tieren nach *T. gondii* Infektion wurden in Anwesenheit einer  $5 \times 10^{-2}$  TLA-Verdünnung kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und gepoolt. Die gepoolten Überstände wurden dann wie angegeben verdünnt (1:4, 1:8, 1:16) und zur Kultivierung von PCP-R Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden porcine Zellen, die in Kulturmedium kultiviert wurden, mitgeführt. Zusätzlich wurden die Kulturen teilweise mit 100 µg/ml 1MT versetzt (graue Balken) oder blieben unbehandelt (weiße und schwarze Balken). Nach 72 Stunden erfolgte die Infektion mit je  $10^5$  Parasiten (RH) pro  $3 \times 10^4$  PCP-R Zellen. Nach der Infektion wurden die Zellkulturen teilweise mit Tryptophan supplementiert (100 µg/ml; schwarze Balken) oder wurden ohne den Zusatz der Aminosäure kultiviert (weiße/ graue Balken). Das Parasiten-Wachstum wurde nach weiteren drei Tagen über den Einbau von  $^3\text{HJU}$  quantifiziert. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SD, die sich aus Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Versuches ergaben. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet und wurden mittels Student's t-Test nachgewiesen ( $*p < 0.01$ ).

*Toxoplasma gondii* RH Tachyzoiten konnten in unstimulierten PCP-R Zellkulturen (Medium) wachsen. Weder die Anwesenheit von 1MT noch der Zusatz von Tryptophan hatte einen Einfluss auf die Parasiten-Proliferation.

Wurden porcine Epithelzellen dagegen in Anwesenheit von Überständen kultiviert, die nach TLA-Stimulation von PBMC infizierter Tiere abgenommen wurden, so war im Vergleich zur Mediumkontrolle ein deutlich verringertes *T. gondii*-Wachstum detektierbar (weiße Balken). Das Ausmaß dieses antiparasitären Effekts war dabei abhängig davon, wie stark der PBMC-Überstand verdünnt worden war: Je stärker verdünnt er eingesetzt wurde, desto weniger Hemmung der Parasiten-Proliferation konnte beobachtet werden.

Durch die Zugabe von Tryptophan zum Zeitpunkt der Infektion, konnte der antiparasitäre Effekt, der durch die PBMC-Überstände vermittelt wurde, aufgehoben werden: *T. gondii* erreichte in Tryptophan-supplementierten Zellkulturen ein Wachstum, welches mit der Proliferation des Parasiten in Kulturmedium vergleichbar war (schwarze Balken).

In PCP-R Zellkulturen, die zusätzlich mit 1MT versetzt waren, konnte, im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit von 1MT, tendenziell eine stärkere Replikation des Parasiten detektiert werden (graue Balken).

**Zusammenfassend** konnte eine experimentelle Infektion von Schweinen mit *T. gondii* Oozysten und Zysten zu jedem analysierten Zeitpunkt anhand der TLA-spezifischen T-Zell-Proliferation detektiert werden. Die Proliferationsrate stieg im Verlauf der Infektion tendenziell an, dabei konnte kein Unterschied zwischen einer Infektion der Tiere mit Oozysten und einer Infektion mit Zysten festgestellt werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen, die aus den humanen Studien gewonnen werden konnten, zeigten auch die experimentell infizierten Schweine individuelle zelluläre Immunantwort auf die getesteten, rekombinanten *T. gondii* Antigene. Des Weiteren vermittelte der Überstand von TLA-stimulierten PBMC infizierter Tiere einenIDO-vermittelten, antiparasitären Effekt gegenüber *T. gondii* Typ I.

### 4.3. Analyse der Toxoplasmen-Antigen-spezifischen T-Zellantwort im Mausmodell

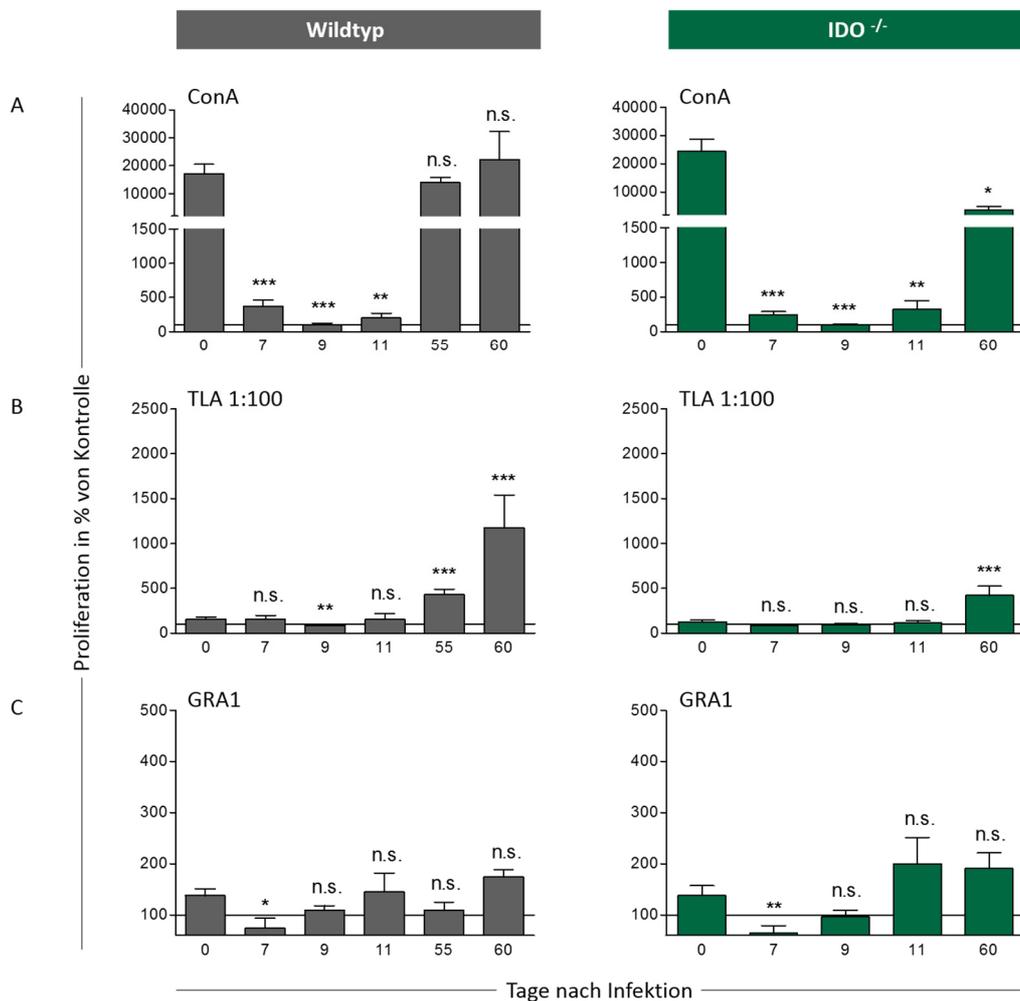
Im dritten Teil der Arbeit wurden die Analysen auf das Mausmodell übertragen. Durch die Verwendung von Inzucht-Tieren sollten individuelle Unterschiede, beispielsweise die der MHC-Moleküle, welche die Analysen beeinflussen können, vermieden werden. Außerdem sind Mäuse als Versuchstiere in großer Zahl verfügbar, sodass genügend Tiere für die Analysen verwendet werden können, um statistisch belegbare Aussagen zu treffen. Des Weiteren ist die Maus ein besonders wichtiger Zwischenwirt für *T. gondii*, da sie das bevorzugte Beutetier des Endwirtes, der Katze ist. Nach der oralen Aufnahme infizierter Mäuse durch den Endwirt wird ein neuer *T. gondii* Infektionskreislauf initiiert. Deshalb dient die Maus in der Toxoplasmen-Forschung häufig als Modellorganismus.

C57BL/6 Wildtyp sowie IDO-defiziente (IDO<sup>-/-</sup>) Mäuse wurden mit Typ II *T. gondii* Tachyzoiten (Stamm ME49) infiziert. Dieser Stamm ist für Mäuse moderat virulent, sodass eine solide Immunantwort induziert wird, die Tiere jedoch bei Auswahl der richtigen Infektionsdosis nicht versterben. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte die Entnahme der Milzen sowie die Aufreinigung der Splenozyten, welche dann in *in vitro* Assays eingesetzt wurden.

Dabei sollte analysiert werden, inwiefern Parasiten Lysat bzw. rekombinante *T. gondii* Antigene eine T-Zell-Aktivierung induzieren können. Eine solche Aktivierung wurde durch T-Zell-Proliferationsassays sowie anhand des Nachweises von IFN $\gamma$  in den Stimulationsansätzen detektiert.

#### 4.3.1. Nachweis *T. gondii*-spezifischer T-Zellen in Proliferationsassays

Milz-Zellen *T. gondii* infizierter Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gewonnen und mit TLA bzw. mit rekombinanten Antigenen von *T. gondii* stimuliert oder in Kulturmedium kultiviert (Negativ-Kontrolle). Als Nachweis der generellen Proliferationskapazität der verwendeten Milz-Zellen wurde eine polyklonale Stimulation mit Concanavalin A (ConA) als Positiv-Kontrolle durchgeführt. In Abbildung 4.24 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt.



**Abbildung 4.24: ConA-, TLA- und GRA1-abhängige Proliferation in Milz-Zellkulturen infizierter Mäuse.** C57BL/6 (graue Balken) und IDO<sup>-/-</sup> (grüne Balken) Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>5</sup> Tachyzoiten des *T. gondii* Typ II Stammes ME49 infiziert. An den angegebenen Tagen nach der Infektion erfolgte die Entnahme der Milz sowie die Isolierung der Milz-Zellen. Diese wurden in Anwesenheit von ConA (A), 10<sup>6</sup> lysierten Parasiten pro ml (B) oder in Anwesenheit von GRA1 (C; 1  $\mu$ g/ml) kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation über den Einbau von <sup>3</sup>HT. Die Quantifizierung des T-Zell-Wachstums individueller Tiere erfolgte in Triplikaten, die anschließend gemittelt wurden. Die Proliferation in Kulturmedium (Negativ-Kontrolle) wurde als 100% definiert (schwarze Linie). In der Graphik dargestellt sind die darauf bezogenen Mittelwerte aller analysierten Tiere. An Tag 0-9 ergeben sie sich aus gemittelten Werten von 9-12 Tieren, an Tag 11-60 aus gemittelten Werten von 4-6 Tieren. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test nachgewiesen und beziehen sich jeweils auf die Proliferationswerte an Tag 0 (\*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, \*p < 0.01).

Die folgenden Beschreibungen beziehen sich zunächst auf die Ergebnisse, die mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen generiert wurden (linke Seite der Abbildung 4.24; graue Balken). ConA stimulierte eine starke Proliferation in Milz-Zellkulturen naiver Tiere (Tag 0). Im Vergleich dazu war überraschenderweise eine drastische, um 98% verringerte Zell-Vermehrung zu beobachten, wenn murine Milz-Zellen 7 Tage nach einer Infektion mit *T. gondii* isoliert und in Anwesenheit von ConA kultiviert wurden. Das geringe Proliferationsniveau in ConA-stimulierten Zellkulturen infizierter Tiere blieb in der frühen Phase der Infektion (Tag 9 und 11) konstant. Im Gegensatz dazu führte die ConA-Stimulation der Milz-Zellen von Tieren, die sich in einer späteren Infektionsphase befanden (Tag 55 und 60), zu einer starken T-Zell-Proliferation. Die Intensität dieser Zell-Vermehrung war vergleichbar mit dem Proliferationsniveau in ConA-stimulierten Zellkulturen naiver Tiere (Abbildung 4.24 A).

Wurden Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden (7, 9 und 11 Tage nach Infektion) isoliert und in Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml kultiviert, so konnte, im Vergleich zu TLA-stimulierten Zellkulturen naiver Mäuse, keine signifikant erhöhte T-Zell-Proliferation detektiert werden. In Milz-Zellkulturen von Tieren, die über einen längeren Zeitraum (55 und 60 Tage) mit *T. gondii* infiziert waren, konnte nach TLA-Stimulation dagegen eine signifikant erhöhte T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 B).

Bei Kultivierung der Milz-Zellen in Anwesenheit der verschiedenen, rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene (rAG), war das Ausmaß der Zell-Proliferation in Zellkulturen infizierter Tiere zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als das Ausmaß der Zell-Vermehrung in Zellkulturen naiver Mäuse (Daten exemplarisch für GRA1 gezeigt; Abbildung 4.24 C).

Im Folgenden sollte die überraschende, infektionsbedingte Immunsuppression, welche sich durch eine stark verringerte Proliferationskapazität der Zellen infizierter Tiere in der frühen Phase der Infektion äußerte, näher analysiert werden.

Im ersten Teil der Analyse wurde die oben beschriebene Infektionsstudie mit Indolamin 2,3-dioxygenase-defizienten Mäusen (*IDO*<sup>-/-</sup>) wiederholt, um eine Beteiligung dieses immunregulatorischen Enzyms an der beobachteten T-Zellsuppression zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.24 den Ergebnissen der Wildtyp Tiere gegenübergestellt (rechte Seite der Abbildung; grüne Balken).

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Wildtyp Tiere, war die ConA-abhängige Milz-Zell-Proliferation *IDO*-defizienter Tiere, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden, drastisch verringert. Wurden Zellen *IDO*-defizienter Tiere zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion isoliert (Tag 60), war, wie auch bei den WT Mäusen, eine starke Proliferation in ConA-stimulierten Zellkulturen zu beobachten. Allerdings erreichten die ConA-stimulierten Zellen hier nicht vollständig das Proliferationsniveau, das in Zellkulturen nicht infizierter *IDO*-defizienter Tiere auslösbar war (Abbildung 4.24 A).

In Anwesenheit von  $10^6$  lysierten Parasiten pro ml konnte, bezogen auf die Zell-Vermehrung in Kulturen nicht infizierter *IDO*<sup>-/-</sup> Tiere, eine signifikant erhöhte Zell-Proliferation infizierter Tiere gemessen werden, wenn die Isolation der Milz-Zellen in der späteren Phase der Infektion (Tag 60) erfolgte. Dagegen war in der frühen Infektionsphase (Tag 7-11) keine TLA-abhängige Proliferation in Zellkulturen infizierter, *IDO*-defizienter Tiere detektierbar. Wiederum entsprachen diese Ergebnisse tendenziell den Ergebnissen, die mit den Zellen der Wildtypen erhalten wurden (Abbildung 4.24 B).

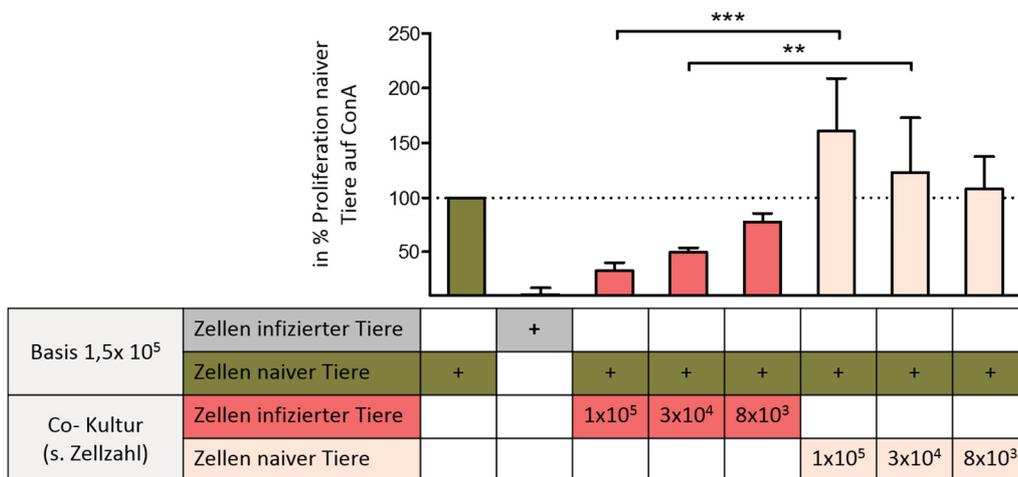
Wie schon bei Kultivierung der Milz-Zellen von Wildtyp Mäusen konnte auch bei den IDO<sup>-/-</sup> Tieren keine spezifische T-Zellantwort auf rekombinante *T. gondii* Antigene gefunden werden (Abbildung 4.24 C).

Insgesamt konnte kein Unterschied, bezogen auf die Mitogen- oder Toxoplasmen-Antigen-induzierte Aktivierbarkeit der Milz-Zellen infizierter C57BL/6 WT und IDO<sup>-/-</sup> Mäuse ermittelt werden. Das bedeutet, dass das immunregulatorische Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase nicht für die beobachtete Immunsuppression verantwortlich ist.

In einem zweiten Ansatz sollte die beschriebene Immunsuppression mit Hilfe verschiedener *in vitro* Versuche näher analysiert werden: Untersucht wurde dazu, ob Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden, immunsuppressiv auf die Zellen naiver Tiere wirken können. Dabei sollte die Rolle löslicher Faktoren und die Bedeutung von Zell-Zell-Kontakten für die Vermittlung einer möglichen Immunsuppression analysiert werden.

Durch die Messung der ConA-abhängigen Proliferationskapazität in Co-Kulturen von Zellen infizierter und naiver Mäuse sollte zunächst die immunsuppressive Kapazität von T-Zellen infizierter Tiere erfasst werden.

In Abbildung 4.25 sind die Bedingungen der verschiedenen Co-Kulturen sowie die Ergebnisse der Proliferationsmessungen dargestellt.



**Abbildung 4.25: ConA-vermittelte Zell-Proliferation in Kulturen von Milz-Zellen naiver und infizierter Tiere.** C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>5</sup> ME49 Tachyzoiten infiziert. In der frühen Phase der Infektion (Tag 7-11) erfolgte die Entnahme der Milzen und die anschließende Isolierung der Milz-Zellen (= Zellen infizierter Tiere). Parallel dazu wurden Milz-Zellen nicht infizierter Tiere isoliert (= Zellen naiver Tiere). Beide Zelltypen wurden dann in unterschiedlichen Kombinationen co-kultiviert. Als Basis der Kultur dienten 1,5x10<sup>5</sup> Zellen der naiven Tiere bzw. dieselbe Anzahl an Zellen der infizierten Mäuse. Die Präsenz der jeweiligen Zellen als Basis innerhalb der Kultur lässt sich in Tabelle ablesen (+). Zu den Basis-Zellen wurden dann Zellen infizierter Tiere (rot gefüllte Felder) oder Zellen naiver Tiere (rosa gefüllte Felder) hinzugefügt; die jeweilige Zellzahl ist angegeben. Alle so entstandenen Kulturen wurden mit ConA stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die Quantifizierung der Zell-Proliferation mittels <sup>3</sup>HT. Die gepunktete Linie repräsentiert die ConA-abhängige Proliferation in Kulturen, in denen ausschließlich Zellen der naiven Tiere präsent waren (100%). In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte der darauf bezogenen, prozentualen Proliferation ±SEM in den unterschiedlichen Kultur-Ansätzen. Sie ergaben sich aus zwei unabhängigen Versuchen mit je einem naiven und vier infizierten Tieren. Signifikante Unterschiede wurde mittels Student’s t-Test nachgewiesen (\*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001).

Wie bereits beschrieben, stimulierte ConA eine starke Proliferation in Milz-Zellkulturen naiver Mäuse. Die Intensität dieser Proliferation wurde für die folgenden, vergleichenden Analysen als 100% Proliferation definiert (Abbildung 4.25 olivfarbener Balken; gepunktete Linie). Dagegen war eine drastisch verringerte Zell-Vermehrung zu beobachten, wenn die Zellen infizierter Tiere in Anwesenheit von ConA kultiviert wurden (Abbildung 4.25 zweiter Balken).

Wurden Milz-Zellen naiver Tiere mit den Milz-Zellen anderer, naiver Mäuse co-kultiviert, so konnte im Vergleich zur Einzel-Kultur eine verstärkte ConA-induzierte Proliferation detektiert werden. Je mehr Zellen dabei den Basis-Zellen zugegeben wurden, desto größer war tendenziell das Ausmaß der T-Zell-Vermehrung (Abbildung 4.25 rosa Balken).

In ConA-stimulierten Co-Kulturen, in denen Milz-Zellen naiver Mäuse und Milz-Zellen infizierter Tiere präsent waren, wurde dagegen eine geringere Zell-Vermehrung im Vergleich zur Zellkultur der naiven Mäuse gemessen. Je größer der Anteil von Zellen infizierter Tiere an der Co-Kultur war, desto weniger ConA-stimulierte Zell-Proliferation konnte gemessen werden (Abbildung 4.25 rote Balken).

Es konnte gezeigt werden, dass die Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase der Infektion mit *T. gondii* befinden, einen immunsuppressiven Effekt auf die Zellen naiver Tiere vermitteln. Dieser inhibitorische Effekt könnte durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Zellen aus infizierten und nicht infizierten Tieren vermittelt werden. Alternativ bzw. zusätzlich könnten Zytokine bei der Aktivierung der Zellen infizierter Tiere entstehen, welche die Proliferation der Zellen aus den nativen Tieren inhibieren.

Im nächsten Schritt sollte daher die Relevanz löslicher Faktoren für die Vermittlung der gezeigten Immunsuppression analysiert werden. Dazu wurde die ConA-stimulierte Proliferationskapazität von Milz-Zellen naiver Tiere analysiert, wenn diese in Anwesenheit verschiedener Milz-Zellüberstände (ÜS) infizierter Tiere kultiviert wurden. In Abbildung 4.26 sind die Zell-Vermehrung und die Bedingungen der verschiedenen Kulturansätze dargestellt.

Die Kultivierung der Milz-Zellen naiver Mäuse in Anwesenheit von ConA führte zu einer starken Proliferation der Zellen. Das Ausmaß dieser Zell-Vermehrung wurde für die folgenden Analysen als 100% Proliferationskapazität definiert (Abbildung 4.26 olivfarbene Balken; gepunktete Linien).

Wurden die Milz-Zellen naiver Tiere in Anwesenheit von Überständen kultiviert, die von ConA-stimulierten Zellkulturen nicht infizierter Tiere stammten, so blieb die volle Proliferationskapazität der Zellen erhalten (Abbildung 4.26 A, rosa, schraffierte Balken; ca. 100%).

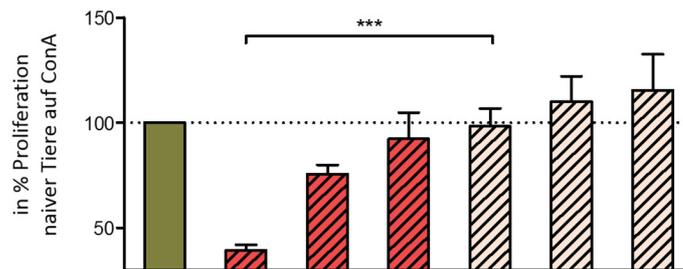
Dagegen war die Kapazität der Zell-Vermehrung in Milz-Zellkulturen naiver Mäuse drastisch verringert, wenn die Zellen in Anwesenheit von Überständen ConA-stimulierter Milz-Zellen infizierter Tiere kultiviert wurden. Das Ausmaß der Suppression war dabei abhängig von der Konzentration des Überstandes: Je stärker verdünnt er eingesetzt wurde, desto weniger Hemmung der ConA-vermittelten Proliferation konnte beobachtet werden (Abbildung 4.26 A, rote, schraffierte Balken).

