



Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)-vermittelte
Tryptophan-Degradation als antiparasitärer Effekt
gegen *Toxoplasma gondii* *in vivo*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sabine Pudelko
aus Krefeld

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. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2015

Für Vicky Kolb-Bachofen.

**Es ist nicht alles Gold, was glänzt.
Aber es glänzt auch nicht alles, was Gold ist.**

Christian Friedrich Hebbel (1813 - 1863)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XV

1. EINLEITUNG	1
1.1. EIGENSCHAFTEN UND INFektionsZYKLUS VON <i>T. gondii</i>	1
1.2. SYMPTOME EINER TOXOPLASMENINFEKTION	4
1.3. DAS IMMUNSYSTEM	5
1.3.1. Das angeborene Immunsystem und die Detektion von <i>T. gondii</i>	7
1.3.2. Das erworbene Immunsystem	8
1.3.3. IFN γ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen <i>T. gondii</i>	10
1.3.4. Die Tryptophan degradierende Indolamin 2,3-Dioxygenase	12
1.4. IMMUNREGULATORISCHE FUNKTION DER IDO	16
1.5. ORGANSPEZIFISCHE PATHOGENABWEHR	18
1.5.1. Die Lunge als Zielorgan während der Toxoplasmose	18
1.5.2. Immunologische Bedeutung der Milz im Rahmen der Toxoplasmose	19
1.5.3. Die Leber als immunologisches Organ	19
1.6. HUMANE IDO IM VERGLEICH MIT MURINER IDO: ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. MATERIAL	23
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	23
2.1.2. Medien und Puffer	24
2.1.3. Geräte	25
2.1.4. Verbrauchsmaterialien	26
2.1.5. Antikörper für den Nachweise von Proteinen in Western Blot Analysen	27
2.1.6. Antikörper und Proteine für durchflusszytometrische Analysen	27
2.1.7. Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
2.1.8. Kits	28
2.1.9. Größenstandards	28
2.1.10. Zelllinien	28
2.1.11. Parasiten	28
2.1.12. Mausstämme	28

2.2. METHODEN	29
2.2.1. Zellkultur Methoden	29
2.2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen und Parasiten	29
2.2.1.2. Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten	29
2.2.1.3. Kultivierung von Parasiten	29
2.2.2. Tierversuche	29
2.2.2.1. Tierhaltung	30
2.2.2.2. Beobachtung der Versuchstiere	30
2.2.2.3. Mauslinien	30
2.2.3. Infektionsbiologische Methoden	30
2.2.3.1. Präparation der Parasiten zur in vivo Infektion	30
2.2.4. Entnahme von Untersuchungsmaterial	30
2.2.4.1. Gewinnung von Serum	31
2.2.4.2. Organentnahme	31
2.2.4.3. Homogenisation der Organe	31
2.2.5. Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.5.1. Etablierung des Messverfahrens der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	32
2.2.5.2. Aufbereitung der Proben für die HPLC	34
2.2.5.3. Proteinbestimmung mittels BCA Protein-Assay	34
2.2.5.4. Western Blot Analyse	34
2.2.5.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen	35
2.2.6. Enzymatische Methoden	35
2.2.6.1. Isolierung und Aufreinigung von DNS aus Gewebeproben	35
2.2.6.2. Polymerase-Ketten-Reaktion zur Genotypisierung von Mäusen	36
2.2.6.3. Quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der Parasiten-Last	37
2.2.6.4. Enzym-gekoppelter Immunoabsorptions Assay (ELISA)	37
2.2.6.5. Membrangebundener Maus-Zytokin Array	38
2.2.6.6. Multi-Plex Analyse zur Bestimmung von Zytokinen in Serum und Gewebe	38
2.2.6.7. Analyse der Alanin-Amino-Transferase (ALT) und Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Serum	39
2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse	39
2.2.7.1. Präparation der Milz mit anschließender Immunmarkierung und FACS-Analyse	40
2.2.7.2. Präparation der Lunge mit anschließender Immunmarkierung und FACS-Analyse	41
2.2.8. Histologische Analysen	41
2.2.8.1. Anfertigung von Gefrierschnitten der Leber	41
2.2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten der Lunge	42
2.2.8.3. Prozedur der H&E-Färbung	43
3. ERGEBNISSE	45
3.1. INFektionsBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DES ZYTOKIN-SPIEGELS IM SERUM VON WT UND IDO ^{-/-} MÄUSEN	45
3.2. FOLGEN EINER IDO-AKTIVITÄT AUF DEN TRYPTOPHAN- BZW. KYNURENIN-SPIEGEL IM SERUM	49
3.3. ORGANSPEZIFISCHE VERÄNDERUNGEN IM VERLAUF EINER TOXOPLASMENINFEKTION	55
3.3.1. Veränderungen in der Milz	55
3.3.2. Veränderungen in der Leber	61