Wurden die Milz-Zellen naiver Tiere in Anwesenheit von Überständen kultiviert, die von unstimulierten Zellkulturen infizierter Tiere stammten, konnte der gleiche Effekt, jedoch in geringerem Ausmaß beobachtet werden (Abbildung 4.26 B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase der Infektion mit *T. gondii* befinden, einen immunsuppressiven Effekt auf die Zellen naiver Tiere durch lösliche Faktoren vermitteln können, wofür ein direkter Zell-Zell-Kontakt nicht zwingend notwendig ist.

A

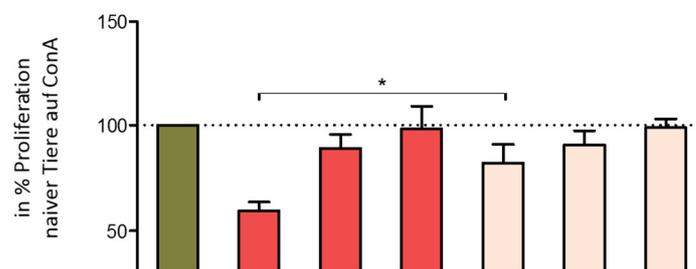
## ÜS ConA-stimulierter Milz-Zellen



Basis $1,5 \times 10^5$	Zellen naiver Tiere	+	+	+	+	+	+	+
kultiviert in ÜS (s. Verdünnung)	Zell-ÜS inf. Tiere		1:5	1:15	1:30			
	Zell-ÜS naiver Tiere					1:5	1:15	1:30

B

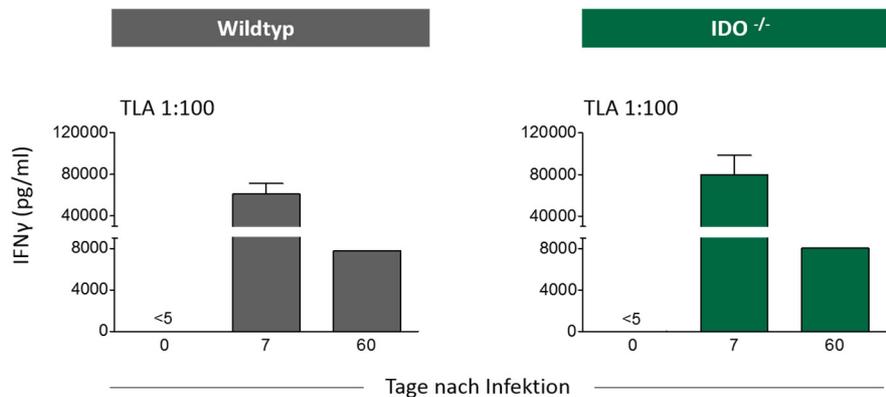
## ÜS nicht stimulierter Milz-Zellen



Basis $1,5 \times 10^5$	Zellen naiver Tiere	+	+	+	+	+	+	+
kultiviert in ÜS (s. Verdünnung)	Zell-ÜS inf. Tiere		1:5	1:15	1:30			
	Zell-ÜS naiver Tiere					1:5	1:15	1:30

**Abbildung 4.26: ConA-vermittelte Zell-Proliferation in Milz-Zellkulturen naiver Tiere in An- und Abwesenheit verschiedener Zell-Kulturüberstände.** C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^5$  ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben unbehandelt. In der frühen Phase der Infektion (Tag 7-11) erfolgte die Entnahme der Milzen und die anschließende Isolierung der Milz-Zellen. Diese wurden dann für fünf Tage in der Anwesenheit von ConA (A) bzw. in Kulturmedium (B) kultiviert. Dann wurde der Überstand der Zellkulturen entnommen und gruppenweise gepoolt (2 Gruppen: Zell-ÜS infizierter Tiere und Zell-ÜS naiver Tiere). Als Basis der Kultur dienten  $1,5 \times 10^5$  Milz-Zellen von naiven, nicht infizierten Tieren, deren Präsenz sich in der Tabelle ablesen lässt (+). Diese Zellen wurden dann in Anwesenheit der Milz-Zellüberstände infizierter Tiere (rot gefüllte Felder) oder naiver Tiere (rosa gefüllte Felder) kultiviert; die jeweilige Verdünnung ist angegeben. Alle entstandenen Kulturen wurden mit ConA versetzt. Nach drei Tagen erfolgte die Quantifizierung der Zell-Proliferation mittels  $^3\text{HT}$ . Die gepunktete Linie repräsentiert die ConA-abhängige Proliferation der Zellen nicht infizierter Tiere (100%). In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte der darauf bezogenen, prozentualen Proliferation  $\pm$ SEM in den unterschiedlichen Kulturansätzen. Sie ergaben sich aus fünf unabhängigen Versuchen mit je einem naiven Tier als Spender der Basis-Zellen. Die gepoolten Überstände stammten aus Kulturansätzen mit mindestens vier infizierten bzw. naiven Tieren. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test nachgewiesen (\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

In den vorangegangenen Analysen war also ein drastisch verringertes Proliferationsniveau in Milz-Zellkulturen von Tieren, die sich in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion befanden, beobachtet und näher analysiert worden. Im Folgenden sollte zusätzlich ermittelt werden, ob die Suppression der T-Zell-Proliferation auch zu einer Hemmung der IFN $\gamma$  Produktion führt. In Abbildung 4.27 ist die TLA-induzierte IFN $\gamma$  Produktion TLA-stimulierter Milz-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt (7 Tage nach Infektion) und einem späteren Zeitpunkt (60 Tage nach Infektion) dargestellt.



**Abbildung 4.27: TLA-induzierte IFN $\gamma$  Produktion in murinen Milz-Zellkulturen im Verlauf einer *T. gondii* Infektion.** C57BL/6 (grau) bzw. IDO<sup>-/-</sup> Mäuse (grün) wurden intraperitoneal mit 10<sup>5</sup> ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben unbehandelt (Tag 0). An den angegebenen Tagen nach Infektion wurden die Milz-Zellen isoliert und in Anwesenheit von 10<sup>6</sup> lysierten Parasiten pro ml kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Überstände der Zellkulturen abgenommen und gepoolt. In den Überständen wurde dann IFN $\gamma$  mittels ELISA quantitativ bestimmt. In der Graphik dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der IFN $\gamma$  Konzentration, die in gepoolten Überständen von drei unabhängigen Versuchen ermittelt wurde (d0 n= 6; d7 n= 6; d60 n= 4). Die IFN $\gamma$  Produktion unstimulierter Zellen ist jeweils abgezogen.

Wurden Milz-Zellen infizierter Mäuse in Anwesenheit von Toxoplasma Lysat Antigen (TLA) kultiviert, konnte vor allem in Milz-Zellkulturen von Tieren, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden (7 Tage nach Infektion) eine unerwartet große Menge an IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Auch in Milz-Zellkulturen von Mäusen, die zu einem späteren Zeitpunkt (60 Tage nach Infektion) analysiert wurden, induzierte TLA die Produktion von IFN $\gamma$ . Im Gegensatz dazu war im Überstand von TLA-stimulierten Zellkulturen nicht infizierter Tiere nur eine sehr geringe IFN $\gamma$  Konzentration messbar. Die IFN $\gamma$  Konzentration, die in Zellkulturen der Wildtyp Mäuse detektiert werden konnte, unterschied sich zu keinem Zeitpunkt von der Menge an IFN $\gamma$ , die in Zellkulturen der IDO<sup>-/-</sup> Mäuse präsent war.

Die Kultivierung der Milz-Zellen infizierter Mäuse in Anwesenheit der rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene induzierte in der frühen und späten Phase der Infektion nur eine basale IFN $\gamma$  Produktion. Die gemessenen Konzentrationen lagen dabei geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

**Zusammenfassend** konnte anhand der Studien am Mausmodell eine Immunsuppression in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion nachgewiesen werden. Sie äußerte sich durch ein stark reduziertes Proliferationsvermögen der Milz-Zellen infizierter Tiere nach Mitogen-Stimulation, war unabhängig vom immunregulatorischen Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase und konnte *in vitro* auch durch lösliche Faktoren vermittelt werden. Durch die Detektion der TLA-induzierten IFN $\gamma$  Produktion in Zellkulturen von Mäusen, die sich in der frühen Phase der Infektion befanden, konnte trotz der Proliferationsblockade dennoch eine infektionsbedingte Aktivierung der Milz-Zellen nachgewiesen werden.

### 4.3.2. Antiparasitärer Effekt von IFN $\gamma$ auf unterschiedliche *T. gondii* Stämme in murinen Zellen

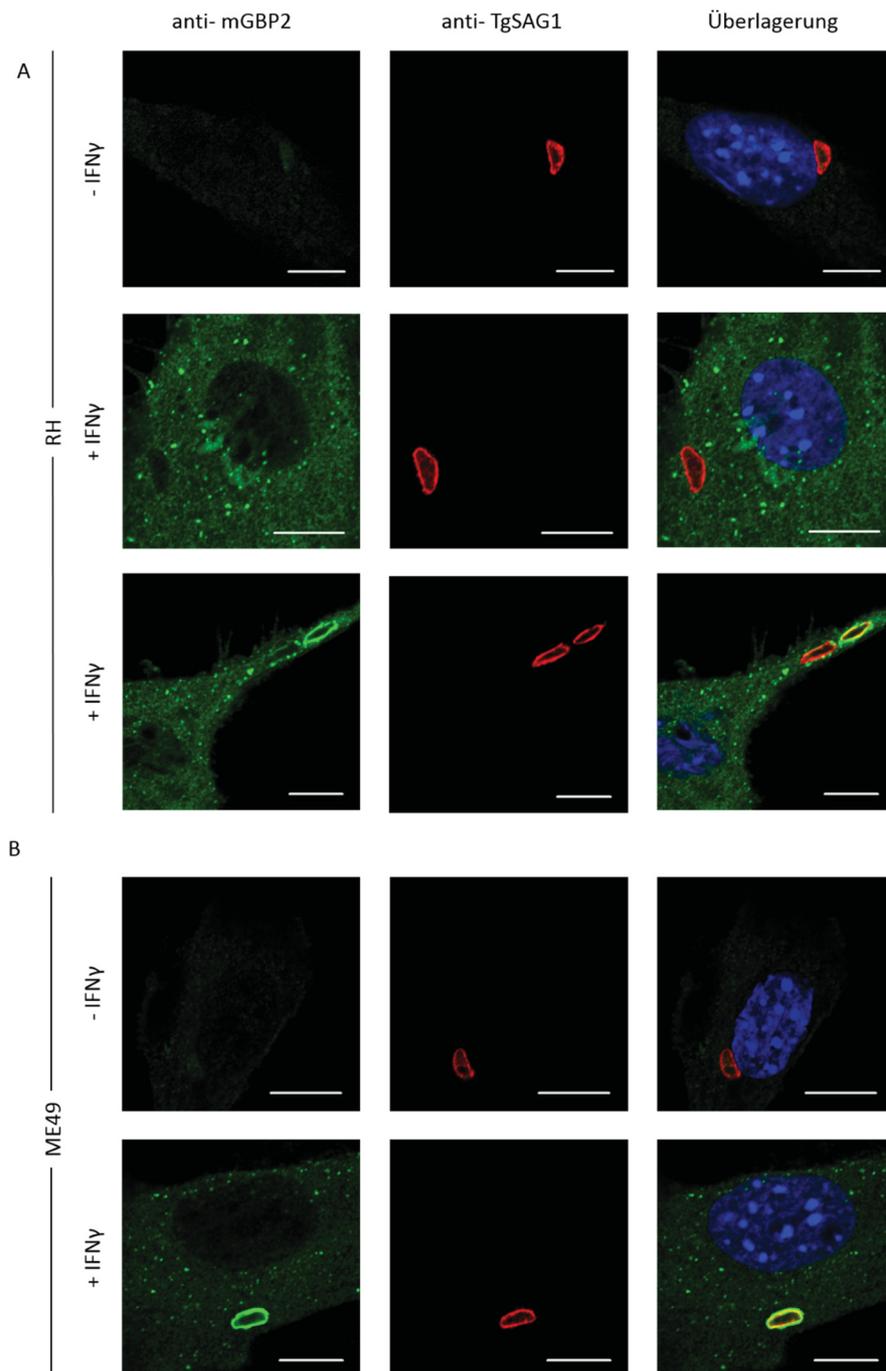
IFN $\gamma$ , das in unserem Mausmodell besonders in der frühen Phase der Infektion gebildet wurde, hat eine sehr wichtige Bedeutung bei der Abwehr gegen den intrazellulären Parasiten *T. gondii*. Die IFN $\gamma$ -stimulierte Induktion der Aktivität des Enzyms Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO), welches im humanen und porcinen System einen antiparasitären Effekt auf *T. gondii* vermittelt, spielt im murinen System eine untergeordnete Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger. Vielmehr induziert IFN $\gamma$  hier die Hochregulation verschiedener GTPasen, z.B. die der p65 Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs). Es konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise mGBP2, im Falle einer *T. gondii* Infektion, dann zur parasitophoren Vakuole (PV) des Parasiten rekrutiert, wenn murine Zellen zuvor mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden. mGBP2 vermittelt den Abbau der parasitophoren Vakuole, wodurch der Parasit letztendlich beseitigt wird.

Die Intensität der mGBP2-Rekrutierung zur PV war dabei abhängig davon, mit welchem *T. gondii* Stamm die murine Zelle infiziert worden war: Während mGBP2 zu einer überwiegenden Mehrheit an die PV mittel virulenter Typ II Parasiten (ME49) rekrutierte, konnte die Mehrzahl der hoch virulenten Typ I Parasiten (RH/BK) die mGBP2-Rekrutierung verhindern.

Der Mechanismus mit dem die Rekrutierung verhindert wird ist nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch unterscheiden sich die *T. gondii* Stämme Typ I, Typ II und Typ III in der Typ-spezifischen Zusammensetzung verschiedener genetischer Virulenz Marker, denen ein Einfluss auf die Intensität der GTPasen Rekrutierung zur PV zugesprochen wird.

Im Folgenden sollte die Rekrutierung von mGBP2 zur parasitophoren Vakuole atypischer *T. gondii* Stämme untersucht werden. Diese zeichnen sich unter anderem durch eine nicht typische Zusammensetzung der Virulenz Marker aus. Zu diesem Zweck wurden murine mesenchymale Stammzellen (mMSC) mit IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend zur Kontrolle mit den verschiedenen typischen bzw. mit den atypischen *T. gondii* Stämmen infiziert. Die Quantifizierung der mGBP2-Rekrutierung zur PV des jeweiligen Parasiten erfolgte mittels Immunfluoreszenzanalyse.

In Abbildung 4.28 ist anhand eines Typ II Parasiten (ME49) gezeigt, welches Bild sich im Falle der Rekrutierung von mGBP2 an die parasitophore Vakuole ergab. Außerdem ist am Beispiel eines Typ I Parasiten (RH) der optische Eindruck einer nicht rekrutierten PV dokumentiert.



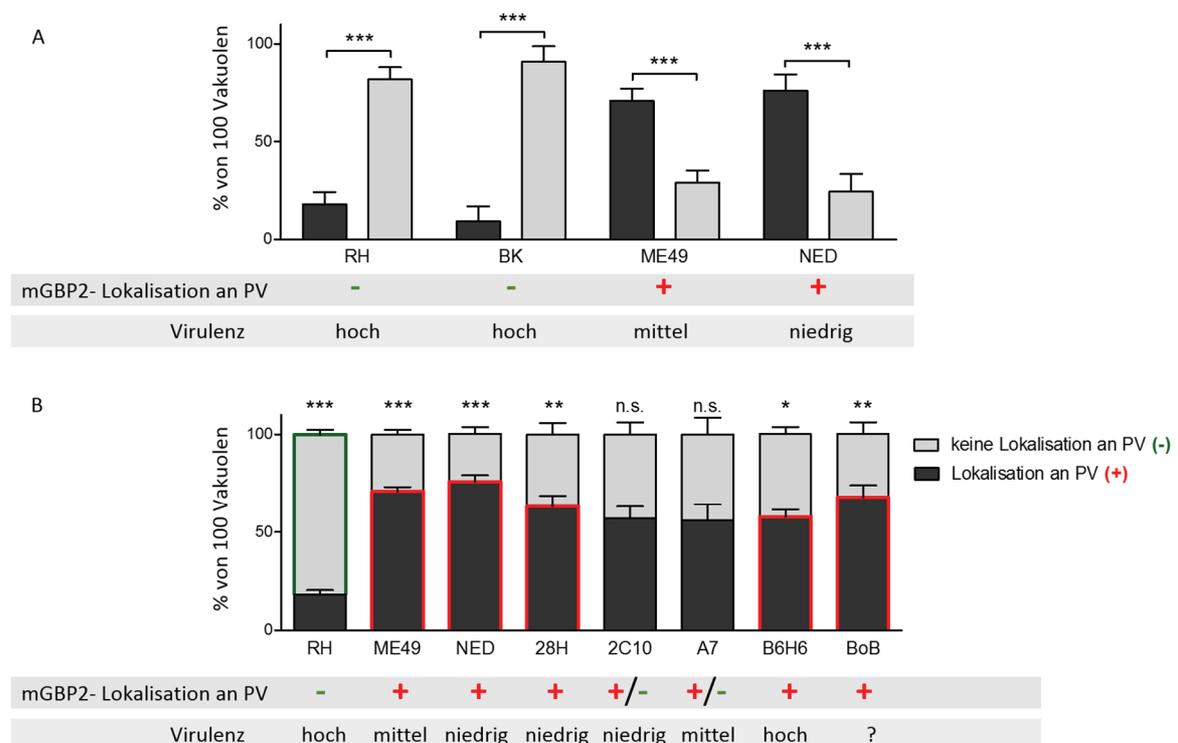
**Abbildung 4.28: Lokalisation von mGBP2 in mMSC nach Infektion mit *T. gondii* Typ I und Typ II.** Murine mesenchymale Stammzellen wurden über Nacht mit  $\text{IFN}\gamma$  (100 U/ml) stimuliert (+  $\text{IFN}\gamma$ ) oder blieben unbehandelt (-  $\text{IFN}\gamma$ ). Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *T. gondii* Typ I= RH (A) bzw. Typ II= ME49 (B). Drei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem *T. gondii* SAG1-spezifischen Antikörper (rot) sowie mit einem spezifischen mGBP2 Antikörper (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Dann wurde die Kolokalisation von mGBP2 (grün) und intrazellulären Parasiten (rot) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Maßstabsbalken repräsentieren jeweils eine Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

In mMSC die unstimuliert blieben, konnte erwartungsgemäß nur eine sehr schwache endogene mGBP2-Expression detektiert werden (Abbildung 4.28 A und B: jeweils obere Bildreihe). Die Stimulation der Zellen mit  $\text{IFN}\gamma$  induzierte eine starke Expression von mGBP2 (Abbildung 4.28 A: zweite und dritte Bildreihe, B: zweite Bildreihe). Wie bereits beschrieben, konnte nach Infektion mit einem hoch virulenten *T. gondii* Typ I (RH) typischerweise keine Ansammlung von mGBP2 um

die PV des Parasiten beobachtet werden (Abbildung 4.28 A, zweite Bildreihe). Von dieser Regel gibt es nur selten Ausnahmen, die in der dritten Bildreihe dargestellt sind. In diesem Ausnahmefall ist innerhalb einer Zelle eine fehlende mGBP2-Rekrutierung zur PV eines RH Parasiten und gleichzeitig die Ansammlung des Proteins um die parasitophore Vakuole eines anderen RH Parasiten detektiert worden (Abbildung 4.28 A, dritte Bildreihe).

Wurden IFN $\gamma$ -stimulierte mMSC mit *T. gondii* Typ II (ME49) infiziert, konnte bei der überwiegenden Mehrzahl der eingedrungenen Tachyzoiten typischerweise eine Kolokalisation von mGBP2 und der parasitophoren Vakuole beobachtet werden (Abbildung 4.28 B, untere Bildreihe).

Um die Intensität der mGBP2-Rekrutierung zur PV unterschiedlicher typischer und atypischer *T. gondii* Stämme bewerten zu können, wurden pro Versuch 100 Vakuolen, welche die jeweiligen Parasiten in IFN $\gamma$ -stimulierten mMSC ausgebildet hatten, auf eine Kolokalisation mit mGBP2 untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.29 dargestellt.



**Abbildung 4.29: Quantifizierung der mGBP2-Rekrutierung zur PV unterschiedlicher *T. gondii* Stämme.** Murine mesenchymale Stammzellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit Tachyzoiten der angegebenen *T. gondii* Stämme. Drei Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem *T. gondii* SAG1-spezifischen Antikörper sowie mit einem spezifischen mGBP2 Antikörper gefärbt. Dann wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie je 100 Vakuolen des jeweiligen Parasiten auf eine Kolokalisation mit mGBP2 analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der parasitophoren Vakuolen, an denen eine Lokalisation von mGBP2 beobachtet werden konnte (schwarze Balken) sowie der prozentuale Anteil der PV bei denen keine Lokalisation des Proteins detektierbar war (graue Balken). Außerdem ist jeweils zusammengefasst, ob die überwiegende Mehrheit der Vakuolen eine Kolokalisation mit mGBP2 aufwies (+, rote Rahmen) oder ob bei der Mehrzahl der Vakuolen keine Ansammlung des Proteins zu beobachten war (-, grüner Rahmen). Zudem ist die individuelle phänotypische Virulenz der verschiedenen Erreger im Maussystem angegeben. (A) zeigt die Ergebnisse der klonalen *T. gondii* Typ-Stämme. In (B) sind diese den Ergebnissen der atypischen Stämme vergleichend gegenübergestellt. In der Graphik zusammengefasst sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM, die sich aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen ergaben. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test nachgewiesen und beziehen sich jeweils auf den Unterschied der Höhe schwarzer und grauer Balken. Für  $p$  ergab sich \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

Bei der signifikanten Mehrheit der PV, welche die typischen, hoch virulenten Parasiten RH und BK ausgebildet hatten, konnte keine mGBP2-Lokalisation beobachtet werden (-). So blieben 81% der Vakuolen des RH Parasiten bzw. 91% der Vakuolen des BK Parasiten frei von einer Ansammlung des mGBP2 Proteins (Abbildung 4.29 graue Balken). Lediglich 19% (RH) bzw. 9% (BK) der einhundert analysierten Vakuolen wiesen eine Kolokalisation mit mGBP2 auf (schwarze Balken). Dieses Mehrheitsverhältnis war bei den Vakuolen der mittel bzw. niedrig virulenten Parasiten ME49 und NED umgekehrt. Hier konnte bei der signifikanten Mehrzahl der analysierten Vakuolen eine Ansammlung von mGBP2 detektiert werden (+): Bei Infektion mit ME49 lokalisierte das Protein an 71%; bei Infektion mit NED an 76% aller parasitophoren Vakuolen (Abbildung 4.29 schwarze Balken). In 29% bzw. 24% der Fälle konnte keine Kolokalisation von mGBP2 und der PV der Parasiten beobachtet werden (Abbildung 4.29 graue Balken).

Im Vergleich dazu (Abbildung 4.29 B) war das Lokalisationsverhalten von mGBP2 zur PV der atypischen *T. gondii* Stämme 28H, B6H6 und BoB vergleichbar mit der Rekrutierungs-Intensität des Proteins zur PV der Typ II und Typ III Stämme: Auch hier konnte bei der signifikanten Mehrzahl der analysierten Vakuolen eine Ansammlung von mGBP2 detektiert werden (+). Die Analysen der *T. gondii* Stämme 2C10 und A7 ergaben, bezogen auf die Lokalisation oder das Fehlen von mGBP2 an der PV, kein signifikantes Mehrheitsverhältnis. Dennoch war tendenziell bei der Mehrheit der Vakuolen eine Ansammlung von mGBP2 detektierbar (2C10= 57%, A7= 56%).

Anders als bei den typischen Parasiten Stämmen (RH/BK) zeigte der hoch virulente atypische Stamm B6H6 keine Korrelation zwischen der Virulenz und der Häufigkeit der Kolokalisation von mGBP2 an die parasitophore Vakuole.

#### 4.3.3. Infektion von BALB/c Mäusen mit dem atypischen, hoch virulenten *T. gondii* Stamm B6H6

Um die Virulenz des B6H6 Stammes zu überprüfen, wurden Balb/c Mäuse mit B6H6 Tachyzoiten infiziert. Parallel dazu erfolgte die Infektion anderer Tiere mit dem intermediär virulenten Typ II Stamm ME49 bzw. dem hoch virulenten Typ I Stamm RH. Abbildung 4.30 zeigt das Überleben der Tiere in diesem Versuch.

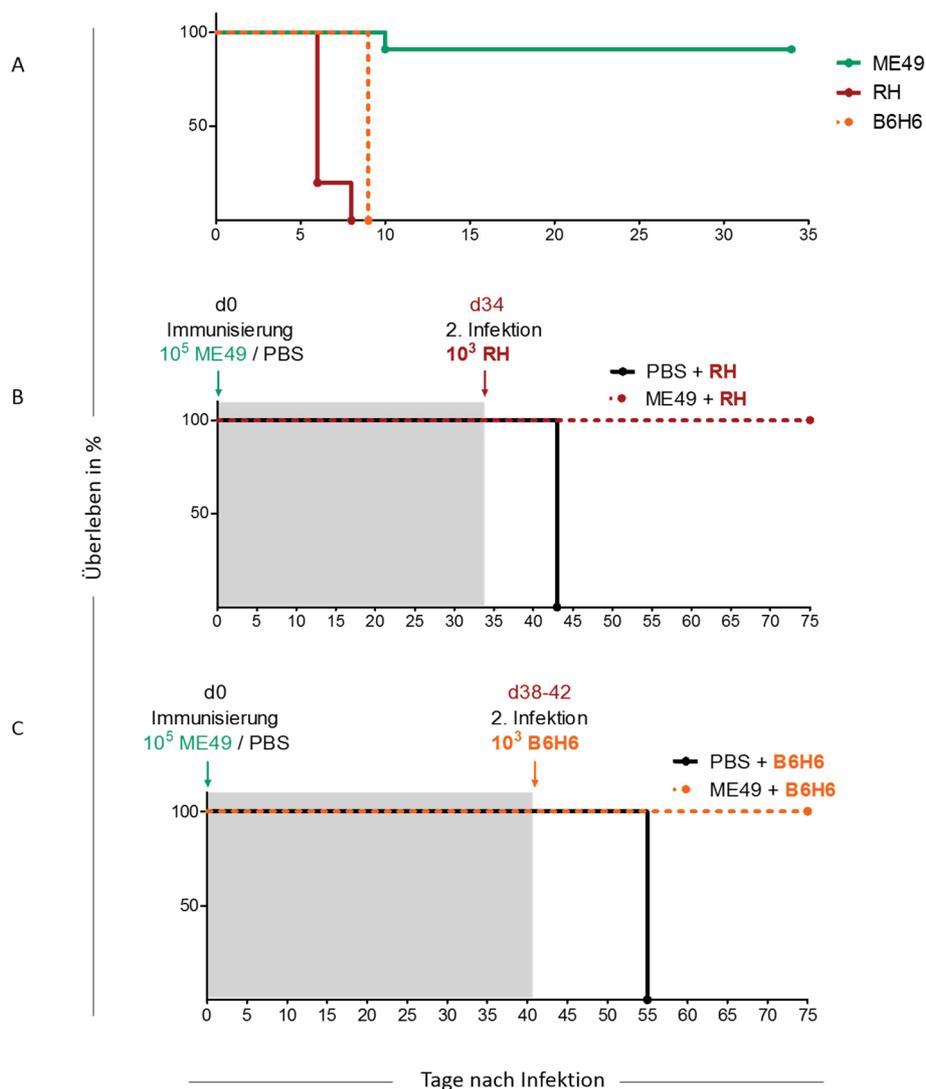
Während zehn von elf (91%) aller BALB/c Mäuse die Infektion mit  $10^5$  Tachyzoiten des mittel virulenten *T. gondii* Stammes ME49 überlebten (Abbildung 4.30 A, grüne Linie), verstarben alle Tiere, die mit  $10^3$  Tachyzoiten des hoch virulenten, typischen *T. gondii* RH infiziert worden waren bereits 6-8 Tage nach Infektion (Abbildung 4.30 A, rote Linie). Auch die Infektion mit  $10^3$  Tachyzoiten des, als hoch virulent beschriebenen, atypischen *T. gondii* Stammes B6H6 resultierte im Versterben aller Tiere 9 Tage nach der Infektion (Abbildung 4.30 A, orangefarbene, gepunktete Linie).

Erwartungsgemäß überlebten also nahezu alle Balb/c Mäuse, die mit ME49 infiziert worden waren die Infektion. RH Tachyzoiten induzierten, wie erwartet, eine einhundert prozentige Mortalität der Tiere innerhalb von zehn Tagen nach Infektion. B6H6, der sich im Bezug auf die GTPasen Rekrutierung eher wie ein intermediär virulenter Stamm verhielt, induzierte überraschenderweise eine ähnlich hohe Mortalität wie der RH Stamm.

Eine primäre Infektion mit einem *T. gondii* Typ-Stamm führt bei Menschen zu einer lebenslangen Immunität gegenüber dem Parasiten. Kommt eine latent infizierte Frau während einer Schwangerschaft in Kontakt mit einem der typischen *T. gondii* Stämme wird dieser folglich nicht auf das Ungeborene übertragen. Dagegen wurde für atypische Parasiten Stämme eine neue Rolle bei

der Ausbildung einer kongenitalen Toxoplasmose beschrieben: Zusammengefasst war der atypische *T. gondii* Genotyp in diesem Fall in der Lage, eine bestehende Immunität, die durch eine vorangegangene Infektion mit einem typischen Stamm ausgebildet worden war, zu durchbrechen. Als Konsequenz wurde der atypische Stamm auf den Fötus übertragen.

In Immunisierungs- und Infektionsstudien im Mausmodell sollte geklärt werden, ob der hoch virulente atypische *T. gondii* Stamm B6H6 eine bestehende Immunität gegenüber den typischen Parasiten Stämmen durchbrechen kann. Die Überlebenskurven in Abbildung 4.30 B/C fassen die Ergebnisse der Studien zusammen.



**Abbildung 4.30: Überlebenskurven der BALB/c Mäuse in verschiedenen Infektionsstudien mit unterschiedlich virulenten Toxoplasmen.** (A) BALB/c Mäuse wurden mit  $10^5$  Tachyzoiten des mittel virulenten *T. gondii* Stammes ME49 (grün,  $n=11$ ), mit  $10^3$  Tachyzoiten des hoch virulenten Typ I Stammes RH (rot,  $n=5$ ) oder mit  $10^3$  Tachyzoiten des, als hoch virulent beschriebenen, atypischen *T. gondii* Stammes B6H6 (orange,  $n=4$ ) infiziert. (B) und (C) BALB/c Mäuse wurden mit  $10^5$  ME49 infiziert oder erhielten PBS. 34 Tage (B) bzw. 38-42 Tage (C) nach dieser Immunisierung erfolgte eine zweite Infektion mit einer letalen Dosis an Tachyzoiten des hoch virulenten Typ I Parasiten RH (B,  $n=5$ ) oder des hoch virulenten atypischen Parasiten B6H6 (C,  $n=8$ ). Die zweite Infektion erfolgte dann, wenn die Tiere ca. 100% ihres Ausgangsgewichtes erreicht hatten (an Tag 34 bzw. 38-42). Das Überleben der Tiere wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen (A) bzw. 75 Tagen (B) und (C) nach Erstinfektion beobachtet.

Wurden BALB/c Mäuse mit  $10^5$  ME49 Tachyzoiten immunisiert, so überlebten nahezu alle Tiere die initiale Infektion und eine Zweitinfektion mit einer letalen Dosis an Tachyzoiten des hoch virulenten Typ I Parasiten (RH) (Abbildung 4.30 B, gepunktete rote Linie). Mäuse, die statt der immunisierenden ME49-Dosis PBS erhalten hatten, verstarben dagegen an einer solchen Infektion (Abbildung 4.30 B, schwarze Linie) vergleichbar mit den naiven Mäusen aus Abbildung 4.30 A.

Bei BALB/c Mäusen, die mit ME49 Tachyzoiten immunisiert worden waren, konnte auch dann kein Versterben der Tiere beobachtet werden, wenn die zweite Infektion mit einer letalen Dosis an Tachyzoiten des atypischen B6H6 Parasiten erfolgte (Abbildung 4.30 C, orangefarbene gepunktete Linie). Auch hier verstarb die Kontrollgruppe, die statt der immunisierenden ME49-Dosis PBS erhalten hatte (Abbildung 4.30 C, schwarze Linie) vergleichbar mit den naiven Mäusen aus 4.30 A.

**Zusammenfassend** konnten Tachyzoiten des hoch virulenten atypischen *T. gondii* Stammes B6H6 eine bestehende Immunität, die durch eine Erstinfektion mit einem Typ II Stamm etabliert worden war, nicht durchbrechen.

## 5. Diskussion

Mit einer weltweiten Seroprävalenz von durchschnittlich ca. 40% ist *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) einer der erfolgreichsten humanpathogenen Parasiten überhaupt. Bei einer Erstinfektion wird sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert, um eine rasche antiparasitäre Immunantwort zu gewährleisten. Während die angeborene Immunität gegen *T. gondii* gut erforscht ist, gehen die Kenntnisse über die adaptive Immunantwort weitaus weniger ins Detail. Als sicher gilt, dass der zellulären Immunantwort die wichtigste Rolle bei der Abwehr gegen den Parasiten zukommt, jedoch ist bisher nur wenig über die Toxoplasmen-Antigene bekannt, die vom Rezeptorkomplex der T-Zellen erkannt werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, zu analysieren, ob ausgewählte sekretorische Antigene des Parasiten als Zielstrukturen für eine solche Erkennung dienen können.

### 5.1. Sekretorische *T. gondii* Antigene als Zielstrukturen für die humane T-Zellantwort

Während einer primären *T. gondii* Infektion wird in immunkompetenten humanen Wirten eine zelluläre und humorale Immunantwort induziert, die in einer lebenslangen Immunität gegen eine Reinfektion resultiert. Nur wenige Studien beschäftigen sich mit der zellulären Immunität gegen *T. gondii* im Humansystem. Latent infizierte, gesunde Individuen bieten jedoch eine gute Möglichkeit, die Mechanismen der Langzeit-Immunität gegen den Parasiten zu untersuchen und die *T. gondii* Antigene, die von Memory-T-Zellen erkannt werden, zu analysieren. Die meisten der bisherigen Analysen wurden im murinen System durchgeführt. Sie fokussierten sich auf Oberflächen-Antigene („surface antigens“; SAGs), die spezifisch von der schnell replizierenden Form von *T. gondii*, den Tachyzoiten, exprimiert werden. Besonderes Augenmerk wurde in diesen Studien auf das Oberflächen-Antigen SAG1 gerichtet. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Immunisierung mit SAG1 eine schützende CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen eine ansonsten letal verlaufende Toxoplasmen-Infektion in Mäusen induziert (Khan et al., 1991). Die Bedeutung von SAG1 für die humane T-Zellantwort wurde 1988 von Khan und seinen Mitarbeitern untersucht, allerdings umfasste die Studie nur fünf latent infizierte Blutspender. In den Kulturen Peripherer Blut Mononukleärer Zellen (PBMC) aller fünf Spender konnte nach Stimulation mit SAG1 eine Aktivierung der T-Zellen beobachtet werden (Khan et al., 1988a). Eine Schlüsselrolle bei der Stimulation des Wirts-Immunsystems ist auch für die „excreted secreted antigens“ (ESAs) beschrieben, die zumeist sowohl im Tachyzoiten- als auch im Bradyzoiten-Stadium des Parasiten exprimiert werden. Die Haupt-Bestandteile der ESAs sind die GRA Proteine, die in den Dichte Granula, Organellen von *T. gondii* gespeichert und nach der Invasion des Parasiten vom apikalen Pol ausgehend in die parasitophore Vakuole (PV) sezerniert werden. In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass ESAs während experimentellen Infektionen hoch immunogen wirken und in der Lage sind Antikörper-abhängige und T-Zell-vermittelte protektive Immunantworten zu induzieren. So konnten beispielsweise Duquesne et al. zeigen, dass Nackt-Ratten, die vor der *T. gondii* Infektion ESAs-spezifische T-Helferzellen erhalten hatten, Toxoplasmen-spezifische Antikörper produzierten und eine signifikant niedrigere Mortalität aufwiesen (Duquesne et al., 1990). Im Humansystem konnte die immunogene Eigenschaft der ESAs vor allem durch serologische Studien belegt werden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ESAs bzw. Toxoplasma Lysat Antigen (TLA) die Aktivierung von Memory-T-Zellen in PBMC-Kulturen latent infizierter Individuen induzieren können. So beschrieb unsere Arbeitsgruppe z.B. die Generierung TLA-spezifischer T-Zell-Klone aus PBMC-Kulturen von latent mit *T. gondii* infizierten Testpersonen (Däubener et al., 1995). Andere Studien untersuchten die zelluläre Immunantwort gegen „soluble toxoplasma antigen“ (ST-Ag= lysierte Tachyzoiten, zentrifugiert und durch einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert) in PBMC-Kulturen von chronisch infizierten Schwangeren und konnten eine spezifische Aktivierung der T-Zellen nachweisen (Fatoohi et al., 2002).

Über das Ausmaß und den diagnostischen Wert einer spezifischen zellulären Immunantwort in Patienten mit kongenitaler und postnataler Toxoplasmose wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Einerseits berichten Studien, welche den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ( $^3\text{HT}$ ) zur Detektion einer T-Zell-Aktivierung nutzten, von einer Lymphozyten Anergie in Patienten mit kongenitaler Toxoplasmose (McLeod et al., 1985; Yamamoto et al., 2000). Andererseits konnte die Forschergruppe um Yamamoto auch eine signifikant höhere T-Zell-Proliferation in ST-Ag-stimulierten Kulturen kongenital und postnatal infizierter Personen, im Vergleich zu einer nicht infizierten Kontrollgruppe, zeigen.

Um diese kontroversen Befunde zu überprüfen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Studie an 68 freiwilligen Testpersonen durchgeführt, von denen 18 chronisch und 2 akut mit *T. gondii* infiziert waren. Die restlichen 48 Blutspender waren *T. gondii* seronegativ.

Da für Deutschland eine Seroprävalenz von 40-60% beschrieben ist, erscheint die niedrige Infektionsrate der achtundsechzig Testpersonen mit ca. 29% (20 von 68) zunächst überraschend niedrig. Die *T. gondii* Durchseuchungsrate ist jedoch stark vom Alter abhängig, da die Wahrscheinlichkeit mit dem Parasiten in Kontakt zu kommen mit zunehmendem Alter ansteigt. In Mitteleuropa nehmen diese Wahrscheinlichkeit und die Durchseuchungsrate um 1% pro Lebensjahr zu (Roos et al., 1993). Die Mehrzahl der achtundsechzig Testpersonen war unter bzw. knapp über 30 Jahre alt, sodass die gemessene Durchseuchungsrate von 29% gut zu der beschriebenen Altersabhängigkeit passt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in 100% der Zellkulturen seropositiver Spender nach Stimulation mit TLA spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, dass im Lysat des Parasiten Antigene vorhanden sind, welche als Zielstrukturen für die Aktivierung der zellulären adaptiven Immunantwort während einer *T. gondii* Primärinfektion dienen können. Die, in der PBMC-Kultur aktivierten T-Zellen, repräsentieren dabei wahrscheinlich zirkulierende Effektor Memory-Zellen, die nach dem Überwinden der Erstinfektion im Körper zurückbleiben und wahrscheinlich die immunologische Kontrolle des Bradyzoiten-Stadiums von *T. gondii* in Gewebezysten übernehmen können. Die positive Detektion einer TLA-spezifischen zellulären Immunantwort in Zellkulturen aller infizierten Spender steht im Einklang mit den Daten aus vergleichbaren Studien, in denen anstelle des Parasiten Lysats, ST-Ag zur Stimulation der T-Zellen verwendet wurde (Fatoohi et al., 2002; Fatoohi et al., 2003). Der Vergleich der Zellkulturen einzelner seropositiver Testpersonen zeigt eine starke Variabilität in der Höhe der erzielten Proliferationswerte nach TLA-Stimulation. Das Ausmaß der Zellvermehrung war dabei unabhängig vom gemessenen IgG Antikörpertiter (Daten nicht gezeigt) und ist wahrscheinlich auch auf den individuellen Immunstatus der Testpersonen zurückzuführen.

In vier von achtundvierzig Zellkulturen seronegativer Spender (ca. 8%) waren ebenfalls TLA-reaktive T-Zellen detektierbar, jedoch waren diese Proliferationswerte vergleichsweise niedrig. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam auch die Forschergruppe um Fatoohi, welche die ST-Ag-Aktivierbarkeit von T-Zellen latent infizierter und nicht infizierter Kleinkinder mittels FACS-Analyse testete und in 10% der seronegativen Kontrollgruppe reaktive T-Zellen detektierte (Fatoohi et al., 2003). Eine solche nicht spezifische Aktivierung könnte auf eine Kreuz-Reaktivität mit anderen Pathogenen zurückzuführen sein. So gab ein seronegativer Spender, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet wurde und TLA-reaktive T-Zellen besaß, beispielsweise an, aufgrund einer Malaria-Erkrankung in ärztlicher Behandlung gewesen zu sein. Der humanpathogene Erreger der Malaria, *Plasmodium falciparum*, gehört ebenso wie *T. gondii* zum Stamm der Apicomplexa. Für mindestens ein sekretorisches Toxoplasmen Rhoptrien Protein wurde bereits ein Homolog in Plasmodien gefunden (Narum et al., 2008), sodass eine Kreuz-Reaktivität nicht unwahrscheinlich ist.

Die über dem cut-off-Wert liegende Proliferation in vier Zellkulturen seronegativer Testpersonen, könnte auch durch eine polyspezifische T-Zell-Aktivierung als Resultat einer manifesten bakteriellen Infektion erklärt werden. Obwohl es bei den vier seronegativen Individuen keinen augenscheinlichen Hinweis auf eine solche Infektion gab, wurde dies im Rahmen der Arbeit nicht näher untersucht, sodass diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren ist in der Literatur ein Superantigen-ähnlicher Effekt von ST-Ag bei Mäusen beschrieben (Denkers et al., 1994), der folglich auch für TLA und evtl. für humane Zellkulturen gelten könnte. Da jedoch in nur vier von achtundvierzig Zellkulturen seronegativer Spender TLA-reaktive T-Zellen detektierbar waren und die Proliferationswerte dieser Zellen vergleichsweise niedrig ausfielen, ist ein Superantigen-ähnlicher Effekt von TLA in diesen Analysen eher unwahrscheinlich. Außerdem sind nur wenige Superantigene beschrieben, die sowohl auf murine als auch auf humane T-Zellen wirken (Rott et al., 1995).

Die T-Zellantwort gegen TLA in den Zellkulturen der vier seronegativen Testpersonen könnte auch durch eine nicht detektierte *T. gondii* Infektion oder aber durch eine erworbene Immunität in Abwesenheit einer messbaren Serokonversion erklärt werden. Letzteres wird in der Literatur bereits für das Herpes Simplex Virus (HSV) und das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) beschrieben: So konnte bei Personen, die HSV bzw. HIV nachweislich wiederholt und ungeschützt ausgesetzt waren, eine spezifische zelluläre Immunität bei gleichzeitig fehlender Serokonversion und der Absenz von Virus-DNS nachgewiesen werden (Posavad et al., 2003; Restrepo et al., 2010). Ob ein häufiger Kontakt mit *T. gondii* ebenfalls eine zelluläre Immunität in seronegativen Individuen induzieren kann, ist bisher nicht bekannt. Die Lebensgewohnheiten der vier seronegativen Testpersonen (z.B. Häufigkeit des Verzehrs von rohem Hackfleisch) könnten darüber Aufschluss geben, wurden im Rahmen der Studie jedoch nicht analysiert. Zusätzlich konnte unter anderem die Arbeitsgruppe um Fatoohi zeigen, dass einige kongenital infizierte Kinder einige Monate nach ihrer Geburt (bis zu 1 Jahr) reaktive T-Zellen gegen *T. gondii* besitzen, ohne dass in ihrem Serum *T. gondii*-spezifische Antikörper vorhanden sind (Fatoohi et al., 2003). Daten von Ciardelli et al. zeigen ferner, dass einige, nach der Geburt seropositive Neugeborene, nach einer erfolgreichen antiparasitären Therapie seronegativ werden. In diesen Kindern kann jedoch auch zu späteren Zeitpunkten noch eine *T. gondii*-spezifische T-Zellantwort detektiert werden (Ciardelli et al., 2008).

Über die Toxoplasmen-Antigene, die von reaktiven T-Zellen der Testpersonen im Lysat des Parasiten (TLA) erkannt werden, war zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit wenig bekannt. Der Antigen-Aufbau der Oberflächenantigene und der sezernierten Proteine unterscheidet sich jedoch in den verschiedenen Toxoplasmen Stämmen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen seropositiver Testpersonen gegen Antigene gerichtet sind, die in Lysaten der Klon-typischen Parasiten Stämme RH, ME49 und NED sowie in den Lysaten atypischer *T. gondii* Stämme (28H, 2C10, A7, B6H6) vorhanden sind. Eine solche Kreuz-Reaktivität wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die ebenfalls humane T-Zellen bzw. T-Zell-Klone und andere *T. gondii* Stämme verwendeten (Purner et al., 1995; Saavedra und Herion, 1991). Die Befunde stimmen des Weiteren gut mit veröffentlichten Daten überein, die zeigen, dass sich viele *T. gondii* Isolate auf Protein- oder DNS-Ebene sehr ähnlich sind (Bülow und Boothroyd, 1991; Parmley et al., 1994).