3.3.3. Veränderungen in der Lunge	67
3.3.3.1. IDO-Induktion durch Toxoplasmeninfektion	68
3.3.3.2 Toxoplasmen-Last im Verlauf der Infektion	74
3.3.3.3 Infektionsbedingte Erhöhung der Zytokin-Konzentration	75
3.3.3.4. Zelluläre Infiltrate in der Lunge durch eine Toxoplasmeninfektion	77
3.4. VERGLEICHENDE INFektionsSTUDIEN AN WT UND IDO DEFIZIENTEN TIEREN	84
3.4.1. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 2 <i>T. gondii</i> Infektion	84
3.4.2. Gewichtsveränderungen im Verlauf einer Typ 2 <i>T. gondii</i> Infektion	85
3.4.3. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 1 <i>T. gondii</i> Infektion	88
3.4.4. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 1 <i>T. gondii</i> Infektion nach Immunisierung mit Typ 2 <i>T. gondii</i> Tachyzoiten	89
4. DISKUSSION	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	109
6. SUMMARY	111
7. DANKSAGUNG	113
8. LITERATURVERZEICHNIS	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	3
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene	7
Abbildung 1.3: Immunreaktion nach <i>T. gondii</i> Infektion	9
Abbildung 1.4: IFN γ -induzierte Abwehrmechanismen gegen <i>T. gondii</i>	11
Abbildung 1.5: Tryptophan-Stoffwechsel	13
Abbildung 1.6: IDO-medierte Effekte im humanen System	14
Abbildung 2.1: Darstellung der Homogenisation	32
Abbildung 2.2: Überblick des Multi-Plex Assays	39
Abbildung 3.1: Lageplan der anti Zytokin Antikörper des Dot Blot Arrays	46
Abbildung 3.2: Dot Blot Zytokin Array aus Serumproben von WT und IDO ^{-/-} Mäusen	46
Abbildung 3.3: Multi-Plex Assay/ELISA differentiell regulierter Zytokine im Serum	49
Abbildung 3.4: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung im Serum einer WT Maus	50
Abbildung 3.5: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung im Serum einer WT Maus	51
Abbildung 3.6: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung im Serum einer IDO ^{-/-} Maus	52
Abbildung 3.7: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung im Serum einer IDO ^{-/-} Maus	52
Abbildung 3.8: Konzentration von Tryptophan und Kynurenin im Serum	54
Abbildung 3.9: Splenomegalie im Verlauf einer <i>T. gondii</i> Infektion	56
Abbildung 3.10: Anzahl lebender Zellen in der Milz im Verlauf der <i>T. gondii</i> Infektion	57
Abbildung 3.11: Gating-Strategie und exemplarische Falschfarben-Blots zur Bestimmung der Zellvitalität in der Milz	58
Abbildung 3.12: FACS-Analyse der Vitalität von Milzzellen im Infektionsverlauf.	59