Zur Identifizierung T-Zell-reaktiver Antigene wurden in dieser Arbeit *T. gondii* Proteine verwendet, die in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe von Antikörpern im Serum infizierter Patienten erkannt wurden. Des Weiteren konnten SAG1, GRA1, GRA7 und ROP2 in Immunisierungsstudien am Mausmodell als Antigene identifiziert werden, die eine protektive Immunität gegen eine *T. gondii* Infektion auslösen können (Khan et al., 1991; Vercammen et al., 2000). In Studien von Prigione und seinen Mitarbeitern erkannten T-Zell-Klone, die von chronisch infizierten Menschen stammten, die *T.*

*gondii* Antigene GRA2 und SAG1 (Prigione et al., 2000). Als weiteres Antigen wurde BAG1 analysiert, welches in einer Studie von Di Cristina et al. ebenfalls von humanen T-Zellen erkannt worden war (Prigione et al., 2000). Von besonderem Interesse war außerdem GRA9, welches von unserer Arbeitsgruppe neu charakterisiert worden war (Adjogble et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Stimulation von PBMC *T. gondii* seropositiver und seronegativer Spender mit rekombinant hergestelltem GRA1, GRA2, GRA7, GRA9 und SAG1 eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erhöhte Proliferation in Zellkulturen infizierter Spender nachgewiesen werden. BAG1 hingegen stimulierte keine signifikant unterschiedliche Proliferation in beiden Testgruppen. Außerdem konnte ermittelt werden, dass keines der getesteten Antigene die T-Zell-Proliferation in Zellkulturen aller Seropositiven induziert. Viel mehr zeigen die T-Zellen unterschiedlicher seropositiver Testpersonen individuelle proliferative Antworten auf die getesteten Antigene. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten der Arbeitsgruppe um Fatoohi überein, welche die T-Zellantwort von *T. gondii* infizierten Schwangeren auf GRA1, GRA6, GRA7 und SAG1 analysierte und die T-Zell-Aktivierung anhand der Expression von CD25 mittels FACS-Analyse nachwies. Auch diese Gruppe detektierte eine heterogene T-Zellantwort auf die rekombinanten Toxoplasma Antigene (rAG) und keines der getesteten rAG konnte in Zellkulturen aller seropositiven Schwangeren eine T-Zell-Aktivierung induzieren (Fatoohi et al., 2002).

Des Weiteren ist die Frequenz mit der die Präsenz GRA1- und SAG1-spezifischer T-Zellen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, gut vergleichbar mit den Ergebnissen von Fatoohi und seinen Mitarbeitern. So konnten in der vorliegenden Arbeit in 75% der Zellkulturen seropositiver Testpersonen GRA1-reaktive und in 56% SAG1-spezifische T-Zellen detektiert werden. In der Publikation von Fatoohi et al. sind diese Werte mit 73% für GRA1 und 59% für SAG1 angegeben (Fatoohi et al., 2004). Dagegen war die Häufigkeit der, im Rahmen dieser Arbeit getesteten seropositiven Spender, die GRA7-spezifische T-Zellen besaßen mit 25% niedriger als die, von Fatoohi et al. detektierte Anzahl von 41%. Tendenziell besaßen jedoch in beiden Studien weniger Testpersonen GRA7-reaktive T-Zellen als GRA1- oder SAG1-spezifische T-Zellen. In sechs von zwanzig Zellkulturen *T. gondii* infizierter Testpersonen (30%) gelang in der vorliegenden Arbeit der Nachweis GRA9-reaktiver T-Zellen, in zehn von zwanzig (50%) der von GRA2-reaktiven T-Zellen. Im Gegensatz zu den publizierten Daten von Di Cristina et al., die in 34% der *T. gondii* seropositiven Patienten eine BAG1-induzierte T-Zell-Proliferation fanden (Di Cristina et al., 2004), stimulierte BAG1 in den hier gezeigten Analysen nur in einem Fall eine proliferative T-Zellantwort. Di Cristina et al. verwendeten zur Stimulation der PBMC latent infizierter Spender ein rekombinantes BAG1-Fragment. Dieses war anhand von Seren *T. gondii* infizierter Spender als immundominante Region identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde keine vergleichbare Vorauswahl getroffen, da die Detektion von antigenspezifischen Antikörpern im Serum ohnehin nicht den Schluss zulässt, dass T-Zellen die gleichen Antigene erkennen.

Die Heterogenität der T-Zellantwort auf die verschiedenen getesteten rekombinanten *T. gondii* Antigene, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den Publikationen von Fatoohi et al. und Di Cristina et al. beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auf die Polygenie und Polymorphologie des humanen „major histocompatibility complex“ (MHC) zurückzuführen. So liegen im Genom jedes Menschen individuell verschiedene MHC-Gene vor, sodass jedes Individuum einen bestimmten Satz an „human leukocyte antigens“ (HLA)-Molekülen exprimieren kann. Außerdem existieren in der gesamten menschlichen Population viele verschiedene Varianten der MHC-Gene. Die Bindung eines Peptids an ein HLA-Molekül ist abhängig vom Peptid-Motiv, sodass jedes individuelle HLA ein anderes Set von Peptiden binden kann. Während einer *T. gondii* Erstinfektion werden also unterschiedliche Peptide des Parasiten über individuelle HLA-Moleküle präsentiert. Als Konsequenz erfolgt in jedem

Infizierten die Aktivierung von T-Zellen, die individuell unterschiedliche Antigene des Parasiten erkennen und *in vitro* reaktiviert werden können.

Die heterogene T-Zellantwort auf die verschiedenen *T. gondii* Antigene könnte auch dadurch erklärt werden, dass die Infektion der seropositiven Testpersonen mit unterschiedlichen Stämmen des Parasiten erfolgte. Zur T-Zell-Stimulation wurden in dieser Arbeit ausschließlich rekombinante Antigene verwendet, deren Gensequenzen aus dem Genom eines Typ I Parasiten stammten. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass die T-Zellen von Spendern, die mit einem anderen Typ-Stamm infiziert sind, die Typ I Antigene nicht erkennen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Sequenzen der verwendeten Antigene in Typ I (RH) und Typ II (ME49) Stämmen mit Hilfe der „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST)-Funktion auf der Homepage des „National Center für Biotechnology Information“ (NCBI) verglichen. Während sich für GRA2 und BAG1 eine einhundert prozentige Übereinstimmung ergab, wurde für GRA1, GRA7 und SAG1 eine Abweichung von je 3% und für GRA9 eine Abweichung von 1% festgestellt. Diese genetische Variation erlaubt die Spekulation, dass die Spender, deren T-Zellen weder GRA1 noch GRA7, GRA9 oder SAG1 erkennen, eventuell mit einem anderen *T. gondii* Stamm als Typ I infiziert sind. Gegen die Hypothese spricht jedoch eine Prädominanz von Typ II Parasiten in Toxoplasmose-Patienten in Deutschland (Herrmann et al., 2014) und die Tatsache, dass in Europa eine humane Infektion in mehr als 90% durch einen Typ II Stamm ausgelöst wird (Ajzenberg et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass auch die meisten seropositiven Spender, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet wurden, mit *T. gondii* Typ II infiziert sind. Da die Mehrzahl dieser Testpersonen spezifische T-Zellen gegen das Typ I-abgeleitete GRA1 Antigen besitzt (75%), scheint der *T. gondii* Typ, mit dem die Erstinfektion erfolgte, für die *in vitro* Aktivierung der T-Zellen eine weniger wichtige Rolle zu spielen.

Vergleichbar mit der heterogenen proliferativen T-Zellantwort auf die verschiedenen *T. gondii* Antigene, konnte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Hotop (Universitätsmedizin, Göttingen) mittels Line blot-Analyse festgestellt werden, dass sich die rekombinanten *T. gondii* Proteine, die von Antikörpern erkannt werden, ebenfalls von einer Testperson zur anderen unterscheiden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch nicht evaluiert werden inwiefern die ausgewählten, rekombinant hergestellten GRA Proteine für die serologische Diagnose einer *T. gondii* Infektion von Nutzen sein können. Vielmehr wurde der Fokus auf den Vergleich der Präsenz antigenspezifischer T-Zellen in Zellkulturen seropositiver Testpersonen mit der Präsenz von IgG Antikörpern gegen dieselben Antigene im Serum der einzelnen Spender gelegt. Dieser Vergleich erlaubte die Einteilung der getesteten *T. gondii* Antigene in drei Gruppen: In der ersten Gruppe befinden sich die Antigene GRA1 und GRA2, die häufig sowohl von T-Zellen als auch von Antikörpern erkannt wurden. GRA7 und GRA9 dienen vorwiegend als Zielstrukturen für die humorale Immunantwort und lassen sich daher einer zweiten Gruppe zuordnen. SAG1 wird in dieser Arbeit ausschließlich von der zellulären Immunantwort erkannt und gehört damit einer dritten Gruppe an. Auffällig ist hierbei, dass es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war im Serum latent infizierter Spender Antikörper gegen SAG1 mittels Line blot nachzuweisen. Im Gegensatz dazu sind in der Literatur Veröffentlichungen zu finden, in denen SAG1-spezifische Antikörper bei Patienten mit akuter und chronischer *T. gondii* Infektion detektiert werden konnten (Pfrepper et al., 2005; Pietkiewicz et al., 2004). Diese Diskrepanz könnte zum einen darin begründet sein, dass in den genannten Studien anstelle eines Line blot-Assays, „Enzyme Linked Immunosorbent Assays“ (ELISAs) zum Nachweis SAG1-spezifischer Antikörper verwendet wurden. Obwohl der Immunoblot ebenso wie der ELISA für die serologische Detektion einer antigenspezifischen Immunantwort geeignet ist, sind die beiden Methoden grundsätzlich verschieden. So unterscheidet sich z.B. die Bindung der Proteine an die verwendeten Oberflächen und die Detektionsart der Antikörper (enzymatische Farbreaktion vs. Chemilumineszenz), wodurch ein direkter Vergleich beider

Methoden schwierig ist. Zudem wird in der Literatur oftmals nicht, wie in dieser Arbeit das komplette SAG1 Protein, sondern ausgewählte Proteinsequenzen zur Detektion spezifischer Antikörper verwendet (Kotresha und Noordin, 2010).

Auch die Präparation der rekombinanten Proteine könnte einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit spezifischer Antikörper, nicht jedoch auf die, spezifischer T-Zellen haben und erklären warum SAG1 in dieser Arbeit ausschließlich von der zellulären Immunantwort erkannt wurde. So sind Antikörper bei der Erkennung ihrer Antigene streng auf deren Struktur angewiesen, die sich nur durch eine korrekte Proteinfaltung ergibt und beispielsweise bei einer denaturierenden Proteinaufreinigung nicht immer erhalten bleibt. Dagegen sind T-Zell-Antigene kurze Peptide, die weitgehend unabhängig von der Tertiär-Struktur präsentiert und erkannt werden können.

Außerdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass native *T. gondii* Antigene oftmals eine andere Proteinfaltung und unterschiedliche posttranslationale Modifikationen aufweisen, als rekombinant hergestellte Antigene, was zu einer unterschiedlichen Reaktivität mit Antikörpern im Serum infizierter Testpersonen führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Immunantwort außerdem durch die durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils an Zellen analysiert, die nach 24-stündiger Antigen-Stimulation das Aktivierungsantigen CD40L exprimierten. Die Erhöhung der CD40L Expression kann als Indikator für eine T-Zell-Aktivierung gewertet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines *T. gondii* seropositiven Spenders gezeigt werden, dass die Expression von CD40L häufig mit der Produktion von IFN $\gamma$  einhergeht. Überdies bestätigte die FACS-Analyse tendenziell die Ergebnisse des Proliferationsassays. So war nach Stimulation mit dem Antigen, welches die stärkste T-Zell-Proliferation in der PBMC-Kultur des seropositiven Spenders induziert hatte, auch am Durchflusszytometer die höchste Anzahl aktivierter T-Zellen detektierbar. Dieses exemplarisch durchgeführte Experiment und auch die Studien von Fatoohi et al. weisen darauf hin, dass es mittels FACS-Analyse generell möglich ist *T. gondii* infizierte von nicht infizierten Individuen anhand ihrer antigenstimulierten T-Zell-Aktivierung zu unterscheiden. Der Vorteil der FACS-Methode, die in der vorliegenden Arbeit für die Antigen-abhängige Detektion aktivierter T-Zellen vorgeschlagen wird, besteht gegenüber der Methode von Fatoohi et al. zum einen in der einfacheren Handhabung und zum anderen in der kürzeren Gesamtdauer des Assays. So kann die Dauer des FACS-Assays, der von Fatoohi und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde, mit Hilfe der, in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Methode von sieben Tagen auf vierundzwanzig Stunden verkürzt werden. Außerdem entfällt durch die Verwendung von Vollblut die aufwendige Aufreinigung von PBMC. Der FACS-Assay, der in der vorliegenden Arbeit zur Detektion einer *T. gondii* Infektion verwendet wird, unterscheidet sich zusätzlich von dem, der von Fatoohi und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde, darin, dass anstelle des Oberflächenmarkers CD25 die intrazelluläre Kumulation von IFN $\gamma$  als Nachweis der T-Zell-Aktivierung detektiert wird. Dabei liegt die Nachweisgrenze der Produktion von IFN $\gamma$  weit unter der Nachweisgrenze der Expression von Oberflächenmarkern.

Als weitere hoch sensitive Messmethode zur Detektion einer eventuell sehr geringen Anzahl an aktivierten Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit „Enzyme Linked Immuno Spot Assays“ (ELISpots) durchgeführt. Mit Hilfe des ELISpot-Assays können individuelle Zellen, die spezifische Zytokine sekretieren, detektiert werden. Damit ermöglicht diese Methode quantitative Aussagen zur Frequenz *T. gondii*-antigenspezifischer T-Zellen. Da ein kommerziell erhältlicher Dual-Farben IFN $\gamma$ / Interleukin 4 (IL-4) ELISpot verwendet wurde, kann die Zytokin Produktion aktivierter T-Zellen außerdem näher differenziert werden. Nach Antigen-Stimulation konnte in Zellkulturen *T. gondii* seropositiver Testpersonen eine deutlich höhere Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender Zellen im Vergleich zur Frequenz IL-

4-produzierender Zellen detektiert werden. Da IFN $\gamma$  zum Zytokinrepertoire von T<sub>H</sub>1-Zellen gehört, IL-4 dagegen hauptsächlich von T<sub>H</sub>2-Zellen produziert wird, kann darauf geschlossen werden, dass die *T. gondii* Infektion vornehmlich die Aktivierung von T<sub>H</sub>1-Zellen induziert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten, die für das murine System publiziert sind und ebenfalls die Induktion einer starken adaptiven T<sub>H</sub>1-vermittelten Immunantwort in Folge einer *T. gondii* Infektion beschreiben. Außerdem publizierte die Arbeitsgruppe um Fatoohi vergleichbare Daten, die ebenfalls eine starke Antigenvermittelte IFN $\gamma$  Produktion bei gleichzeitiger Abwesenheit einer IL-4 Produktion in Zellkulturen *T. gondii* seropositiver Individuen belegen (Fatoohi et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nach Stimulation mit TLA in allen Zellkulturen der seropositiven Spender eindeutig aktivierte, IFN $\gamma$ -produzierende T-Zellen mittels ELISpot-Assay nachgewiesen werden. Zellen der seronegativen Kontrollgruppe blieben unter den gleichen Kultivierungsbedingungen dagegen inaktiv. Damit erlaubt die Detektion TLA-spezifischer T-Zellen mit Hilfe des ELISpot-Assays zumindest in der relativ kleinen Gruppe, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde, eine eindeutige Unterscheidung zwischen *T. gondii* infizierten und nicht infizierten Individuen. Obwohl sich daraus ein großes diagnostisches Potential ableiten lässt, sind in der Literatur bisher nur wenige Publikationen zu finden, welche die Verwendung eines ELISpot-Assays für den Nachweis einer *T. gondii* Infektion beschreiben. Ciardelli et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Detektion einer spezifischen T-Zell-Immunität gegen ST-Ag mittels ELISpot-Assay eine eindeutigere und frühere Diagnose einer kongenitalen *T. gondii* Infektion bei Neugeborenen erlaubt als die üblichen serologischen Nachweismethoden (Ciardelli et al., 2008).

Bei der Analyse der Reaktivität mit den rekombinanten Antigenen, waren IFN $\gamma$ -produzierende Zellen am häufigsten nach einer Stimulation mit GRA2 (5 von 6), GRA1 (4 von 6) und SAG1 (3 von 6) detektierbar. Somit wurde die besondere Bedeutung dieser Antigene für die zelluläre Immunantwort, die zuvor anhand der Proliferationsassays gezeigt wurde, auch mittels ELISpot-Assay nachgewiesen. Tendenziell bestätigte der ELISpot, ebenso wie die FACS-Analyse die individuellen Ergebnisse des Proliferationsassays: Auch hier stimulierte das Antigen die stärkste IFN $\gamma$  Produktion, welches in der PBMC-Kultur des gleichen seropositiven Spenders die höchste T-Zell-Proliferation induziert hatte.

**Zusammenfassend** konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mindestens eines der getesteten rekombinanten Antigene GRA1, GRA2, GRA7 und SAG1 von den T-Zellen der meisten chronisch infizierten Individuen erkannt wird. Diese Antigene induzieren *in vitro* eine T-Zellantwort, die mit einer T-Zell-Proliferation und mit der Produktion von T<sub>H</sub>1 Zytokinen einhergeht, jedoch konnte weder GRA1 noch GRA2, GRA7 oder SAG1 von den T-Zellen aller *T. gondii* infizierten Testpersonen erkannt werden. Die Zellen einer Testperson reagierten sogar auf keines der individuellen rekombinanten Antigene, obwohl eine starke Antwort auf TLA zu beobachten war. Der erhebliche Unterschied der individuellen zellulären Immunantwort gegen verschiedene *T. gondii* Antigene, die in dieser und anderen Arbeiten beschrieben wird, muss bei der Entwicklung eines T-Zell-basierten diagnostischen Tests in jedem Fall berücksichtigt werden. So ist es höchstwahrscheinlich erforderlich eine Kombination von rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigenen zu verwenden, um eine Immunantwort in Zellkulturen aller *T. gondii* infizierten Menschen sicher zu detektieren. Auch bei der Entwicklung eines zukünftigen Impfstoffes gegen *T. gondii* muss die individuelle T-Zellantwort gegen verschiedene Antigene zwingend beachtet werden. Vergleichbar damit werden auch beim kommerziell erhältlichen ELISpot-Assay „T-SPOT-TB“, der in der Diagnostik zur Detektion der Tuberkulose (TB) eingesetzt wird, zwei unterschiedliche TB-Antigene zur Stimulation der PBMC verwendet. Auch hier besitzen nicht alle infizierten Patienten T-Zellen, die beide TB-Antigene gleichermaßen erkennen.

## 5.2. Das T-Zell-Produkt (IFN $\gamma$ ) vermittelt protektive Effekte gegenüber *Toxoplasma gondii*

Das zelluläre Immunsystem spielt bei der Abwehr von *T. gondii* die wichtigste Rolle. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die gleichzeitige Depletion CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer chronischen *T. gondii* Infektion zur Reaktivierung des Parasiten und zum Versterben des Wirtes führt (Gazzinelli et al., 1992). Außerdem verstarben SCID-Mäuse, die keine T-Zellen besitzen, beim Übergang von der akuten in die chronische Phase einer *T. gondii* Infektion (Johnson, 1992). Aktivierte *T. gondii*-spezifische T-Zellen haben während der Infektion verschiedene Funktionen und gewährleisten so die effektive Abwehr von *T. gondii*. Zytotoxische T-Zellen lysieren *Toxoplasma* infizierte Zellen und können so intrazelluläre Parasiten freisetzen. Diese sind dann für Antikörper zugänglich und können anschließend durch das Komplementsystem beseitigt werden. Der wichtigste protektive Effekt Toxoplasmen-spezifischer T-Zellen ist jedoch nicht die zytotoxische Aktivität, sondern ihre IFN $\gamma$  Produktion. Bereits 1988 konnten Suzuki et al. zeigen, dass IFN $\gamma$  das wichtigste Zytokin ist, das eine Resistenz des Wirtes gegen *T. gondii* induziert (Suzuki et al., 1988). IFN $\gamma$  aktiviert Effektormechanismen, die antiparasitär auf das Wachstum und die Verbreitung von *T. gondii* wirken. Im Humansystem sind diese Effektorzellen Makrophagen aber auch akzessorische, nicht professionelle antigenpräsentierende Körperzellen, beispielsweise Fibroblasten. Die IFN $\gamma$ -Stimulation dieser Zellen induziert die Aktivierung des Tryptophan-abbauenden Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). Der entstehende Mangel der essentiellen Aminosäure Tryptophan führt dann zur Hemmung des Parasiten-Wachstums.

Vergleichbar mit Studien von Fatoohi et al. (Fatoohi et al., 2002) konnte in der vorliegenden Arbeit mittels ELISpot- und FACS-Analyse gezeigt werden, dass stimulierte TLA- bzw. rAG-spezifische T-Zellen latent infizierter Testpersonen IFN $\gamma$  produzieren. Die Überstände, die nach TLA- bzw. rAG-Stimulation von T-Zellen seropositiver Testpersonen geerntet wurden und sezerniertes IFN $\gamma$  enthielten, induzierten die Aktivität des IDO Enzyms in humanen Fibroblasten. Dies konnte durch die Detektion des Tryptophan-Abbauproduktes Kynurenin im Überstand der aktivierten Fibroblasten nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Menge des nativen IFN $\gamma$  im PBMC-Überstand ausreicht, um IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte gegen *T. gondii* Typ I (RH) in diesen Zellen auszulösen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Khan et al. publiziert, die jedoch lediglich SAG1-spezifische T-Zellen seropositiver Individuen stimulierten und deren Überstand zur Induktion der IDO verwendeten (Khan et al., 1988a). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur T-Zellen, die spezifisch das *T. gondii* Membranprotein SAG1 erkennen, sondern auch solche, die reaktiv gegen Dichte Granula Antigene (GRA1, GRA2, GRA7 und GRA9) sind, die Aktivität des IDO Enzyms induzieren und somit potentiell der Vermehrung von hoch virulenten *T. gondii* Typ I entgegenwirken.