Abbildung 3.13: Differenzierte Darstellung der Vitalität von Milzzellen im Verlauf der Infektion	60
Abbildung 3.14: Veränderung des Lebergewichtes im Verlauf der Infektion	61
Abbildung 3.15: H&E Färbung von Gefrierschnitten der Leber	62
Abbildung 3.16: Quantifizierung infektionsbedingter Leberschädigung	63
Abbildung 3.17: Bestimmung der Toxoplasmen-Last in der Leber	65
Abbildung 3.18: Tryptophan- und Kynurenin-Konzentrationen in der Leber im Verlauf	66
Abbildung 3.19: Western Blot Analyse des IDO-Proteins in Milz, Leber und Lungengewebe von WT und IDO ^{-/-}	66
Abbildung 3.20: Infektionsbedingte Zunahme des Lungengewichtes	68
Abbildung 3.21: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung in der Lunge einer WT Maus	69
Abbildung 3.22: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung in der Lunge einer WT Maus	69
Abbildung 3.23: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung in der Lunge einer IDO ^{-/-} Maus	70
Abbildung 3.24: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung in der Lunge einer IDO ^{-/-} Maus	70
Abbildung 3.25: Konzentration von Tryptophan und Kynurenin in der Lunge	72
Abbildung 3.26: Western Blot Analyse zum Nachweis des IDO-Proteins in der Lunge	73
Abbildung 3.27: Parasiten-Last in der Lunge	74
Abbildung 3.28: Multi-Plex Assay zum Nachweis proinflammatorischer Mediatoren im Lungengewebe	76
Abbildung 3.29 A: H&E Färbung von Gefrierschnitten der WT Lunge.	78
Abbildung 3.29 B: H&E Färbung von Gefrierschnitten der IDO ^{-/-} Lunge.	79
Abbildung 3.30: Gating-Strategie und exemplarische Falschfarben-Blots der FACS Analyse CD4 und CD8 positiver T-Zellen in der Lunge	80
Abbildung 3.31: Quantifizierung der Subtypen CD3 positiver Zellen in der Lunge	82

Abbildung 3.32: Überlebensanalyse von WT und IDO defizienten Mäusen im Verlauf einer <i>T. gondii</i> Infektion _____	84
Abbildung 3.33: Infektionsbedingte Gewichtsabnahme bei WT und IDO defizienten Mäusen _____	85
Abbildung 3.34: Exemplarische Western Blot Analyse zum Nachweis der IDO und GTPasen in der Lunge _____	86
Abbildung 3.35: Überlebensanalyse nach Infektion mit einem Typ 1 <i>T. gondii</i> Stamm im Vergleich mit einem Typ 2 <i>T. gondii</i> Stamm _____	88
Abbildung 3.36: Überlebensanalyse von WT und IDO ^{-/-} Mäusen bei Infektion mit 10 ⁴ Tachyzoiten des Typ 2 Toxoplasmen Stammes ME49 _____	89
Abbildung 3.37: Analyse der Immunisierungs-Effektivität _____	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Prozentualer Anteil verwendeter Puffer im Verlauf der HPLC _____	33
---	----

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
ε	epsilon
γ	gamma
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
$\leq$	kleiner gleich
$\geq$	größer gleich
μl	Mikroliter
∞	unendlich
$\emptyset$	Durchmesser
A	Ampere
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> , erworbenes Immundefektsyndrom
AK	Antikörper
ALT (früher GPT)	Alanin-Amino-Transferase
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AST (früher GOT)	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptions Units
aW	alveoläre Wand
BMDM	<i>bonemarrow derived macrophages</i> , Knochenmark abgeleitete Makrophagen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CCL2	C-C Motiv Ligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	Schweiz
cm	centimeter
cm^2	Quadratcentimeter
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , Zytomegalovirus
ConA	Concanavalin A
CTL	<i>cytotoxic t-lymphocyte</i> , zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA4	<i>cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4</i> , zytotoxisches T-Lymphozyt assoziiertes Protein 4
CXCL-1	C-X-C Motiv Chemokin-1
CXCL-10	C-X-C Motiv Chemokin-10
CXCL-9	C-X-C Motiv Chemokin Ligand-9
D	Deutschland
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEREG	<i>depletion of regulatory t-cells</i>
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
dH_2O	Destilliertes Wasser (Millipore)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
DZ	dendritische Zelle

EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
et al.	<i>et alii</i> , und andere
F	Frankreich
FABA (6-FABA)	2-Amino-6-Fluoro-Benzolsäure
FACS	<i>fluoreszenz activated cell scanning</i> , fluoreszenzaktiviertes Zell-Scanning
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FSC-A	<i>forward scatter A</i> , Vorwärtsstreulicht A
G	Gravitationskonstante
GBP2	Guanylat-bindendes Protein 2
GCN2	<i>general control non-depressible 2</i>
G-CSF	<i>Granulozyten colony stimulating factor</i> , Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GOT (auch: AST)	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT (auch: ALT)	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GTPase	Guanosintriphosphatase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> , humane Vorhautfibroblasten
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
H&E	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
IDO bzw. IDO1	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IDO2	Indolamin 2,3-Dioxygenase 2
IDO ^{-/-}	IDO defiziente Maus/Mäuse
IFN γ	Interferon gamma
IL-12 p70	Interleukin-12 p70
IL-1 ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Media</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iRGa6	<i>immunity related GTPase a 6</i> , Immunität abhängige GTPase a 6
ISS-ODN	Immunstimulatorische DNS-Sequenzen
kDa	Kilodalton
Kyn	Kynurenin
l	liter
LD	letale Dosis
LED	Licht emittierende Dioden
L-NAME	L-NG-Nitroarginin-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	Molar
mAU	milli Absorptions Units
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i> , Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
ME49	Typ 2 Toxoplasma Stamm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ,

	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i> , Maus-Mammatumovirus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MSZ	mesenchymale Stammzellen
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n	Anzahl (verwendeter individueller Tiere)
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
n. det.	nicht detektierbar
NGMMA	NG-Monomethyl-L-Arginin
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NL	Niederlande
nm	nanometer
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
p	pico
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
pmol	picomol
PPM	primäre peritoneale Makrophagen
PV	parasitophore Vakuole
p-Wert	<i>probability-value</i> , statistischer Signifikanzwert
qRT-PCR	quantitative RT-PCR, Echtzeit-PCR
RH	Typ 1 Toxoplasma Stamm
RNS	Ribonukleinsäure
RP-C18	Reversephase-mit 18-Kohlenwasserstoffen (Säule HPLC)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SAG2	<i>surface antigen 2</i> , Oberflächen-Antigen 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SSC-A	<i>side scatter A</i> , Seitwärtsstreulicht A
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichlor-Essigsäure
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
tRNS	<i>transfer RNS</i> , Überträger-RNS
TS-4	Temperatur sensistiver <i>T. gondii</i> Stamm 4
u. a.	unter anderem

UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
vs.	<i>versus</i>
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben
ZNS	zentrales Nervensystem

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende 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

Sabine Pudelko

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der antiparasitären Funktion des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) im Verlauf einer Toxoplasmeninfektion im Mausmodell. Die Bedeutung von *T. gondii* als Erreger einer Zoonose wird in den Kapiteln 1.1. und 1.2. herausgearbeitet. Die Beschreibung der angeborenen sowie der spezifischen Immunantwort im Allgemeinen und speziell im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* erfolgt in Kapitel 1.3.

Die antimikrobielle und immunregulatorische Wirkung der IDO wird in den Kapiteln 1.3.4. und 1.4. erläutert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, ob das Enzym IDO durch seine Tryptophan degradierenden und immunmodulatorischen Eigenschaften nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* antiparasitäre Effekte gegen den Tryptophan-auxotrophen Parasiten *T. gondii* ausübt. Die Analyse der IDO während einer Toxoplasmeninfektion im Mausmodell war von besonderem Interesse, da in der Literatur in humanen Zellkultursystemen eindeutig beschrieben ist, dass die IDO durch die Tryptophan degradierende Funktion eine antiparasitäre Funktion einnimmt. Daten zur Relevanz der murinen IDO während einer Toxoplasmeninfektion *in vivo* waren zu Beginn dieser Arbeit nicht verfügbar (siehe Kapitel 1.6.).