Bereits 1984 konnten Pfefferkorn et al. zeigen, dass die Induktion des IDO Enzyms den wichtigsten IFN $\gamma$ -vermittelten Effektormechanismus zur Abwehr des hoch virulenten *T. gondii* Typ I (RH) in humanen Fibroblasten darstellt (Pfefferkorn, 1984). Dagegen war zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht bekannt, welche Rolle der IDO-katalysierte Abbau von Tryptophan in der Abwehr der niedriger virulenten typischen und atypischen *T. gondii* Stämme spielt. Ein fundiertes Verständnis der Immunabwehr und der Effektormechanismen gegen diese Parasiten Stämme ist jedoch gerade im Humansystem von großem Interesse. So sind 90% der seropositiven europäischen Bevölkerung keineswegs mit dem gut beschriebenen hoch virulenten *T. gondii* Typ I (RH) infiziert, sondern mit niedriger virulenten Typ II Stämmen (Ajzenberg et al., 2002), über deren Abwehr beim Menschen viel weniger bekannt ist. Darüber hinaus sind in Mittel- und Südamerika hauptsächlich atypische *T. gondii* Stämme zu finden (Dubey et al., 2007; Dubey et al., 2008; Lehmann et al., 2006),

was darauf schließen lässt, dass die humanen Infektionen in dieser Region ebenfalls nicht von Typ I (RH), sondern von den gefundenen atypischen Parasiten Stämmen ausgehen. Somit werden die meisten prä- und postnatalen humanen Toxoplasmosen von niedriger virulenten typischen oder atypischen *T. gondii* Stämmen verursacht. Daher sind die Effektormechanismen, die in humanen Zellen gegen diese *T. gondii* Stämme wirksam sind, für klinisch-therapeutische Ansätze und vorbeugende Maßnahmen von großem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass humane Fibroblasten durch einenIDO-abhängigen Mechanismus in der Lage sind, neben dem Wachstum des hoch virulenten Typ-Stammes RH, auch die Vermehrung von BK Parasiten zu hemmen, die sich dem gleichen Klon-Typ zuordnen lassen. Um die Beteiligung des IDO Enzyms an dem antiparasitären Effekt zu belegen, wurde gezeigt, dass eine Tryptophan-Supplementierung die IFN $\gamma$ -induzierte Inhibition des RH- und BK-Wachstums vollständig aufhebt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Aktivität des IDO Enzyms in humanen Fibroblasten essentiell für die Wachstumskontrolle aller hoch virulenten *T. gondii* Typ I Stämme sein könnte.

Im Gegensatz dazu konnte der IFN $\gamma$ -induzierte antiparasitäre Effekt gegen die geringer virulenten *T. gondii* Stämme ME49 und NED durch die Zugabe von Tryptophan zwar signifikant, jedoch nicht vollständig blockiert werden. Ebenso konnte die Tryptophan-Supplementierung bei keinem der drei getesteten mittel bzw. niedrig virulenten atypischen Stämme eine vollständige Aufhebung der Parasitenhemmung vermitteln. Somit muss in humanen Fibroblasten neben der Induktion des IDO Enzyms ein weiterer IFN $\gamma$ -vermittelter antiparasitärer Effektormechanismus existieren, der selektiv gegen die niedrig virulenten *T. gondii* Stämme aktiv ist.

Außer dem IFN $\gamma$ -abhängigen Abbau von Tryptophan sind in der Literatur zwei weitere wichtige antiparasitäre Abwehrmechanismen in infizierten Zellen beschrieben, die ebenfalls durch das Effektormolekül IFN $\gamma$  aktiviert werden.

So ist zum ersten bekannt, dass IFN $\gamma$  die induzierbare „Nitric Oxide Synthase“ (iNOS) aktivieren kann, welche den Umsatz von L-Arginin zu NO katalysiert (Adams et al., 1990). NO wirkt mikrobiozid auf *T. gondii*, außerdem sind NO Intermediate in der Lage die parasitophore Vakuole zu durchdringen und können hier Proteine des Parasiten modifizieren. Insbesondere die Inhibierung metabolischer Enzyme durch NO hat einen wichtigen zytostatischen Effekt auf mikrobielle Pathogene (Fang, 2004). Zusätzlich zum zytostatischen Effekt der iNOS wirkt der Abbau des Edukts Arginin wachstumshemmend auf die streng Arginin-auxotrophen Toxoplasmen (Fox et al., 2004). Die Induktion der NO Produktion vermittelt in murinen *in vitro* und *in vivo* Systemen einen wichtigen antiparasitären Effekt. Bisher geht man jedoch davon aus, dass die iNOS für die Kontrolle des *T. gondii*-Wachstums in humanen *in vitro* Systemen keine entscheidende Rolle spielt. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass die iNOS-Aktivierung der alternative IFN $\gamma$ -vermittelte Effektormechanismus ist, der in humanen Fibroblasten neben der Induktion des IDO Enzyms existiert und selektiv gegen die niedrig virulenten *T. gondii* Stämme wirkt.

Der zweite Abwehrmechanismus, der durch IFN $\gamma$  in murinen infizierten Zellen induziert wird, ist die Aktivierung antiparasitär wirkender GTPasen. Diese werden in „Immune Related“ p47 GTPasen (IRGs) und die p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) unterteilt. Die Proteine beider Klassen rekrutieren im Falle einer *T. gondii* Infektion IFN $\gamma$ -abhängig an die parasitophore Vakuole (PV) von Typ II und Typ III Parasiten (Degrandi et al., 2007; Taylor et al., 2004). Diese Ansammlung an der PV führt zur Zerstörung der Vakuole, wodurch der Parasit schließlich eliminiert wird. Die Virulenz des Parasiten Stammes, mit dem die Infektion erfolgt, determiniert die Wirksamkeit dieses antiparasitären Mechanismus: Zusammengefasst produzieren ausschließlich die Vertreter des hoch virulenten Typ I Stammes Proteine, die das Beladen der PV durch IRGs und GBPs verhindern und somit der Parasiten-

Eliminierung durch GTPasen entgegenwirken. Da niedriger virulente Stämme nicht in der Lage sind diese Proteine zu synthetisieren, ist der IFN $\gamma$ -vermittelter Effektormechanismus der GTPasen selektiv gegen niedriger virulente *T. gondii* Stämme aktiv. Auch wenn bei Menschen die große Protein-Familie der IRGs fehlt (Bekpen et al., 2005), sind humane IFN $\gamma$ -induzierbare GBPs vorhanden (Cheng et al., 1991). Somit könnte es möglich sein, dass die IFN $\gamma$ -Stimulation humaner Fibroblasten neben derIDO auch die Hochregulation humaner GBPs induziert, was dann einen zweiten IFN $\gamma$ -vermittelten Effektormechanismus darstellen würde. Dieser könnte neben derIDO selektiv gegen die niedriger virulenten *T. gondii* Stämme wirken, sodass sich die kombinierte antiparasitäre Wirkung beider Effektormechanismen, wie beobachtet, nur partiell durch eine Tryptophan-Supplementierung aufheben ließe. So zeigten Niedelman et al. bereits, dass der Knockdown von humanem GBP1 und GBP2 in humanen Fibroblasten das Wachstum des hoch virulenten *T. gondii* Stammes RH nicht beeinflusst (Niedelman et al., 2013). Der Einfluss eines solchen Knockdowns auf das Wachstum niedriger virulenter Parasiten Stämme ist bisher nicht bekannt.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kenntnis darüber, in welchem Ausmaß sich das Stamm-spezifische *T. gondii*-Wachstum in IFN $\gamma$ -stimulierten humanen Fibroblasten durch Tryptophan-Supplementierung antagonisieren lässt, keinen sicheren Rückschluss auf die phänotypische Virulenz in Mäusen zulässt. So ließ sich das Wachstum des hoch virulenten atypischen *T. gondii* Stammes B6H6, im Gegensatz zu den ebenfalls hoch virulenten Typ-Stämmen RH und BK, durch Zugabe von Tryptophan nicht vollständig wiederherstellen. Das Ausmaß der „Tryptophan-Antagonisierbarkeit“ ist letztendlich ein Synonym dafür, welchen Stellenwert dasIDO Enzym bei der Abwehr des jeweiligen Parasiten in humanen Fibroblasten einnimmt: Da das Wachstum der Typ I Parasiten in IFN $\gamma$ -stimulierten humanen Fibroblasten vollständig durch Tryptophan wiederhergestellt werden kann, ist derIDO-vermittelter Abbau von Tryptophan folglich der einzig wichtige IFN $\gamma$ -induzierte Abwehrmechanismus, der in humanen Fibroblasten gegen RH bzw. BK aktiv ist. Im Gegensatz dazu ist gegen den phänotypisch ebenfalls hoch virulenten B6H6 Stamm in humanen Fibroblasten neben derIDO vermutlich noch ein weiterer IFN $\gamma$ -induzierter antiparasitärer Mechanismus vorhanden, denn das Wachstum der B6H6 Parasiten lässt sich durch die Zugabe von Tryptophan nicht vollständig wiederherstellen.

Unabhängig von jeglicher IFN $\gamma$ -Stimulation ist für Typ I Stämme beschrieben, dass sie sich in humanen Fibroblasten bis zu ein Drittel schneller reproduzieren können als Typ II oder Typ III Stämme (Boothroyd und Grigg, 2002). Dieser Unterschied der *in vitro* Wachstumsrate wurde jedoch durch die prozentuale Auswertung der Proliferationsdaten berücksichtigt: Als einhundert prozentiges (maximales) Wachstum wurde für jeden Stamm die individuelle *T. gondii*-Proliferation definiert, die in unstimulierten HFF und in Abwesenheit von Tryptophan detektiert werden konnte. Dann wurde analysiert zu welchem prozentualen Anteil das Wachstum der unterschiedlichen *T. gondii* Stämme bei einer IFN $\gamma$ -induzierten Parasiten-Hemmung von ca. 80% durch die Zugabe von Tryptophan wiederhergestellt werden konnte. Durch diese prozentuale Auswertung der Daten ist sicher gestellt, dass die oben beschriebenen Stamm-spezifischen Unterschiede nicht auf einem Wachstumsvorteil der Typ I Parasiten beruhen.

**Zusammenfassend** konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Zellkulturüberstände stimulierter T-Zellen von *T. gondii* seropositiven Individuen das Wachstum der Typ I Parasiten Stämme inhibieren. Der antiparasitäre Effekt der Überstände korrelierte mit der Induktion desIDO Enzyms und dem Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Dieser Abwehrmechanismus wurde bereits für humane Fibroblasten beschrieben, die mit rekombinantem IFN $\gamma$  stimuliert wurden. Somit kann man

davon ausgehen, dass das antiparasitäre Effekte auslösende Effektmolekül im T-Zellüberstand natives IFN $\gamma$  ist, welches ein wichtiger Botenstoff bei der Protektion gegen Toxoplasmen im humanen Organismus zu sein scheint. Zusätzlich zeigen die erarbeiteten Daten, dass es neben der IDO einen weiteren IFN $\gamma$ -vermittelten Abwehrmechanismus geben muss, der selektiv gegen niedrig virulente Toxoplasmen Stämme aktiv ist.

### 5.3. Sekretorische *T. gondii* Antigene als Zielstrukturen für die porcine T-Zellantwort

Bei der Toxoplasmose handelt es sich um eine Zoonose, also eine Krankheit, die vom Tier auf den Menschen übertragen wird. In Zwischenwirten, wie Säugetieren und Vögeln vermehrt sich *T. gondii* ausschließlich ungeschlechtlich und bildet letztendlich Gewebezysten aus, in denen der Parasit für die gesamte Lebensdauer des Zwischenwirtes persistieren kann. Besonders ausgeprägt ist die Zystenbildung dabei im Muskelgewebe und im Gehirn. Durch den Verzehr von zystenhaltigen ungarischen Fleischprodukten kann *T. gondii* auf den Menschen übertragen werden. Je nach Region und Kultur spielen dabei Fleischprodukte von unterschiedlichen Tierarten eine Rolle. In der europäischen Union liegt der pro Kopf Verzehr von Schweinefleisch deutlich an erster Stelle (Fleischatlas 2014). Speziell in Deutschland wurde in den Jahren 2010-2013 ca. vier Mal so viel Schweinefleisch pro Kopf verzehrt wie Geflügel- oder Rindfleisch (Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V.). Tenter et al. konnten zeigen, dass *T. gondii* Zysten häufig in Geweben von Schweinen vorkommen. Dagegen wurden in Geflügelfleisch und Rindfleisch nur sehr wenige Gewebezysten gefunden (Tenter et al., 2000). Somit spielt in Deutschland wahrscheinlich der Konsum von Schweinefleisch eine besonders wichtige Rolle bei der Übertragung des Parasiten auf den Menschen.

Für die Detektion von *T. gondii* infizierten Schweinen sind in der Literatur verschiedene Methoden, einschließlich dem serologischen Nachweis von Antikörpern, Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zum Nachweis von Toxoplasmen DNS aus Schlachtgut und der „Katzen Bioassay“ beschrieben. Für diesen wird rohes Schweinefleisch an Katzen verfüttert und der Fäzes der Katze vierzehn Tage lang auf die Präsenz von *T. gondii* Oozysten untersucht. Der Katzen Bioassay stellt eine hoch sensitive Methode zur Detektion der parasitären Infektion dar und wird als Goldstandard angesehen (Dubey, 2001; Dubey und Frenkel, 1976). Diese Nachweismethode ist jedoch nicht praktikabel, um Schlachtgut in einer hohen Durchsatzrate für den Verbrauchermarkt zu analysieren und gegebenenfalls zystenhaltiges Fleisch davon auszuschließen. Die PCR-Analyse auf das Vorhandensein von *T. gondii* DNS ist ebenfalls problematisch, da für diese Methode nur Stichproben des Schlachtkörpers entnommen werden können. Nicht alle Gewebeteile sind von der Zystenbildung des Parasiten gleichermaßen betroffen, sodass ein negatives Ergebnis zwar Rückschlüsse auf das analysierte Gewebe-Teilstück, nicht jedoch auf das gesamte Gewebe oder den kompletten Schlachtkörper zulässt. Aus diesem Grund ist eine systemische Analyse des Schlachttieres zur Detektion einer *T. gondii* Infektion besser geeignet. So beschrieben beispielsweise Hill et al. den Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern mittels Serum-ELISA und einem modifizierten Agglutinations-Test (MAT). Die ELISA-Methode wies mit einer Sensitivität von 100% spezifische Antikörper im Serum *T. gondii* infizierter Tiere nach, jedoch war die Spezifität sehr gering. So wurden zwei von vier Proben nicht infizierter Tiere mittels ELISA als falsch positiv identifiziert. Dagegen wurden mit dem Agglutinations-Test zwar keine negativen Proben als positiv identifiziert, jedoch lag die Sensitivität dieser Methode bei nur 80% (Hill et al., 2006).

Insgesamt zeigten die Veröffentlichungen, dass zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine zugleich zuverlässige und praktikable Methode zum Nachweis einer *T. gondii* Infektion in Schweinen existierte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Möglichkeit überprüft, eine *T. gondii* Infektion bei experimentell infizierten Schweinen mittels T-Zell-basierter Diagnostik nachzuweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der T-Zell-Proliferationsassay mit einer Sensitivität von 100% TLA-spezifische T-Zellen in Zellkulturen experimentell *T. gondii* infizierter Schweine nachwies. Die Spezifität dieser Methode lag ebenfalls bei 100%, sodass keine uninfizierten Tiere als *T. gondii* positiv identifiziert wurden. Die Sensitivität der Methode war damit zwischen den getesteten Spezies, Mensch und Schwein, vergleichbar. Im Gegensatz zu den Studien mit humanen Spendern war die optimale Kultivierungsdauer der porcinen PBMC mit drei anstelle von fünf Tagen kürzer. Dies war zum einen darin begründet, dass, anders als in der humanen Studie, schon nach einer dreitägigen TLA-Stimulation eine deutliche Proliferation der T-Zellen detektierbar war. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass die Tiere nur kurze Zeit vor der Analyse infiziert worden waren. In ihrem peripheren Blut könnte sich deshalb eine höhere Anzahl an aktivierbaren Zellen befinden, als im peripheren Blut der humanen Spender, bei denen die Infektion wahrscheinlich schon länger zurücklag. Zum anderen wurde die optimale Kulturdauer der porcinen PBMC auf drei Tage beschränkt, da bei einer längeren Inkubation im Medium, welches Fötale Kälberserum (FCS) enthielt, eine starke Hintergrundproliferation beobachtet wurde. Diese unspezifische Proliferation ist wahrscheinlich auf die Präsenz von Fremdproteinen im FCS zurückzuführen und hätte eventuell durch den Austausch von FCS gegen Schweineserum minimiert werden können. In den humanen Zellkulturen wurde Serum-freies Medium verwendet, wodurch eine unspezifische Proliferation weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die wichtigste Route einer natürlichen *T. gondii* Infektion in Schweinen ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass der Parasit im Oozysten-Stadium durch die Aufnahme von kontaminierter Erde, Futter und Trinkwasser, aber auch im Zysten-Stadium durch die Verfütterung von Fleischresten auf Schweine übertragen wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Ausmaß der TLA-spezifischen Proliferation als Konsequenz einer experimentellen Infektion mit *T. gondii* Oozysten nicht signifikant von der Zell-Vermehrung unterscheidet, die nach Infektion mit Zysten zu detektieren war. Dies lässt vermuten, dass die experimentelle und wahrscheinlich auch eine natürliche Infektion, unabhängig vom Stadium des Parasiten, zu einer vergleichbar gut detektierbaren Anzahl an aktivierten Zellen im peripheren Blut des Wirtstieres führen. Somit ist eine T-Zell-basierte Detektion der *T. gondii* Infektion unabhängig davon, ob das Tier mit Zysten oder Oozysten infiziert ist, möglich.

Generell scheint sich *T. gondii* an einen Zyklus angepasst zu haben, der die orale Aufnahme von Oozysten durch Herbivoren als Zwischenwirte begünstigt (Dubey, 2004). Die orale Aufnahme von Gewebezysten durch Karnivoren und besonders durch den Endwirt, die Katze, ist für den Lebenszyklus des Parasiten essentiell. So ist schon eine lebende *T. gondii* Oozyste oral infektiös für Schweine, dagegen werden mindestens einhundert Oozysten benötigt, um die Infektion in der Katze zu etablieren. Für Bradyzoiten, die sich in den Gewebezysten befinden, gilt das Gegenteil: *T. gondii* Bradyzoiten sind bei oraler Aufnahme weniger infektiös für Zwischenwirte wie z.B. die Maus, als für den Endwirt, die Katze (Dubey, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Infektiosität der Parasitenstadien keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von experimentell infizierten Schweinen hat.

Eine besondere Herausforderung der Diagnostik einer *T. gondii* Infektion bei Schweinen und generell bei Tieren, die als Schlachtgut für den Verbrauchermarkt bestimmt sind, ist die Minimierung des zeitlichen Abstandes, der zwischen dem Zeitpunkt und der Nachweisbarkeit der Infektion liegt. Mit Hilfe des T-Zell-Proliferationsassays, der in dieser Arbeit verwendet wurde, war es möglich bereits sieben Tage nach der erfolgten experimentellen Infektion TLA-spezifische T-Zellen in Zellkulturen *T. gondii* infizierter Tiere nachzuweisen. Im Vergleich dazu konnten spezifische Antikörper mittels ELISA-Methode im Serum von Schweinen durchschnittlich erst 19 Tage nach einer experimentellen Infektion mit *T. gondii* Zysten bzw. Oozysten nachgewiesen werden (Bokken et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Infektion mit *T. gondii* Oozysten und Zysten über einen Zeitraum von 159 Tagen zu jedem analysierten Zeitpunkt anhand der TLA-spezifischen T-Zell-Proliferation detektierbar war. Zudem stieg die Proliferationsrate TLA-spezifischer T-Zellen im Verlauf der Infektion tendenziell an, was wahrscheinlich in der Dynamik der T-Zellantwort begründet ist. So wird in der Anfangsphase der Infektion die Aktivierung spezifischer T-Zellen induziert, sodass diese schon früh, jedoch noch in geringer Zahl im peripheren Blut vorhanden sind und in Zellkultur aktiviert werden können. Mit dem Fortschreiten der akuten Infektion nimmt die Anzahl an aktivierbaren *T. gondii*-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut der Experimentaltiere zu. Dem entsprechend ist die gemessene Proliferationsrate zu späteren Zeitpunkten im Infektionsverlauf höher, als die, die kurze Zeit nach der Infektion messbar ist.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit gab es in der Literatur keine Veröffentlichungen, in denen ein ähnlicher T-Zell-basierter Ansatz zur Detektion einer *T. gondii* Infektion in Schweinen beschrieben worden wäre. Deshalb war auch über die Toxoplasmen-Antigene, die von reaktiven T-Zellen der experimentell infizierten Schweine im Lysat des Parasiten (TLA) erkannt werden, nichts bekannt. Jedoch konnten Wang et al. zeigen, dass eine Immunisierung von Schweinen mit ESAs eine infektionsbedingte *T. gondii* Zystenformation im Gewebe reduziert (Wang et al., 2013). Zur Identifizierung T-Zell-reaktiver Antigene wurden in der vorliegenden Arbeit die gleichen *T. gondii* Proteine ausgewählt, die auch in den humanen Studien mit T-Zellen seropositiver Testpersonen verwendet worden waren. Somit wurde zum einen analysiert, ob Ziel-Antigene zu finden sind, welche sowohl in der Diagnostik beim Menschen als auch bei der Analyse des *T. gondii* Status von Schweinen eine Rolle spielen. Zum anderen wurde überprüft, ob sich eine Infektion bei Schweinen durch eine T-Zell-basierte Diagnostik unter der alternativen Verwendung von rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigenen anstelle von TLA nachweisen lässt.

Dabei konnte in PBMC-Kulturen der Tiere, die experimentell mit *T. gondii* infiziert worden waren, nach Stimulation mit rekombinant hergestelltem GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 und SAG1 tendenziell eine höhere Proliferationsrate gemessen werden, als in PBMC-Kulturen der uninfizierten Kontrollgruppe. Vergleichbar mit den heterogenen Ergebnissen mit Zellen der humanen seropositiven Testpersonen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass weder GRA1 noch GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 oder SAG1 die T-Zell-Proliferation in Zellkulturen aller infizierten Tiere induzierte. Vielmehr zeigten die T-Zellen unterschiedlicher infizierter Experimentaltiere, ebenso wie die T-Zellen seropositiver humaner Testpersonen, individuelle proliferative Antworten auf die getesteten Antigene.

Interessanterweise konnte in den PBMC-Kulturen experimentell infizierter Schweine am häufigsten die Präsenz von GRA1-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. GRA1 war von allen getesteten Antigenen ebenfalls am häufigsten von T-Zellen in PBMC-Kulturen der humanen seropositiven Testpersonen erkannt worden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass GRA1 in beiden Spezies ein bedeutsames T-Zell-Antigen ist. Allerdings zeigten die T-Zellen einiger humaner Testpersonen und experimentell infizierter Tiere trotz einer soliden TLA-spezifischen Proliferation keine GRA1-spezifische Zell-Vermehrung.