1.1. Eigenschaften und Infektionszyklus von *T. gondii*

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der dem Phylum der Apikomplexa zugeordnet wird. Die erste Beschreibung fand 1909 durch Nicolle und Manceaux statt, die den Parasiten in *Ctenodactylus gundi*, einem afrikanischen Nagetier, entdeckten (Nicolle und Manceaux, 1909). Namensgebend war zusätzlich die typische bogenförmige Morphologie des Parasiten (griechisch: *toxos* = Bogen; *plasma* = Form). Eine Infektion mit diesem Erreger, dessen Endwirt die Katze und andere Mitglieder der *Felidae* sind (Frenkel, 1970; Frenkel und Dubey, 1972), kann bei jedem warmblütigen Lebewesen stattfinden. Es sind rund 30 Spezies von Vögeln und etwa 300 Spezies von Säugetieren, wozu auch der Mensch gehört, bekannt (Canning, 1990), in denen sich der Parasit ungeschlechtlich vermehren kann (Dubey, 1998). Die globale Durchseuchung ist sowohl in Tieren als auch in Menschen relativ hoch, aber innerhalb geographischer Grenzen sehr variabel. Die Anzahl seropositiver Menschen variiert z. B. klimaabhängig: In kälteren Regionen ist die Prävalenz niedriger als in wärmeren. Zum anderen ist die Anzahl seropositiver Menschen in Entwicklungsländern höher als in Industrieländern (Schlüter et al., 2014). Auch das unterschiedliche Essverhalten in verschiedenen Ländern und Kulturen, vorrangig die Häufigkeit des Fleischverzehrs, stellt ein Risikofaktor für eine Infektion mit *T. gondii* dar (Cook et al., 2000). Daher schwanken die regionalen Angaben zur Prävalenz von *T. gondii* beim Menschen zwischen 20 bis 75% (Flegr, 2013; Pappas et al., 2009; Schlüter et al., 2014).

In Europa und Nordamerika werden die auftretenden *T. gondii* Populationen in drei klonale genotypische Stämme eingeteilt: Diese sind der Typ 1 (z. B. RH), Typ 2 (z. B. ME49) und Typ 3 Stamm (z. B. NED) (Howe und Sibley, 1995; Sibley und Boothroyd, 1992), wobei der Typ 2 Stamm der häufigste Verursacher einer Toxoplasmeninfektion bei Mensch und Tier innerhalb

Europas ist (Fuentes et al., 2001; Howe und Sibley, 1995; Schlüter et al., 2014). Die verschiedenen klonalen Stämme unterscheiden sich in ihrer Mausvirulenz. Parasiten des Typ 1 Stammes weisen eine sehr hohe Virulenz auf: Schon < 10 Parasiten führen zu einer 100 prozentigen Mortalität der Tiere (Ruskin und Remington, 1971). Bei Parasiten des Typ 2 Stammes ist eine LD₅₀ (letale Dosis), also eine Dosis bei der 50% der Experimental-Tiere sterben, von $> 10^3$ Parasiten beschrieben (Sibley et al., 2002). Parasiten des Typ 3 Stammes werden generell als niedrig virulente Toxoplasmen bezeichnet, die LD₅₀ liegt bei $> 10^5$ Parasiten (Gross, 1996).

Für Menschen und alle weiteren Zwischenwirte ist eine mögliche Infektionsquelle die Aufnahme von rohem oder nicht genügend durchgegartem, zystenhaltigem Fleisch (karnivore Infektion). Auch durch die Aufnahme von verunreinigtem Frischwasser bzw. Gemüse, welches mit Oozysten des Parasiten kontaminiert sein kann (fäkal-orale Infektion), kann eine Infektion mit *T. gondii* erfolgen. Ebenso ist eine Übertragung des Parasiten von der Mutter auf den ungeborenen Fötus (kongenitale oder vertikale Infektion) möglich (Schlüter et al., 2014; Tenter et al., 2000). Nach der karnivoren oder fäkal-oralen Aufnahme der Zysten bzw. Oozysten findet eine asexuelle Vermehrung des Parasiten in seinem Zwischenwirt statt: Im Dünndarm des Zwischenwirts verlässt die langsam replizierende Form von *T. gondii*, die sogenannten Bradyzoiten, ihre Zyste und entwickelt sich zu der schnell replizierenden Form des Parasiten, den Tachyzoiten (Freyre et al., 1989). Diese Tachyzoiten vermehren sich im Zwischenwirt in nahezu allen Gewebszellen, indem sie nach der Invasion in die Zelle eine parasitophore Vakuole (PV) bilden und sich in dieser PV mittels Endodyogenie vermehren (Dubey et al., 1997). Nach mehreren Teilungszyklen bietet die Wirtszelle nicht mehr genügend Platz für die Parasiten, was dazu führt, dass die Zelle aufplatzt. Nach der Freisetzung der Parasiten aus der Wirtszelle folgt die Invasion und Vermehrung der Parasiten in den benachbarten Zellen (Weiss und Kim, 2007).

Die oral aufgenommenen Parasiten können die Epithelschicht des Darms überwinden und sich hämatogen im gesamten Organismus verbreiten. In der akuten Phase der Infektion besiedelt der Parasit die viszerale Organe wie die Lunge, die Leber und die Nieren (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000). Bevorzugt in immunprivilegierten Geweben wie Muskeln, Herz, Gehirn, Auge und Hoden kommt es später zu einer Transformation der PV in eine Bradyzoiten-enhaltende intrazelluläre Zyste (Stadienkonversion), was die chronische Phase der Infektion einleitet (Weiss und Kim, 2007). Diese intrazellulären, metabolisch inaktiven Zysten persistieren in immunkompetenten Wirten ein Leben lang (Frenkel, 1988), da sich der Parasit durch die stabile Zystenwand dem Immunsystem des Zwischenwirts entziehen kann bzw. toleriert wird (latente Toxoplasmeninfektion) (Dubremetz und Ferguson, 2009).

Sobald der Endwirt, die Katze, diese intrazellulären Gewebezysten, die sich in den Beutetieren wie z. B. Mäusen gebildet haben, aufnimmt, wird der Infektionszyklus von *T. gondii* fortgesetzt: Im Endwirt folgt die Lyse der Zystenwand durch proteolytische Enzyme im Magen sowie im Dünndarm. Die Bradyzoiten, die sich in der Gewebezyste befinden, dringen daraufhin in die Epithelzellen des Dünndarms oder in intra-epitheliale Lymphozyten ein, wo die asexuelle Replikation des Parasiten stattfindet, die sogenannte Schizogonie. Durch die darauffolgende, sogenannte Gametogonie entstehen sowohl weibliche als auch männliche

Gameten, deren Verschmelzung zu der Bildung einer diploiden unsporulierten Oozyste führt. Sobald die infizierte Epithelzelle in Folge der Parasitenvermehrung lysiert wird, gelangt die Oozyste in das Lumen des Dünndarms und wird schließlich über den Fäzes der Katze ausgeschieden (Dubey et al., 1970). Diese unsporulierte Oozyste entwickelt sich in Abhängigkeit von der Temperatur und der lokalen Sauerstoffkonzentration zu einer sporulierten hochinfektiösen Oozyste, die zwei Sporoblasten mit je vier Sporozoiten enthält (Hunter und Sibley, 2012). Der Status der Infektiosität der Oozyste kann in einem feuchten, tropischen Klima über einen Zeitraum von über einem Jahr erhalten bleiben (Frenkel et al., 1975). Die hochinfektiösen Oozysten können dann von den zahlreichen Zwischenwirten aufgenommen werden: Ein neuer Infektionszyklus wird initiiert (Abbildung 1.1).