Die heterogene T-Zell-Proliferation könnte wie beim Menschen auf die Polygenie und Polymorphologie des porcinen „major histocompatibility complex“ (MHC) zurückzuführen sein. So könnte sich die Fähigkeit der T-Zellen bestimmte Epitope der rekombinanten Antigene zu erkennen, von Schwein zu Schwein unterscheiden. Eine zweite Erklärung für die individuelle Antwort antigenspezifischer T-Zellen könnte von der Proteinexpression des Parasiten ausgehen. So ist es denkbar, dass die Expression und Sekretion der *T. gondii* Proteine abhängig von immunologischen Faktoren des jeweiligen Wirtstieres in ihrer Intensität und Qualität variiert. Die Immunzellen jedes infizierten Tieres könnten dann mit unterschiedlichen *T. gondii* Antigenen konfrontiert sein und es würde zur Aktivierung individuell spezifischer T-Zellen kommen.

Wie bei der Diagnose einer humanen *T. gondii* Infektion, stellt der verwendete Proliferationsassay zwar eine gute Methode zur Analyse einer *T. gondii* Infektion bei Schweinen dar, ist jedoch für eine breite Analyse des *T. gondii* Status nicht praktikabel. Alternative Nachweismethoden nutzen die IFN $\gamma$  Produktion aktivierter T-Zellen. Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich gezeigt, dass TLA-stimulierte PBMC experimentell infizierter Tiere zu jedem analysierten Zeitpunkt der Infektion eine gut detektierbare Menge an IFN $\gamma$  produzierten. Diese Menge nahm im Verlauf der Infektion zu, was gut zum Anstieg der Proliferationsrate von TLA-spezifischen T-Zellen passt, die im Infektionsverlauf beobachtet wurde.

Drei bis vier Wochen nach der experimentellen *T. gondii* Infektion war in den TLA-versetzten PBMC-Kulturen der Schweine, die mit Oozysten infiziert worden waren, eine höhere IFN $\gamma$  Konzentration detektierbar als in Zellkulturen der Tiere, die mit Zysten infiziert worden waren. Dies passt gut zu der Beobachtung, dass die Oozysten-induzierte Infektion von Zwischenwirten eine klinisch schwere Verlaufsform der Toxoplasmose verursacht. Es wird vermutet, dass die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN $\gamma$  für pathogene Effekte während der akuten Phase der Infektion verantwortlich ist (Solano Aguilar et al., 2001). Die höhere Infektiosität des Oozysten-Stadiums von *T. gondii* könnte also die beobachtete stärkere IFN $\gamma$  Produktion von T-Zellen der infizierten Tiere in der frühen Phase der Infektion erklären.

Die Stimulation der PBMC experimentell infizierter Tiere mit den rekombinanten Antigenen führte dagegen zu einer schwachen IFN $\gamma$  Produktion. Selbst GRA1, das in den meisten PBMC-Kulturen infizierter Schweine eine solide T-Zell-Proliferation aktiviert hatte, induzierte eine IFN $\gamma$  Produktion, die nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze lag.

Die Diskrepanz zwischen der Menge an IFN $\gamma$  Produktion in TLA-stimulierten Zellkulturen und der Konzentration an IFN $\gamma$ , die in GRA1-versetzten PBMC-Kulturen infizierter Tiere messbar war, könnte darin begründet sein, dass eine viel größere Anzahl unterschiedlicher antigenerfahrener T-Zellen Strukturen im Lysat des Parasiten (TLA) erkennt und daraufhin IFN $\gamma$  sezerniert. Dagegen sind in denselben PBMC-Kulturen nur wenige GRA1-erfahrene T-Zellen vorhanden, die keine detektierbare Menge an IFN $\gamma$  produzieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass aktivierte antigenspezifische T-Zellen als Konsequenz ihrer Aktivierung andere Zytokine als IFN $\gamma$  produzieren. Um den T-Zelltyp zu bestimmen, der durch die Stimulation mit TLA bzw. GRA1 aktiviert wird, müssten daher weitere sezernierte Zytokine im Zellkulturüberstand identifiziert werden.

**Zusammenfassend** konnte in der vorliegenden Arbeit eine T-Zell-basierte Methode zur Detektion einer experimentellen Oozysten- und Zysten-induzierten *T. gondii* Infektion in Schweinen etabliert werden. Als sensitivste Methode erwies sich dabei der Nachweis TLA-spezifischer T-Zellen, der entweder mittels T-Zell-Proliferationsassays oder der Detektion von produziertem IFN $\gamma$  erfolgte. Die Detektion von T-Zellen, welche die rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene erkannten, war dagegen weniger

sensitiv. Jedoch erwies sich GRA1, wie auch im Humansystem, als ein wichtiger Antigen zur Stimulation der infektionsbedingten T-Zellantwort. Ob eine natürliche Infektion, bei der die Tiere wahrscheinlich weniger Parasiten aufnehmen als die Experimentaltiere, gleichermaßen nachgewiesen werden kann, ist bisher jedoch unklar.

#### **5.4. Das von Toxoplasmen-Antigen-spezifischen, porcinen T-Zellen produzierte IFN $\gamma$ induziert antiparasitäre Effekte**

Schweine entwickeln nach *T. gondii* Infektion in den meisten Fällen eine protektive Immunität, was sich daran zeigt, dass sie sich von einer experimentellen Infektion erholen oder sich bei ihnen, ähnlich wie beim Menschen, kaum Infektionssymptome manifestieren. Als zelluläre Basis der Immunität wurde in Schweinen, die oral mit Oozysten infiziert worden waren, eine T<sub>H</sub>1-vermittelte Zytokinantwort, beispielsweise die Produktion von IFN $\gamma$ , charakterisiert (Solano Aguilar et al., 2001). Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeiten war bekannt, dass IFN $\gamma$  in humanen Zellen die Aktivität des Tryptophan-abbauenden IDO Enzyms aktiviert und somit inhibierend auf das Wachstum des Tryptophan-auxotrophen Parasiten *T. gondii* wirkt (siehe Kapitel 5.2).

In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich eine IFN $\gamma$ -abhängige Kynurenin Produktion der porcinen epitheliale Zell-Linie PCP-R (Epithelzellen aus dem Plexus Corioideus) gezeigt werden, die auf eine IDO Induktion zurückzuführen ist. Bei Kultivierung der Zellen in gleichzeitiger Anwesenheit von IFN $\gamma$  und dem IDO-spezifischen Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan (1MT) konnte, im Vergleich zu Zellkulturen die ausschließlich mit IFN $\gamma$  stimuliert worden waren, eine signifikante Hemmung der IDO detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die IDO in porcinen epithelialen Zellen in der Lage ist, das Wachstum des hoch virulenten *T. gondii* Typ I Stammes RH zu hemmen.

Um die IDO-Abhängigkeit dieses Effektes zu belegen, wurde der inhibierende Effekt einer Tryptophan-Supplementierung auf die IFN $\gamma$ -vermittelte Hemmung des RH-Wachstums gezeigt. Da die Zugabe von Tryptophan den IFN $\gamma$ -induzierten antiparasitären Effekt vollständig blockierte, kann geschlussfolgert werden, dass die Induktion des IDO Enzyms auch in porcinen Epithelzellen den wichtigsten IFN $\gamma$ -vermittelten Effektormechanismus zur Abwehr des hoch virulenten *T. gondii* Typ I Stammes (RH) darstellt. Diese Ergebnisse passen zum einen gut zu den bereits erwähnten Daten mit humanen IFN $\gamma$ -stimulierten Zellkulturen. Außerdem konnten Jungi et al. in porcinen *in vitro* Zellkulturen nur eine geringe Expression des iNOS Proteins und kein Nitrit bzw. Nitrat im Zellkulturüberstand nachweisen, sodass in Schweinen der alternative IFN $\gamma$ -abhängige NO-Stoffwechselweg als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene wahrscheinlich fehlt (Jungi et al., 1996).

Zusätzlich zu den durch rekombinantes IFN $\gamma$  induzierten antiparasitären Effekten in porcinen Zellen, zeigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass natives IFN $\gamma$ , das von TLA-spezifischen PBMC sezerniert wird, in porcinen Epithelzellen einen starken, ausschließlich IDO-vermittelten, wachstumsinhibierenden Effekt gegen *T. gondii* Typ I (RH) auslöst. Die Produktion von IFN $\gamma$  erfolgte Toxoplasma-antigenspezifisch, da das Zytokin im Überstand von PBMC-Kulturen uninfizierter Experimentaltiere nicht detektierbar war und der Überstand von Zellen nicht infizierter Tiere weder die Aktivität des IDO Enzyms in PCP-R Zellen stimulierte, noch antiparasitäre Effekte auslöste.

In weiteren Analysen wurde deutlich, dass nicht nur der Überstand von TLA-stimulierten, sondern auch der von GRA1- oder GRA2-stimulierten T-Zellen aus infizierten Tieren die Aktivität der IDO in PCP-R Zellen induzieren konnte.

**Zusammenfassend** konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Aktivität nicht nur in humanen Fibroblasten, sondern auch in porcinen Epithelzellen die wichtigste Rolle bei der Abwehr gegen den intrazellulären Erreger *T. gondii* einnimmt. Die Analysen machen deutlich, dass dieser Effekt *in vitro* durch IFN $\gamma$  vermittelt wird, welches von TLA-spezifischen T-Zellen *T. gondii* infizierter Tiere produziert wird. Da Epithelzellen die ersten Zellen sind, die der Parasit im Darm der Zwischenwirte infiziert, könnte die IDO eine wichtige Rolle bei einer *T. gondii* Infektion *in vivo* spielen. So könnte die Aktivität des Enzyms entscheidend daran beteiligt sein, die bekannte solide Immunität von Schweinen gegen den Parasiten zu vermitteln.

### 5.5. *In vitro* T-Zellsuppression als Konsequenz einer *T. gondii* Infektion in Mäusen

Die Maus ist ein besonders wichtiger Zwischenwirt für den Parasiten *T. gondii*, da sie das bevorzugte Beutetier des Endwirtes, der Katze, ist. Nachdem der Endwirt infizierte Mäuse oral aufgenommen hat, wird ein neuer *T. gondii* Infektionskreislauf initiiert. Die Maus dient in der Forschung daher häufig als Modellorganismus für die Toxoplasmose. Daher wurde in dieser Arbeit auch die zelluläre Immunantwort von experimentell mit *T. gondii* Tachyzoiten infizierten Mäusen analysiert.

Dabei wurde in murinen Milz-Zellkulturen eine reduzierte Proliferation als Antwort auf das T-Zell Mitogen Concanavalin A (ConA) bzw. auf Toxoplasmen-Antigen beobachtet, wenn die Milz-Zellen von Mäusen stammten, die sich in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion befanden. Im Gegensatz dazu führte die ConA-Stimulation der Milz-Zellen von Tieren, die sich in einer späteren Infektionsphase befanden, zu einer starken Zell-Proliferation.

In verschiedenen Studien wurde reaktiven Nitrogen Intermediaten (RNI), eine Rolle bei der Suppression der Mitogen- bzw. Antigen-stimulierten proliferativen T-Zellantwort zugeschrieben (Candolfi et al., 1994; Suzuki und Kobayashi, 1984). RNI werden vor allem von Makrophagen produziert und in den Zellkulturüberstand sezerniert. Gegen eine RNI-vermittelte Immunsuppression spricht allerdings, dass die Arbeitsgruppe um Khan zeigen konnte, dass die T-Zellen von Interferon-regulierender Faktor-1 (IRF-1)-defizienten Mäusen, die also keine RNI produzieren können, ebenfalls supprimiert sind (Khan et al., 1996a). Somit scheint dieses Molekül nicht entscheidend an der Suppression der T-Zell-Proliferation beteiligt zu sein.

Verschiedene Gruppen konnten bereits zeigen, dass die Suppression der T-Zell-Proliferation in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion abhängig von der Menge des verfügbaren IL-2 ist. Dennoch konnte der Zusatz von IL-2 die Proliferation in einigen Studien nur partiell (Chan et al., 1986; Khan et al., 1996b), in anderen dagegen gar nicht wiederherstellen (Haque et al., 1994; McLeod et al., 1989).

Salinas et al. konnten in einer Studie von 2014 zeigen, dass T<sub>regs</sub> mit klassischen T-Zellen um IL-2 konkurrieren. Die bevorzugte Bindung von IL-2 an die stark CD25 positiven T<sub>regs</sub> kann dazu führen, dass die ohnehin geringere IL-2 Produktion der T-Zellen infizierter Tiere nicht mehr ausreicht, um die Proliferation aktivierter T-Zellen zu stimulieren bzw. die Zellen vor einer Apoptose zu schützen. Für diese Interaktion zwischen T<sub>regs</sub> und klassischen T-Zellen ist eine räumliche Nähe beider Zelltypen erforderlich (Salinas et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Immunsuppression anhand verschiedener *in vitro* Systeme untersucht. Durch die Messung der ConA-abhängigen Proliferationskapazität in Co-Kulturen von Splenozyten infizierter und naiver Mäuse konnte dabei gezeigt werden, dass die Milz-Zellen von Tieren, die sich in der frühen Phase der Infektion mit *T. gondii* befinden, einen immunsuppressiven

Effekt auf die Zellen naiver Tiere vermitteln können. Dieser Effekt könnte also durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt von Zellen aus infizierten Tieren auf Zellen aus nicht infizierten Tieren vermittelt werden, wie es die Arbeitsgruppe um Salinas zeigte.

Um die Hypothese von Salinas weiter zu überprüfen, wurde in einem weiteren Ansatz die T-Zell-Proliferation naiver Tiere in Anwesenheit von Überständen analysiert, die aus Mitogen-stimulierten Zellkulturen infizierter Tiere gewonnen wurden. Nach der These von Salinas sollten hier keine suppressiven Effekte vermittelt werden. Durch die Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass ein immunsuppressiver Effekt auf Zellen naiver Tiere auch alleine durch den Überstand vermittelt werden kann, der aus Milz-Zellkulturen von Mäusen gewonnen wurde, die sich in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion befanden. In diesen Milz-Zellkulturen waren also weder eine eingeschränkte IL-2 Produktion, noch konkurrierende regulatorische T-Zellen infizierter Tiere vorhanden, sodass die Suppression hier durch andere lösliche Faktoren erfolgen muss.

Ein solcher löslicher Faktor könnte beispielsweise das Zytokin IL-10 sein, welches von regulatorischen T-Zellen aber auch von antigenpräsentierenden Zellen in den Überstand sezerniert wird und immunsuppressiv auf die T-Zell-Proliferation wirken kann. Allerdings zeigten Neyer et al., dass die Mitogen-stimulierte T-Zell-Proliferation IL-10-defizienter Tiere ebenfalls inhibiert ist, sodass dieses Molekül an der Suppression wohl keinen entscheidenden Anteil hat (Neyer et al., 1997).

Obwohl in der Literatur verschiedene immunsuppressive Effektormechanismen diskutiert werden, werden in der überwiegenden Anzahl der Publikationen regulatorische T-Zellen für die Hemmung der T-Zellantwort in *T. gondii* infizierten Tieren verantwortlich gemacht. Da das immunmodulatorische Enzym IDO durch den Abbau von Tryptophan und die Produktion von Kynurenin die Bildung hoch suppressiver regulatorischer T-Zellen fördert (Grohmann et al., 2003), wurde die Immunantwort gegen Toxoplasmen in IDO-defizienten Mäusen (IDO<sup>-/-</sup>) untersucht. Sollte die IDO für die Induktion der Immunsuppression verantwortlich sein, wäre in den Milz-Zellkulturen IDO-defizienter Tiere eine geringere Suppression der T-Zell-Proliferation zu beobachten. Überraschenderweise hatte das Fehlen der IDO jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Immunsuppression, die als Konsequenz einer *T. gondii* Infektion in der akuten Infektionsphase in Wildtyp Mäusen (WT) beobachtet werden konnte.

**Zusammenfassend** wurde in der vorliegenden Arbeit die bereits publizierte Suppression der *in vitro* T-Zell-Proliferation in Folge einer *T. gondii* Infektion im Mausmodell bestätigt. Dabei konnte anhand von IDO-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass das immunregulatorische Enzym keine Rolle bei der Vermittlung der T-Zell-Suppression einnimmt. Des Weiteren deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass neben dem beschriebenen Mechanismus der IL-2 Konkurrenz von T<sub>regs</sub> und klassischen T-Zellen weitere lösliche Faktoren an der Suppression der T-Zell-Proliferation beteiligt sind.

## 5.6. Toxoplasmen-Antigen-abhängige T-Zellantwort im Mausmodell

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten nur in den Milz-Zellkulturen von Tieren, die sich in der späteren Phase der Infektion befanden nach TLA-Stimulation spezifische, proliferierende T-Zellen nachgewiesen werden. Somit ist belegt, dass im Lysat des Parasiten Antigene vorhanden sind, die als Zielstrukturen für die Aktivierung der murinen T-Zellantwort während einer *T. gondii* Infektion dienen können. Diese Strukturen konnten jedoch nicht näher definiert werden, da keines der getesteten rekombinanten Antigene (GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 und SAG1) von murinen T-Zellen erkannt wurde. Besonders auffällig war, dass selbst GRA1, welches sich sowohl im Humansystem als auch bei

experimentell infizierten Schweinen als ein hoch immunogenes Antigen herausgestellt hatte, keine proliferative T-Zellantwort induzieren konnte.

Diese Ergebnisse stehen in einem scheinbaren Gegensatz zu Studien von Khan et al. und Vercammen et al., die belegen, dass die Immunisierung mit rekombinantem SAG1, GRA1 und GRA7 zur Ausbildung einer, gegen *T. gondii* protektiven Immunantwort führt (Khan et al., 1991; Vercammen et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten wir durch die Immunisierung mit lebenden Toxoplasmen keine Immunantwort gegen diese Antigene induzieren. Dies könnte darin begründet sein, dass die lebenden Parasiten eine Immunsuppression vermitteln, welche die Proliferation dieser antigenspezifischen T-Zellen verhindert. Daher wurde als zusätzlicher Aktivierungsparameter die IFN $\gamma$  Produktion stimulierter Milz-Zellen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass im Milz-Zellkulturüberstand von Mäusen, die sich in der frühen Phase einer *T. gondii* Infektion befanden, nach TLA-Stimulation eine große Menge an IFN $\gamma$  vorhanden ist, obwohl keine T-Zell-Proliferation detektierbar war. In zukünftigen Analysen müssten durchflusszytometrische Analysen oder ELISpot-Assays verwendet werden, um die zelluläre IFN $\gamma$  Quelle zu identifizieren und eine Aussage über den Phänotyp der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen (z.B. CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, regulatorische T-Zellen) treffen zu können.

Die IFN $\gamma$  Produktion durch Toxoplasmen-Antigen-spezifische T-Zellen, die in dieser Arbeit detektiert wurde, deckt sich mit den publizierten Daten von Candolfi et al., die mit Zellen eines anderen Maus-Genotyps (CBA/Ca) generiert wurden. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die ConA- und TLA-Stimulation von Splenozyten aus Tieren, die sieben Tage lang mit *T. gondii* infiziert waren, zu einer erhöhten Produktion von IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 und gleichzeitig zu einer geringeren IL-2 Sekretion, verglichen mit nicht infizierten Tieren, führte. Gleichzeitig beobachteten auch sie eine supprimierte T-Zell-Proliferation (Candolfi et al., 1995).

### **5.7. IFN $\gamma$ induziert eine *T. gondii* Typ-spezifische, GTPasen-vermittelte Abwehr in murinen Zellen**

Dem Zytokin IFN $\gamma$ , das besonders in der frühen Phase der murinen Infektion gebildet wird, kommt eine bedeutende Rolle bei der Abwehr gegen den intrazellulären Parasiten *T. gondii* zu. Die IFN $\gamma$ -induzierte Aktivität desIDO Enzyms, die im humanen und porcinen System einen antiparasitären Effekt auf *T. gondii* vermittelt, spielt in murinen Zellkulturen eine untergeordnete Rolle bei der Parasitenabwehr. Vielmehr induziert IFN $\gamma$  in der Maus die Hochregulation verschiedener GTPasen, die essentiell für die Resistenz gegen *T. gondii* sind. Diese GTPasen lassen sich in die Familie der p47 „Immune Related“ GTPasen (IRGs) und die Familie der p65 Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs) einteilen. In der vorliegenden Arbeit wurde der antiparasitäre Effekt von mGBP2 auf verschiedene typische und atypische Stämme von *T. gondii* untersucht. Im murinen System kommt den IRGs eine große Bedeutung bei der Abwehr von *T. gondii* zu, jedoch sind diese GTPasen im humanen Genom deletiert (Bekpen et al., 2005). Besonderes Interesse fiel in der vorliegenden Arbeit deshalb auf die GBPs und insbesondere auf mGBP2. Degrandi et al. konnten zeigen, dass mGBP2 im Falle einer *T. gondii* Infektion in IFN $\gamma$ -stimulierten murinen Fibroblasten zur parasitophoren Vakuole (PV) des Parasiten rekrutiert und zur Eliminierung des Erregers beiträgt (Degrandi et al., 2013). Ziel der Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, war es daher, den antiparasitären Effekt von mGBP2 auf verschiedene typische und atypische Stämme von *T. gondii* vergleichend zu untersuchen.

Wie bereits für mGBP1 beschrieben (Spekker et al., 2013), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch mGBP2 in murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) zu einer überwiegenden

Mehrheit der PV mittel virulenter Typ II Parasiten (ME49) rekrutiert. Dagegen konnte die Mehrzahl der hoch virulenten Typ I Parasiten (RH/BK) die mGBP2-Rekrutierung um ihre PV verhindern.

Der Mechanismus mit dem die Rekrutierung verhindert wird, ist nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch ist bekannt, dass sich die *T. gondii* Stämme vom Typ I, Typ II und Typ III in der spezifischen Zusammensetzung verschiedener genetischer Virulenz Marker unterscheiden, denen ein Einfluss auf die Intensität der GTPasen Rekrutierung zur PV zugesprochen wird. Als genetische Grundlage der großen Virulenzunterschiede zwischen den Typ-Stämmen wurden die Gen-Loki, die für die ROP-Kinasen ROP18 und ROP5 codieren, identifiziert (Behnke et al., 2011; Reese et al., 2011; Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006). ROP Proteine werden von *T. gondii* während der Invasion in die Wirtszelle aus den sekretorischen Rhoptrien freigesetzt. ROP18, eine aktive Serin/Threonin-Protein-Kinase, rekrutiert nach ihrer Sekretion in die Wirtszelle an die Oberfläche der parasitophoren Vakuole und verhindert so die Anreicherung Wirts-spezifischer GTPasen an der PV und somit die Eliminierung des Parasiten. Das Expressionslevel von ROP18 variiert zwischen starker Expression in Typ I und Typ II Stämmen und schwacher Expression in Typ III Stämmen. Das niedrige ROP18 Expressionslevel in Typ III Stämmen wird von einer Region upstream der ROP18 codierenden Sequenz (= UPS-ROP18 III) determiniert, welche in Typ I und Typ II Stämmen fehlt (= UPS-ROP18 Typ I/II) (Khan et al., 2009). ROP5 wird ebenfalls bei der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszellen sekretiert und reguliert als polymorphe Pseudokinase die Aktivität von ROP18. Während ROP5 in Typ I und Typ III Stämmen die Aktivierung von ROP18 verstärkt, scheint ROP5 in Typ II Parasiten keine verstärkende Wirkung auf die Aktivität von ROP18 zu besitzen.