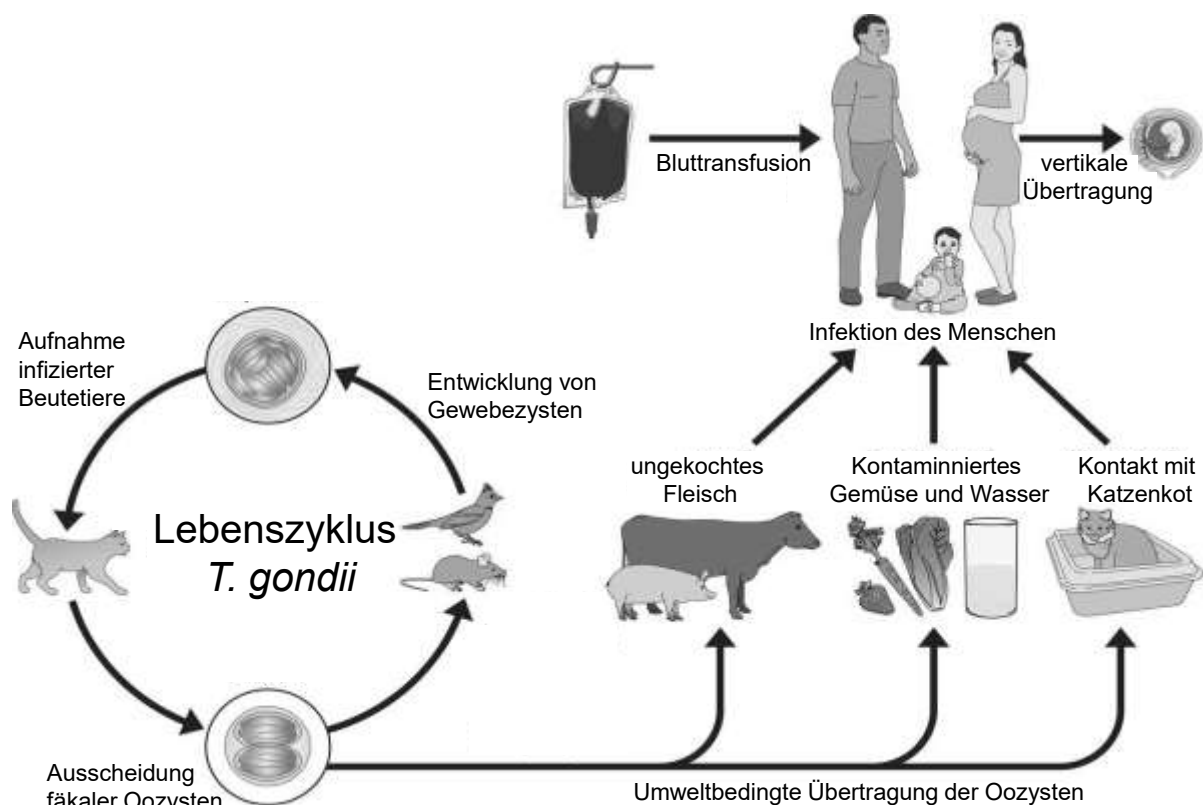


Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *T. gondii*. Abgebildet ist der Zyklus des Parasiten in seinem Endwirt, der Katze, und in einigen Zwischenwirten. Oozysten werden fäkal ausgeschieden und können von einem breiten Spektrum an Zwischenwirten aufgenommen werden. Dazu gehören Mäuse, Vögel, Schlachttiere und auch der Mensch. Durch die Bildung von Gewebezysten in den infizierten Beutetieren und der Aufnahme dieser Zwischenwirte durch die Katze schließt sich der Zyklus von *T. gondii* (modifiziert nach (Esch und Petersen, 2013)).