In hoch virulenten *T. gondii* Typ I Stämmen wird ROP18 durch die fehlende UPS-ROP18 Region also stark exprimiert. Gleichzeitig verstärkt ROP5 die Aktivität von ROP18. Damit steht Typ I Parasiten ein potenter Mechanismus zur Verfügung, um die Anreicherung der Wirts-spezifischen GTPasen an der PV zu verhindern. Dies erklärt, dass mGBP2 in der vorliegenden und in anderen Arbeiten typischerweise nicht an die PV von Typ I Stämmen, also RH und BK, rekrutiert. In moderat virulenten Typ II Parasiten, deren Genom wie das der Typ I Stämme durch das Fehlen von UPS-RO18 gekennzeichnet ist, wird ROP18 ebenfalls stark exprimiert. Allerdings verstärkt ROP5 in diesem Typ-Stamm nicht die Aktivität der Kinase. Aus diesem Grund konnte im Rahmen der eigenen Arbeit und von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die überwiegende Mehrheit der PV von intermediär virulenten Typ II Parasiten (ME49) vom mGBP2 der Wirtszelle besetzt wird. In niedrig virulenten Typ III *T. gondii* determiniert das Vorhandensein von UPS-ROP18 ein niedriges ROP18-Expressionslevel, sodass die verstärkende Funktion von ROP5 nur auf eine geringe Anzahl von ROP18 Molekülen wirken kann. Dies erklärt, dass mGBP2 sich an der Mehrheit der PV des niedrig virulenten NED Stamms ansammelt und so zu dessen Eliminierung beiträgt.

Während die Gen-Loki dieser beiden ROP Proteine in den Typ-Stämmen gut untersucht sind, lagen für die bereits erwähnten atypischen *T. gondii* Stämme zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit nur Daten zu ROP18 vor. Zur besseren Übersicht sind diese und die jeweilige Virulenz der atypischen Isolate für Balb/c Mäuse in der folgenden Tabelle (Tabelle 5.1) dargestellt. Zum Vergleich sind die klonalen *T. gondii* Stämme RH, ME49 und NED ebenfalls aufgeführt.

**Tabelle 5.1: Stamm-spezifische Variante von UPS-ROP18, Virulenz in Balb/c Mäusen und Rekrutierungsverhalten von mGBP2 an die PV des jeweiligen Parasiten.** *T. gondii* Stämme bei denen in der Mehrzahl der PV die Lokalisation von mGBP2 detektiert werden konnte, sind mit + gekennzeichnet. Stämme bei denen die Mehrheit der PV nicht durch mGBP2 besetzt war, sind dagegen mit -. +/- bedeutet, dass jeweils ca. die Hälfte der PV von mGBP2 besetzt war, während die andere Hälfte unbesetzt blieb.

	Bezeichnung	UPS-ROP18	Phänotyp in Balb/c	Rekrutierung von mGBP2 an die PV (∅)
klonale <i>T. gondii</i> Stämme	RH	Typ I/II	hoch virulent	+
	ME49	Typ I/II	mittel virulent	-
	NED	Typ III	niedrig virulent	-
atypische <i>T. gondii</i> Stämme	28H	Typ III	niedrig virulent	+
	2C10	Typ I/II	niedrig virulent	+/-
	A7	Typ III	mittel virulent	+/-
	B6H6	Typ I/II	hoch virulent	+

Aus Tabelle 5.1 ist ersichtlich, dass die Virulenz der atypischen *T. gondii* Isolate nicht immer mit der Variante von UPS-ROP18 übereinstimmt (orange hinterlegt): Der Stamm A7 besitzt trotz der Anwesenheit der Region (UPS-ROP18 III) keine anzunehmende niedrige, sondern eine mittlere Virulenz für Balb/c Mäuse. Basierend auf der Abwesenheit von UPS-ROP18 (UPS-ROP18 I/II) wäre der *T. gondii* Stamm 2C10 als hoch bzw. moderat virulent einzustufen. Er besitzt jedoch nur eine niedrige Maus-Virulenz.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Effektivität von mGBP2 gegen diese verschiedenen atypischen Parasiten Stämme analysiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass mGBP2 in IFN $\gamma$ -stimulierten mMSC die Mehrheit der PV der atypischen *T. gondii* Isolate 28H und B6H6 besetzt.

Für den atypischen Klon 28H lässt sich das Anlagern von mGBP2 an der PV anhand des Vorhandenseins von UPS-ROP18 erklären. Dies führt zu einer geringen ROP18-Expression (Hunter und Sibley, 2012), sodass die Rekrutierung der Wirts-spezifischen GTPasen erfolgt, da die Menge an ROP18 nicht ausreicht um die Ansammlung zu verhindern. Dies passt gut zu der beobachteten niedrigen Virulenz des 28H Stammes.

Obwohl B6H6 wie RH und BK als hoch virulent für Balb/c Mäuse beschrieben ist, findet bei diesem Parasiten, anders als bei BK und RH, eine Rekrutierung von mGBP2 an die Mehrzahl der PV statt. Durch das Fehlen von UPS-ROP18 kann davon ausgegangen werden, dass ROP18 stark exprimiert wird. Da die Mehrzahl der PV dennoch von mGBP2 rekrutiert wird, ist im Genom von B6H6 möglicherweise eine ROP5 Variante vorhanden, welche die Aktivität von ROP18 nicht verstärkt. Untersuchungen zu ROP5 liegen im B6H6 Stamm jedoch nicht vor. Trotz der *in vitro* Rekrutierung von mGBP2 an die Mehrzahl der PV, die in IFN $\gamma$ -stimulierten, infizierten Zellen schließlich zum Abbau des Parasiten führt, besitzt B6H6 eine hohe Maus-Virulenz. Diese Virulenz muss also durch andere parasitäre Mechanismen als durch die Interaktion mit murinen GTPasen determiniert sein. Denkbar wäre, dass der Parasit weitere Virulenz-vermittelnde Gene besitzt um *in vivo* die IFN $\gamma$  Stimulation der Wirtszelle zu verhindern. So ist beispielsweise der Virulenz Faktor ROP16 beschrieben (Ong et al., 2010; Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009). Die ROP16 Variante hoch virulenter Stämme verlängert die Aktivitätsdauer der Wirtszell-Transkriptionsfaktoren „Signal transducer and activator of transcription“ 3 (STAT3) und „Signal transducer and activator of transcription“ 6 (STAT6). Somit wird die Induktion von IL-12 herunterreguliert und die T<sub>H</sub>1 Zytokinantwort des Wirtes limitiert. Damit würden die T-Zellen von B6H6 infizierten Mäusen weniger IFN $\gamma$  produzieren und die Hochregulation der IFN $\gamma$ -abhängigen GTPasen in infizierten Zellen *in vivo* nur in geringem Ausmaß stattfinden. Der atypische Parasit könnte sich somit

weitgehend ungehindert von Wirts-spezifischen GTPasen vermehren, wodurch das Wirtstier letztendlich verstirbt.

Als weiteres Protein, das die Virulenz von *T. gondii* determiniert, ist GRA15 beschrieben. Während GRA15 Typ II NF- $\kappa$ B aktiviert, wodurch die Produktion von IL-12 und letztendlich die  $T_H1$  Zytokinantwort des Wirtes gesteigert wird, besitzt Typ I und Typ III GRA15 keine solche aktivierende Funktion. Deshalb wäre es in Zukunft sinnvoll zu klären, welche genetische Variante von GRA15 im B6H6 Stamm vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass mGBP2 in IFN $\gamma$ -stimulierten mMSC zu ca. der Hälfte der analysierten PV der atypischen *T. gondii* Isolate 2C10 und A7 rekrutiert.

Der atypische *T. gondii* Stamm 2C10 besitzt trotz der Abwesenheit von UPS-ROP18 und der damit verbundenen starken Expression von ROP18 nur eine niedrige Maus-Virulenz. Die vergleichsweise hohe Ansammlung von mGBP2 an den PV der 2C10 Parasiten könnte durch eine fehlende Aktivierung von ROP18 durch die ROP5 Variante Typ III erklärt werden. Dies würde erklären, warum eine relativ große Anzahl an Vakuolen besetzt ist. Außerdem wäre denkbar, dass der Parasit 2C10 weitere Virulenz-vermittelnde Gene besitzt, um *in vivo* die IFN $\gamma$  Produktion des Wirtsorganismus zu hemmen. So könnten pro-inflammatorische Reaktionen, die zur hohen Letalität der Typ I Stämme beitragen, vermieden werden, was die erniedrigte Virulenz von 2C10 erklären würde. Für den *T. gondii* Stamm 2C10 wäre eine solche verminderte IFN $\gamma$  Produktion günstig, da das Wirtstier in diesem Fall nicht versterben würde und der Fortbestand des Parasiten durch die Bildung von Zysten gesichert wäre.

Der atypische Stamm A7 besitzt trotz der Anwesenheit von UPS-ROP18 und dem damit verbundenen niedrigen ROP18 Expressionslevels keine erwartete geringe, sondern eine moderate Virulenz für Balb/c Mäuse. Für die höhere Virulenz könnten die bereits erwähnten zusätzlichen Virulenzfaktoren GRA15 und ROP16 verantwortlich sein. Auffällig beim Stamm A7 bleibt dennoch, dass trotz der niedrigen ROP18-Expression 50% aller PV in IFN $\gamma$ -stimulierten mMSC nicht durch mGBP2 besetzt sind. Eine plausible Erklärung dafür ist aus der Literatur bisher nicht bekannt. Jedoch ist es denkbar, dass weitere Virulenzfaktoren die Kinetik der Lokalisation von mGBP2 an die PV des atypischen *T. gondii* Stammes A7 beeinflussen. In diesem Fall könnte die mGBP2-Rekrutierung an die PV der A7 Parasiten zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht abgeschlossen gewesen sein. Eine verzögerte *T. gondii* Abwehr der Wirtszelle könnte auch die erhöhte Virulenz von A7 erklären.

**Zusammenfassend** zeigen die Immunfluoreszenz-Analysen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit atypischen *T. gondii* Isolaten durchgeführt wurden, dass das Ausmaß der *in vitro* Rekrutierung von mGBP2 an die Vakuolen unterschiedlicher Parasiten nicht zwingend eine Aussage über die Virulenz des jeweiligen Isolats erlaubt. Dies lässt vermuten, dass die Stärke der IFN $\gamma$  Produktion, die im infizierten Wirtstier z.B. durch die Virulenz Faktoren ROP16 und GRA15 beeinflusst wird, das Ausmaß der *T. gondii*-Abwehr *in vivo* zusätzlich zu den Virulenz Faktoren ROP18 und ROP5 regulieren kann.

## 5.8 Induktion einer protektiven Immunität gegen *T. gondii* Typ-Stämme: Kreuzimmunität gegen atypische *T. gondii* Stämme?

Die primäre Infektion mit einem *T. gondii* Typ-Stamm führt zu einer lebenslangen Immunität gegenüber dem Parasiten, sodass eine latent infizierte Schwangere bei erneutem Kontakt mit einem Typ-Stamm diesen nicht auf das Ungeborene überträgt. Im Gegensatz dazu kann die Zweitinfektion mit einem atypischen Stamm in derselben Frau zu einer vertikalen Übertragung des Parasiten auf den Fötus führen (Lindsay und Dubey, 2011). Der atypische *T. gondii* Stamm durchbricht damit die bestehende Immunität gegen einen typischen *T. gondii* Stamm.

Verschiedene Arbeitsgruppen, die den Temperatur-sensitiven (TS)-4 Stamm zur Immunisierung verwendeten, konnten zeigen, dass dieser Stamm eine starke Protektion gegen eine Zweitinfektion mit einem hoch virulenten Typ I *T. gondii* verleiht. Anders als sein Eltern-Stamm RH, ist TS-4 avirulent für immunkompetente Mäuse, bildet im Gegensatz zum moderat virulenten Typ II Stamm ME49 keine Zysten und ist des Weiteren als nicht persistierend beschrieben (Sayles und Johnson, 1996). In der genannten Publikation beschreiben die Autoren, dass eine TS-4 Infektion in Mäusen die Aktivierung der zellulären Immunantwort und die Produktion von IFN $\gamma$  induziert. Die Immunität gegen eine Zweitinfektion mit einem hoch virulenten Stamm kann auf die Bildung einer Memory-T-Zell-Population während der Primärinfektion zurückgeführt werden. Diese Zellen sind bei einer erneuten Infektion mit RH als antigenerfahrene Lymphozyten schneller aktivierbar und liegen bereits in erhöhter Zellzahl vor, sodass eine effektive und schnelle, protektive Immunantwort gegen den ansonsten hoch virulenten *T. gondii* Typ I eingeleitet werden kann.

Die Arbeitsgruppe um Jensen konnte zusätzlich im Mausmodell zeigen, dass C57BL/6 Mäuse, die chronisch mit einem klonalen *T. gondii* Typ III Stamm (CEP) infiziert sind, zwar gegen eine Zweitinfektion mit dem hoch virulenten Typ I Stamm RH immun sind, nicht jedoch gegen eine Zweitinfektion mit einem hoch virulenten atypischen *T. gondii* Stamm (Jensen et al., 2015).

In Immunisierungs- und Infektionsstudien im Mausmodell sollte daher geklärt werden ob auch der hoch virulente, atypische *T. gondii* Stamm B6H6 eine bestehende Immunität gegenüber dem *T. gondii* Typ-Stamm II ME49 durchbrechen kann.

Es konnte übereinstimmend mit den Daten von Jensen et al. gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Infektion mit dem Typ II Stamm ME49 überlebt hatten, auch eine Zweitinfektion mit dem hoch virulenten Stamm RH überlebten. Dies beruht wahrscheinlich auf dem Auslösen einer Stamm-übergreifenden Immunität. Weitere Analysen mit dem hoch virulenten atypischen *T. gondii* B6H6 zeigten, dass auch dieser Stamm eine Immunität, die durch eine Erstinfektion mit dem Typ II Stamm ME49 etablierte wurde, nicht durchbrechen kann.

**Zusammenfassend** belegen diese Daten, dass auch *Toxoplasma gondii* Typ-Stämme eine protektive Immunantwort gegen atypische Toxoplasmen Stämme auslösen können.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte in humanen Blutproben mit Hilfe einer T-Zell-basierten Diagnostik eine akute bzw. chronische Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) eindeutig detektiert werden.

Proliferationsassays ermöglichten mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 92% den Nachweis von Toxoplasma Lysat Antigen (TLA)-spezifischen T-Zellen in Peripheren Blut Mononukleären Zell (PBMC)-Kulturen von *T. gondii* seropositiven Testpersonen. Die Toxoplasma Antigene, die von reaktiven T-Zellen im Lysat des Parasiten erkannt wurden, waren dabei für jeden seropositiven Spender individuell. 95% aller seropositiven Spender besaßen spezifische T-Zellen, die mindestens eines der rekombinant hergestellten Antigene (rAG) GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 und SAG1 erkannten, jedoch induzierte keines der getesteten Antigene eine proliferative T-Zellantwort in Zellkulturen aller seropositiven Spender. Außerdem konnte gezeigt werden, dass insbesondere GRA1, GRA2 und SAG1 als Zielantigene für T-Zellen wichtig sind, während den Antigenen GRA7 und GRA9 eine größere Bedeutung für die humorale Immunantwort zukommt.

Orientierende Versuche dieser Arbeit weisen darauf hin, dass sich der Nachweis der Interferon (IFN) $\gamma$  Produktion von TLA- bzw. rAG-spezifischen, aktivierten T-Zellen ebenfalls zur Unterscheidung von *T. gondii* seropositiven und seronegativen Patienten eignet. Als praktikabelste und schnellste Methode zur Detektion der IFN $\gamma$  Produktion stellte sich dabei die durchflusszytometrische Analyse von TLA- bzw.-rAG stimuliertem Vollblut heraus.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Effektormolekül IFN $\gamma$  im T-Zellüberstand seropositiver Testpersonen die Aktivität des Tryptophan-abbauenden Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert, welche das Wachstum von *T. gondii* Typ I Stämmen inhibiert. Zusätzliche Analysen zeigten ferner, dass es neben der IDO einen weiteren IFN $\gamma$ -vermittelten Abwehrmechanismus geben muss, der selektiv gegen niedrig virulente Toxoplasmen Stämme aktiv ist und potenziell von humanen p65 GTPasen realisiert werden könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem eine T-Zell-basierte Methode zur Detektion einer experimentellen Oozysten- und Zysten-induzierten *T. gondii* Infektion in Schweinen etabliert werden, deren Fleisch in Deutschland als eine der wichtigsten Infektionsquellen für Menschen gilt. Als sensitivste Methode erwies sich dabei der Nachweis TLA-spezifischer T-Zellen. Die Detektion von T-Zellen, welche die rekombinant hergestellten *T. gondii* Antigene erkannten, war dagegen weniger sensitiv.

Des Weiteren zeigen die Analysen dieser Arbeit, dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität nicht nur in humanen Fibroblasten, sondern auch in porcinen Epithelzellen die wichtigste Rolle bei der Abwehr gegen den intrazellulären Erreger *T. gondii* einnimmt.

Die bereits von mehreren Arbeitsgruppen publizierte Suppression der *in vitro* T-Zell-Proliferation in Folge einer *T. gondii* Infektion im Mausmodell, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Anhand von IDO-defizienten Mäusen wurde zusätzlich gezeigt, dass das immunregulatorische Enzym IDO nicht an der Vermittlung der Suppression beteiligt ist. Außerdem deuten die eigenen Ergebnisse darauf hin, dass neben dem beschriebenen Mechanismus der Konkurrenz von T<sub>regs</sub> und klassischen T-Zellen um das Zytokin Interleukin 2, weitere lösliche Faktoren an der Suppression der T-Zell-Proliferation beteiligt sind.

Schließlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der atypische hoch virulente *T. gondii* Stamm B6H6 eine bestehende Immunität, die in Balb/c Mäusen durch eine Erstinfektion mit dem Typ II Stamm ME49 etabliert wurde, nicht durchbrechen kann.

## 7. Summary

In the present thesis chronic and acute infection with the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) was detected clearly using a T-cell based diagnostics of human blood samples.

Proliferation assays allowed the detection of Toxoplasma Lysate Antigen (TLA)-specific T-cells in Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) cultures of *T. gondii* seropositive patients with a sensitivity of 100% and a specificity of 92%. Toxoplasma antigens recognized by reactive T-cells differed in individual seropositive donors. In 95% of all seropositive individuals T-cells recognized at least one of the tested recombinant antigens (rAg) GRA1, GRA2, GRA7, GRA9, BAG1 and SAG1 but none of these antigens induced proliferative T-cell responses in cell culture of each and every seropositive donor. Moreover, it was shown that especially GRA1, GRA2 and SAG1 are important target antigens for T-cells whereas GRA7 and GRA9 predominantly serve as target structures for the humoral immune response. Preliminary assessments of the present thesis indicate that detection of interferon (IFN)  $\gamma$  production by TLA- and rAg-specific activated T-cells is also suitable for the discrimination of *T. gondii* seropositive- and -negative patients. The most feasible method to detect IFN $\gamma$  production revealed to be flow-cytometric analysis of whole blood stimulated with TLA or rAg.

Moreover, it was shown that the effector molecule IFN $\gamma$  which was present in T-cell supernatants of seropositive individuals induces the activity of the tryptophan degrading enzyme Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) which inhibits growth of *T. gondii* type I strains. Additional analysis revealed that next to the IDO enzyme an additional IFN $\gamma$  mediated defence mechanism which is selectively active against low virulent *T. gondii* strains and might be realized by human p65 GTPases is active in human foreskin fibroblasts.

Furthermore, a T-cell based method for the detection of experimental oocysts and cysts induced *T. gondii* infection in swine was established in the present thesis. Pork represents an important source of human *T. gondii* infection in Germany. The most sensitive method revealed to be the detection of TLA specific T-cells. The proof of T-cells which recognize the recombinant *T. gondii* antigens was less sensitive.

Moreover, it was shown that IFN $\gamma$  induced IDO activity against *T. gondii* does not only play a role in human fibroblasts but also in porcine epithelial cells.

The finding of different groups concerning an *in vitro* suppression of T-cell proliferation as a result of *T. gondii* infection in mice was confirmed in this thesis. Using IDO deficient mice it became clear that the immune regulatory enzyme IDO is not involved in mediating this kind of suppression. Furthermore, the present thesis reveals that in addition to the known mechanism of competition for Interleukin 2 between regulatory T-cells and classical T-cells other soluble factors must be involved in mediating suppression of T-cell proliferation.

Finally it was shown, that the atypical highly virulent *T. gondii* strain B6H6 is not able to overcome an existing immunity established by primary infection with *T. gondii* type II (ME49).

## 8. Danksagung

Ich möchte allen von ganzem Herzen danken, die mich auf verschiedenste Art beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Walter Däubener möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die freundliche Betreuung und die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit die Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anzufertigen.

Vielen Dank an Dr. Gereon Schares für die Bereitstellung der atypischen Parasiten, an Prof. Dr. Uwe Groß und Dr. Andrea Hotop für die Übernahme der Lineblot-Analysen und an Prof. Dr. Astrid Tenter für Möglichkeit porcine Blutproben in die Studien mit einzuschließen.

Außerdem möchte ich ganz herzlich dem Diagnostik-Team der Serologie für ihre Freundlichkeit und für die schnelle Bearbeitung meiner Blutproben danken.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts, besonders dem Frühstücksclub, für ihre Hilfsbereitschaft und die konstruktive Zusammenarbeit und vor allem für eine richtig gute Atmosphäre und eine schöne Zeit.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, besonders Claudia und Vanessa für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung. Ganz besonders danken, für alles, möchte ich auch Margret.

Shabiné, vielen Dank für all deine Unterstützung bei sämtlichen wissenschaftlichen, sportlichen und menschlichen Herausforderungen, die diese Doktorarbeit mit sich brachte.

Schließlich möchte ich meiner Familie, Mischko und meinen Freunden in Idstein und in Düsseldorf für ihre Motivation, Unterstützung und Geduld danken.

## 9. Literaturverzeichnis

- Adams, L.B., Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., and Krahenbuhl, J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of immunology* *144*, 2725-2729.
- Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C.R., Rüssing, D., and Däubener, W. (2004). Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes and infection* *6*, 806-812.
- Adjogble, K.D., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Hucke, C., Mackenzie, C.R., Cesbron-Delauw, M.F., and Däubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International journal for parasitology* *34*, 1255-1264.
- Ajzenberg, D., Cogne, N., Paris, L., Bessieres, M.H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., and Darde, M.L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases* *186*, 684-689.
- Andrade, W.A., Souza Mdo, C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M.S., Melo, M.B., Bartholomeu, D.C., Ghosh, S., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2013). Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell host & microbe* *13*, 42-53.
- Azevedo, K.M., Setubal, S., Lopes, V.G., Camacho, L.A., and Oliveira, S.A. (2010). Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. *The Brazilian journal of infectious diseases* *14*, 186-189.
- Bachmeyer, C., Mouchnino, G., Thulliez, P., and Blum, L. (2006). Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *The Journal of infection* *52*, e55-57.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature reviews Microbiology* *4*, 621-628.
- Beck, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Diaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., *et al.* (2009). Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International journal for parasitology* *39*, 175-189.
- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., and Sibley, L.D. (2011). Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9631-9636.
- Bekpen, C., Hunn, J.P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D.M., Glowalla, E., Leptin, M., and Howard, J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome biology* *6*, R92.
- Bokken, G.C., van Eerden, E., Opsteegh, M., Augustijn, M., Graat, E.A., Franssen, F.F., Gorlich, K., Buschtons, S., Tenter, A.M., van der Giessen, J.W., *et al.* (2012). Specific serum antibody responses following a *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* co-infection in swine. *Veterinary parasitology* *184*, 126-132.
- Boothroyd, J.C., and Grigg, M.E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current opinion in microbiology* *5*, 438-442.
- Bosch-Driessen, L.E., Berendschot, T.T., Ongkosuwito, J.V., and Rothova, A. (2002). Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* *109*, 869-878.
- Bougdour, A., Tardieux, I., and Hakimi, M.A. (2014). *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. *Cellular microbiology* *16*, 334-343.
- Boumahni, B., Randrianivo, H., Flodrops, H., Kauffmann, E., Sauve, F., Chauvet, O., Renouil, M., and Fourmaintraux, A. (2004). [Maternal toxoplasmosis before conception and chorioretinitis in twin sisters]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* *33*, 248-250.
- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., and Marion, S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet* *350*, 173-177.
- Bradley, P.J., and Sibley, L.D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current opinion in microbiology* *10*, 582-587.

- Bülow, R., and Boothroyd, J.C. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *Journal of immunology* *147*, 3496-3500.
- Candolfi, E., Hunter, C.A., and Remington, J.S. (1994). Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infection and immunity* *62*, 1995-2001.
- Candolfi, E., Hunter, C.A., and Remington, J.S. (1995). Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infection and immunity* *63*, 751-756.
- Carne, B., Demar, M., Ajzenberg, D., and Darde, M.L. (2009). Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging infectious diseases* *15*, 656-658.
- Carruthers, V.B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology international* *48*, 1-10.
- Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European journal of cell biology* *73*, 114-123.
- Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P., *et al.* (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 7537-7541.
- Chan, J., Siegel, J.P., and Luft, B.J. (1986). Demonstration of T-cell dysfunction during acute toxoplasma infection. *Cellular immunology* *98*, 422-433.
- Cheng, Y.S., Patterson, C.E., and Staeheli, P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Molecular and cellular biology* *11*, 4717-4725.
- Chirch, L.M., and Luft, B.J. (2007). Cerebral toxoplasmosis in AIDS. *Handbook of clinical neurology* *85*, 147-158.
- Ciardelli, L., Meroni, V., Avanzini, M.A., Bollani, L., Tinelli, C., Garofoli, F., Gasparoni, A., and Stronati, M. (2008). Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The Pediatric infectious disease journal* *27*, 125-129.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., and Dunn, D.T. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Bmj* *321*, 142-147.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., and Joiner, K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* *125*, 261-274.
- Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., and Capron, A. (1988). Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite immunology* *10*, 553-567.
- Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron, M.F., Tartar, A., and Capron, A. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *Journal of immunology* *149*, 3636-3641.
- Däubener, W., Mackenzie, C., and Hadding, U. (1995). Establishment of T-helper type 1- and T-helper type 2-like human *Toxoplasma* antigen-specific T-cell clones. *Immunology* *86*, 79-84.
- Däubener, W., Pilz, K., Seghrouchni Zennati, S., Bilzer, T., Fischer, H.G., and Hadding, U. (1993). Induction of toxoplasmostasis in a human glioblastoma by interferon gamma. *Journal of neuroimmunology* *43*, 31-38.
- Däubener, W., Wanagat, N., Pilz, K., Seghrouchni, S., Fischer, H.G., and Hadding, U. (1994). A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *Journal of immunological methods* *168*, 39-47.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., *et al.* (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* *179*, 1129-1137.
- Deckert-Schlüter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O.D., Hof, H., and Schlüter, D. (1996). Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *75*, 827-841.

- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Würthner, J., Kurig, S., Beer, S., and Pfeffer, K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *Journal of immunology* *179*, 7729-7740.
- Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2013). Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 294-299.
- Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Darde, M.L., Dei-Cas, E., and Houfflin-Debarge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal diagnosis* *30*, 902-905.
- Denkers, E.Y., Caspar, P., and Sher, A. (1994). *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V beta 5-bearing CD8+ lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *180*, 985-994.
- Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., Martin, D., and Sher, A. (1993). Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *178*, 1465-1472.
- Di Cristina, M., Del Porto, P., Buffolano, W., Beghetto, E., Spadoni, A., Guglietta, S., Piccolella, E., Felici, F., and Gargano, N. (2004). The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes and infection* *6*, 164-171.
- Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* *84*, 933-939.
- Dollfus, H., Dureau, P., Hennequin, C., Uteza, Y., Bron, A., and Dufier, J.L. (1998). Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. *The British journal of ophthalmology* *82*, 1444-1445.
- dos Santos, T.R., Nunes, C.M., Luvizotto, M.C., de Moura, A.B., Lopes, W.D., da Costa, A.J., and Bresciani, K.D. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. *Veterinary parasitology* *171*, 53-57.
- Dubey, J.P. (2001). Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *The Journal of parasitology* *87*, 215-219.
- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary parasitology* *126*, 57-72.
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. *Veterinary parasitology* *164*, 89-103.
- Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C., Hill, R., and Su, C. (2007). Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* *134*, 1559-1565.
- Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *The Journal of protozoology* *23*, 537-546.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews* *11*, 267-299.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Chockalingam, A., Pena, H.F., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A., Gennari, S.M., Bahia Oliveira, L.M., and Su, C. (2008). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary parasitology* *157*, 299-305.
- Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J.P., and Capron, A. (1990). Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infection and immunity* *58*, 2120-2126.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in parasitology* *26*, 190-196.
- Fabiani, S., Pinto, B., and Bruschi, F. (2013). Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship? *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* *34*, 417-425.

- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation* 9, 1069-1077.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews Microbiology* 2, 820-832.
- Fatoohi, A.F., Cozon, G.J., Gonzalo, P., Mayencon, M., Greenland, T., Picot, S., and Peyron, F. (2004). Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. *Clinical and experimental immunology* 136, 535-541.
- Fatoohi, A.F., Cozon, G.J., Greenland, T., Ferrandiz, J., Bienvenu, J., Picot, S., and Peyron, F. (2002). Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 704-707.
- Fatoohi, A.F., Cozon, G.J., Wallon, M., Kahi, S., Gay-Andrieu, F., Greenland, T., and Peyron, F. (2003). Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 22, 181-184.
- Fernandes, M.A., Batista, G.I., Carlos Jda, C., Gomes, I.M., Azevedo, K.M., Setubal, S., Oliveira, S.A., Velarde, L.G., and Cardoso, C.A. (2012). *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-1-infected and uninfected pregnant women and the impact on congenital toxoplasmosis diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases* 16, 170-1174.
- Flegr, J. (2013). How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends in parasitology* 29, 156-163.
- Fox, B.A., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *International journal for parasitology* 34, 323-331.
- Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. *The Journal of infectious diseases* 122, 553-559.
- Frenkel, J.K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitology today* 4, 273-278.
- 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*. *Journal of immunology* 149, 175-180.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology* 157, 798-805.
- Goldszmid, R.S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., and Sher, A. (2012). NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059.
- Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in immunology* 24, 242-248.
- Gubbels, M.J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M., and Robey, E.A. (2005). Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* 73, 703-711.
- Hakim, F.T., Gazzinelli, R.T., Denkers, E., Hieny, S., Shearer, G.M., and Sher, A. (1991). CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *Journal of immunology* 147, 2310-2316.
- Haldar, A.K., Saka, H.A., Piro, A.S., Dunn, J.D., Henry, S.C., Taylor, G.A., Frickel, E.M., Valdivia, R.H., and Coers, J. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. *PLoS pathogens* 9, e1003414.
- Haque, S., Khan, I., Haque, A., and Kasper, L. (1994). Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. *Infection and immunity* 62, 2908-2916.
- Henriquez, S.A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J., and Roberts, C.W. (2009). Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation* 16, 122-133.

- Herrmann, D.C., Bärwald, A., Maksimov, A., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Conraths, F.J., and Schares, G. (2012). *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Veterinary research* **43**, 39.
- Herrmann, D.C., Maksimov, P., Hotop, A., Gross, U., Däubener, W., Liesenfeld, O., Pleyer, U., Conraths, F.J., and Schares, G. (2014). Genotyping of samples from German patients with ocular, cerebral and systemic toxoplasmosis reveals a predominance of *Toxoplasma gondii* type II. *International journal of medical microbiology* : *IJMM* **304**, 911-916.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., Lunney, J.K., and Gamble, H.R. (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary parasitology* **141**, 9-17.
- Hinze-Selch, D., Däubener, W., Erdag, S., and Wilms, S. (2010). The diagnosis of a personality disorder increases the likelihood for seropositivity to *Toxoplasma gondii* in psychiatric patients. *Folia parasitologica* **57**, 129-135.
- Holland, G.N. (1989). Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host. *International ophthalmology* **13**, 399-402.
- Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of infectious diseases* **172**, 1561-1566.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews Microbiology* **10**, 766-778.
- Jensen, K.D., Camejo, A., Melo, M.B., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G.M., Frickel, E.M., Ploegh, H.L., Young, L., and Saeij, J.P. (2015). *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *mBio* **6**, e02280.
- Johnson, L.L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infection and immunity* **60**, 3719-3724.
- Johnson, L.L., and Sayles, P.C. (2002). Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infection and immunity* **70**, 185-191.
- Jungi, T.W., Adler, H., Adler, B., Thony, M., Krampe, M., and Peterhans, E. (1996). Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species-specific regulation. *Veterinary immunology and immunopathology* **54**, 323-330.
- Kapperud, G., Jennum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A., and Eng, J. (1996). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *American journal of epidemiology* **144**, 405-412.
- Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., Mirhashemi, M.E., and Khalil, K.M. (2013). The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environmental science and pollution research international* **20**, 86-99.
- Kasper, L.H., Khan, I.A., Ely, K.H., Buelow, R., and Boothroyd, J.C. (1992). Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *Journal of immunology* **148**, 1493-1498.
- Khaminets, A., Hunn, J.P., Könen-Waisman, S., Zhao, Y.O., Preukschat, D., Coers, J., Boyle, J.P., Ong, Y.C., Boothroyd, J.C., Reichmann, G., *et al.* (2010). Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cellular microbiology* **12**, 939-961.
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L.V., Belfort, R., Jr., Vitor, R.W., Silveira, C., and Sibley, L.D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging infectious diseases* **12**, 942-949.
- Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D. (2009). Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS genetics* **5**, e1000404.
- Khan, I.A., Eckel, M.E., Pfefferkorn, E.R., and Kasper, L.H. (1988a). Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases* **157**, 979-984.
- Khan, I.A., Ely, K.H., and Kasper, L.H. (1991). A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of immunology* **147**, 3501-3506.

- Khan, I.A., Matsuura, T., Fonseka, S., and Kasper, L.H. (1996a). Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1<sup>-/-</sup> mice. *Journal of immunology* *156*, 636-643.
- Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1996b). Activation-mediated CD4<sup>+</sup> T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International immunology* *8*, 887-896.
- Khan, I.A., Smith, K.A., and Kasper, L.H. (1988b). Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* *141*, 3600-3605.
- Koethe, M., Pott, S., Ludewig, M., Bangoura, B., Zöller, B., Dausgschies, A., Tenter, A.M., Spekker, K., Bittame, A., Mercier, C., *et al.* (2011). Prevalence of specific IgG-antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic turkeys determined by kinetic ELISA based on recombinant GRA7 and GRA8. *Veterinary parasitology* *180*, 179-190.
- Kotresha, D., and Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* *118*, 529-542.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* *30*, 16-34.
- Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., and Dubey, J.P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11423-11428.
- Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2011). *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology* *138*, 1829-1831.
- Ling, Y.M., Shaw, M.H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G.A., Ferguson, D.J., and Yap, G.S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of experimental medicine* *203*, 2063-2071.
- Lovett, J.L., Marchesini, N., Moreno, S.N., and Sibley, L.D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca<sup>2+</sup> release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)/ryanodine-sensitive stores. *The Journal of biological chemistry* *277*, 25870-25876.
- Maksimov, P., Buschtöns, S., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Görlich, K., Tenter, A.M., Dubey, J.P., Nagel-Kohl, U., Thoms, B., Bötcher, L., *et al.* (2011). Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Veterinary parasitology* *182*, 140-149.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS pathogens* *1*, e24.
- McLeod, R., Beem, M.O., and Estes, R.G. (1985). Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. *Journal of clinical & laboratory immunology* *17*, 149-153.
- McLeod, R., Eisenhauer, P., Mack, D., Brown, C., Filice, G., and Spitalny, G. (1989). Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* *142*, 3247-3255.
- Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bülle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jäger, M., Sorg, R., *et al.* (2011). Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* *25*, 648-654.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* *103*, 4619-4621.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews Immunology* *4*, 762-774.
- Melo, M.B., Jensen, K.D., and Saeij, J.P. (2011). *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in parasitology* *27*, 487-495.
- Mennechet, F.J., Kasper, L.H., Rachinel, N., Minns, L.A., Luangsay, S., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2004). Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology* *34*, 1059-1067.
- Mercier, C., and Cesbron-Delauw, M.F. (2015). *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends in parasitology* *31*, 60-71.

- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., and Smith, N.C. (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 39, 23-39.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine* 189, 1363-1372.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191-1193.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway's immunobiology*, seventh edition edn.
- Murray, H.W., Gellene, R.A., Libby, D.M., Rothermel, C.D., and Rubin, B.Y. (1985). Activation of tissue macrophages from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and interferon-gamma. *Journal of immunology* 135, 2374-2377.
- Murray, H.W., Szuro-Sudol, A., Wellner, D., Oca, M.J., Granger, A.M., Libby, D.M., Rothermel, C.D., and Rubin, B.Y. (1989). Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infection and immunity* 57, 845-849.
- Narum, D.L., Nguyen, V., Zhang, Y., Glen, J., Shimp, R.L., Lambert, L., Ling, I.T., Reiter, K., Ogun, S.A., Long, C., *et al.* (2008). Identification and characterization of the *Plasmodium yoelii* PyP140/RON4 protein, an orthologue of *Toxoplasma gondii* RON4, whose cysteine-rich domain does not protect against lethal parasite challenge infection. *Infection and immunity* 76, 4876-4882.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine* 158, 670-689.
- Neyer, L.E., Grunig, G., Fort, M., Remington, J.S., Rennick, D., and Hunter, C.A. (1997). Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* 65, 1675-1682.
- Niedelman, W., Sprockholt, J.K., Clough, B., Frickel, E.M., and Saeij, J.P. (2013). Cell death of gamma interferon-stimulated human fibroblasts upon *Toxoplasma gondii* infection induces early parasite egress and limits parasite replication. *Infection and immunity* 81, 4341-4349.
- Ong, Y.C., Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *The Journal of biological chemistry* 285, 28731-28740.
- Pantoja, L.G., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Molestina, R.E., and Summersgill, J.T. (2000). Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infection and immunity* 68, 6478-6481.
- Parmley, S.F., Gross, U., Sucharczuk, A., Windeck, T., Sgarlato, G.D., and Remington, J.S. (1994). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology* 80, 293-301.
- Patel, B., Young, Y., Duffy, K., Tanner, R.P., Johnson, J., and Holliman, R.E. (1993). Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *Journal of medical microbiology* 38, 286-292.
- Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 908-912.
- Pfefferkorn, E.R., and Pfefferkorn, L.C. (1977). Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *The Journal of protozoology* 24, 449-453.
- Pfefferkorn, E.R., Rebhun, S., and Eckel, M. (1986). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *Journal of interferon research* 6, 267-279.
- Pfeffer, K.I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., and Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12, 977-982.
- Pietkiewicz, H., Hiszczynska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H.V., Stankiewicz, M., Andrzejewska, I., and Myjak, P. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology* 42, 1779-1781.

- Pinon, J.M., Toubas, D., Marx, C., Mougeot, G., Bonnin, A., Bonhomme, A., Villaume, M., Foudrinier, F., and Lapan, H. (1990). Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology* *28*, 1739-1743.
- Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Darde, M.L., and Marty, P. (2011). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging infectious diseases* *17*, 1327-1328.
- Posavad, C.M., Wald, A., Hosken, N., Huang, M.L., Koelle, D.M., Ashley, R.L., and Corey, L. (2003). T cell immunity to herpes simplex viruses in seronegative subjects: silent infection or acquired immunity? *Journal of immunology* *170*, 4380-4388.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslee, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M.F., and Pistoia, V. (2000). T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *Journal of immunology* *164*, 3741-3748.
- Purner, M.B., Krug, E.C., Nash, P., Cook, D.R., Berens, R.L., and Curiel, T.J. (1995). Cross-reactivity of human *Toxoplasma*-specific T cells: implications for development of a potential immunotherapeutic or vaccine. *The Journal of infectious diseases* *171*, 984-991.
- Reese, M.L., Zeiner, G.M., Saeij, J.P., Boothroyd, J.C., and Boyle, J.P. (2011). Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9625-9630.
- Restrepo, C., Rallon, N.I., del Romero, J., Rodriguez, C., Hernando, V., Lopez, M., Peris, A., Lozano, S., Sempere-Ortells, J.M., Soriano, V., *et al.* (2010). Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *Journal of immunology* *185*, 982-989.
- Roos, T., Martius, J., Gross, U., and Schrod, L. (1993). Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy. *Obstetrics and gynecology* *81*, 243-250.
- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D., and Saeij, J.P. (2011). Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *The Journal of experimental medicine* *208*, 195-212.
- Rott, O., Mignon-Godefroy, K., Fleischer, B., Charreire, J., and Cash, E. (1995). Superantigens induce primary T cell responses to soluble autoantigens by a non-V beta-specific mechanism of bystander activation. *Cellular immunology* *161*, 158-165.
- Saavedra, R., and Herion, P. (1991). Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity. *Parasitology research* *77*, 379-385.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* *314*, 1780-1783.
- Saeij, J.P., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* *445*, 324-327.
- Saffra, N.A., Seidman, C.J., and Weiss, L.M. (2013). Ocular Toxoplasmosis: Controversies in Primary and Secondary Prevention. *Journal of neuroinfectious diseases* *4*.
- Salinas, N., Olguin, J.E., Castellanos, C., and Saavedra, R. (2014). T cell suppression in vitro during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells. *Scandinavian journal of immunology* *79*, 1-11.
- Sayles, P.C., and Johnson, L.L. (1996). Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* *64*, 3088-3092.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology* *168*, 5997-6001.
- 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. *Journal of immunology* *157*, 4045-4054.
- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., and Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *International journal of medical microbiology : IJMM* *304*, 917-929.

- Schroten, H., Spors, B., Hucke, C., Stins, M., Kim, K.S., Adam, R., and Däubener, W. (2001). Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics* 32, 206-210.
- Schroten, M., Hanisch, F.G., Quednau, N., Stump, C., Riebe, R., Lenk, M., Wolburg, H., Tenenbaum, T., and Schwerk, C. (2012). A novel porcine in vitro model of the blood-cerebrospinal fluid barrier with strong barrier function. *PLoS one* 7, e39835.
- Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W.t., Macmicking, J.D., and Sibley, L.D. (2013). Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 9, e1003320.
- 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. *Journal of immunology* 150, 3982-3989.
- Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82-85.
- Sibley, L.D., Hakansson, S., and Carruthers, V.B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Current biology* : CB 8, R12-14.
- Sibley, L.D., LeBlanc, A.J., Pfefferkorn, E.R., and Boothroyd, J.C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* 132, 1003-1015.
- Sobanski, V., Ajzenberg, D., Delhaes, L., Bautin, N., and Just, N. (2013). Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *American journal of respiratory and critical care medicine* 187, 1143-1145.
- Solano Aguilar, G.I., Beshah, E., Vengroski, K.G., Zarlenga, D., Jauregui, L., Cosio, M., Douglass, L.W., Dubey, J.P., and Lunney, J.K. (2001). Cytokine and lymphocyte profiles in miniature swine after oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *International journal for parasitology* 31, 187-195.
- Spekker, K., Czesla, M., Ince, V., Heseler, K., Schmidt, S.K., Schares, G., and Däubener, W. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infection and immunity* 77, 4496-4501.
- Spekker, K., Leineweber, M., Degrandi, D., Ince, V., Brunder, S., Schmidt, S.K., Stuhlsatz, S., Howard, J.C., Schares, G., Degistirici, O., et al. (2013). Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Medical microbiology and immunology* 202, 197-206.
- Sturge, C.R., Benson, A., Raetz, M., Wilhelm, C.L., Mirpuri, J., Vitetta, E.S., and Yarovinsky, F. (2013). TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 10711-10716.
- Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2014). Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity* 82, 3090-3097.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8413-8418.
- Suzuki, Y., and Kobayashi, A. (1984). Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma*-infected mice. I. Inhibition of proliferation of lymphocytes in primary antibody responses. *Cellular immunology* 85, 417-427.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516-518.
- Takahashi, E.E., and Rossi, C.L. (1994). Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* spgA antibodies in acute toxoplasmosis. *Journal of clinical pathology* 47, 1101-1104.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature reviews Immunology* 4, 100-109.

- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., *et al.* (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* *314*, 1776-1780.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., and Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* *30*, 1217-1258.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., and Verschueren, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and immunity* *68*, 38-45.
- Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., Simpson, R., Holfels, E., Hopkins, J., Mack, D., *et al.* (1996). Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *23*, 1055-1060.
- Wang, Y., Zhang, D., Wang, G., Yin, H., and Wang, M. (2013). Immunization with excreted-secreted antigens reduces tissue cyst formation in pigs. *Parasitology research* *112*, 3835-3842.
- Wilson, C.B., Remington, J.S., Stagno, S., and Reynolds, D.W. (1980). Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics* *66*, 767-774.
- Yamamoto, J.H., Vallochi, A.L., Silveira, C., Filho, J.K., Nussenblatt, R.B., Cunha-Neto, E., Gazzinelli, R.T., Belfort, R., Jr., and Rizzo, L.V. (2000). Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases* *181*, 2018-2022.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., *et al.* (2012). A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* *37*, 302-313.
- Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., *et al.* (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *The Journal of experimental medicine* *206*, 2747-2760.
- Yap, G.S., Shaw, M.H., Ling, Y., and Sher, A. (2006). Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes and infection* *8*, 1174-1178.
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature reviews Immunology* *14*, 109-121.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., *et al.* (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.