1.2. Symptome einer Toxoplasmeninfektion

Klinisch manifestierte Krankheitssymptome werden bei einer *T. gondii* Infektion recht selten beobachtet. Meist bleibt eine Toxoplasmose beim Menschen asymptomatisch (Frenkel und Dubey, 1972; Schlüter et al., 2014) und führt unter der Kontrolle des Immunsystems des Zwischenwirts zur Ausbildung langlebiger Zysten in immunprivilegierten Organen, wie z. B. dem Gehirn (Dubremetz und Ferguson, 2009). Es wird diskutiert, dass eine latente Toxoplasmeninfektion im zentralen Nervensystem (ZNS) das Verhalten des Menschen modulieren kann: Bei der Auslösung vieler psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen bzw. Persönlichkeitsstörungen könnte eine Infektion mit *T. gondii* ursächlich beteiligt sein (Hinze-Selch et al., 2010; Koseoglu et al., 2009; Miman et al., 2010a; Miman et al., 2010b; Pearce et al., 2012; Torrey et al., 2007; Yazar et al., 2003). Besonders gefährlich wird eine latente Infektion jedoch vor allem bei immunsupprimierten Menschen, z. B. bei Patienten mit einem erworbenen Immundefektsyndrom (AIDS: *acquired immune deficiency syndrome*) (Luft und Remington, 1992), da es zu einer endogenen Reaktivierung der Infektion und damit zu einer klinisch manifesten Erkrankung des Patienten kommen kann (Orefice et al., 1992): Schwerwiegende Erkrankungen wie Enzephalitis, Myokarditis oder auch eine interstitielle Pneumonie können durch eine Reaktivierung der Toxoplasmeninfektion ausgelöst werden (Eza und Lucas, 2006) und einen tödlichen Verlauf nehmen.

Bei einer bestehenden Schwangerschaft bringt die primäre mütterliche Toxoplasmeninfektion Risiken mit sich (McAuley, 2014). Die Übertragungswahrscheinlichkeit des Parasiten auf den Fötus steigt dabei mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft an, wobei die Schwere der Komplikationen, die für den Fötus entstehen können, im Zeitverlauf kontinuierlich sinkt (Desmonts und Couvreur, 1974). Die kongenitale Übertragung des Parasiten von der Mutter über die Plazenta auf den Fötus, kann schlimmstenfalls zu einem direkten Abort führen. Falls dies nicht geschieht, ist die Entstehung einer Enzephalitis mit späterem Hydrozephalus des Neugeborenen möglich (Desmonts und Couvreur, 1974). Auch intrazerebrale Verkalkungen mit einhergehender geistiger Retardierung können in Folge einer kongenitalen Übertragung entstehen (Weiss und Kim, 2007). Zusätzlich kann die konnatale, aber auch die postpartale Infektion eine Chorioretinitis, eine Entzündung der Netz- und Aderhaut, zur Folge haben (Holland, 1999).

1.3. Das Immunsystem

Um eingedrungene Mikroorganismen, wie *T. gondii*, zu bekämpfen, zu kontrollieren oder zu tolerieren, werden im humanen sowie im murinen System zuverlässige Mechanismen zur Detektion und Eliminierung von Pathogenen abgerufen. Dabei wird innerhalb der ersten 12 Stunden nach einer Infektion eine schnelle Immunantwort durch Mediatoren und Zellen des angeborenen Immunsystems ausgelöst. Zu der angeborenen Immunität gehören aber auch anatomische sowie physiologische Barrieren wie die Haut oder die Epithelien der Lunge und des Darms oder auch das saure Milieu des Magens. Schon allein diese mechanischen Hindernisse können die Invasion von Viren, Bakterien oder Parasiten einschränken. Können diese Barrieren die Ausbreitung der Pathogene jedoch nicht verhindern, nehmen verschiedene Zelltypen der angeborenen Immunität wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle bei der Beseitigung der Mikroorganismen ein: Anhand konservierter Strukturen auf der Pathogenoberfläche (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), die an keimbahnkodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) von Zellen binden, wird die Detektion von Mikroorganismen möglich. Durch diese Bindung erfolgt die Induktion der Sekretion inflammatorischer Zytokine, wodurch weitere Immunreaktionen ausgelöst werden. Zusätzlich werden Chemokine ausgeschüttet, die chemotaktisch z. B. auf dendritische Zellen sowie auf neutrophile und eosinophile Granulozyten wirken und somit die Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsherd auslösen (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010; Murphy, Travers und Walport, 2006).

Proteine im Serum, vor allem die des sogenannten Komplementsystems, sind wichtige Bestandteile der angeborenen humoralen Immunität: Beispielsweise können dem Komplementsystem angehörige Proteasen an eingedrungene Mikroorganismen binden und diese lysieren oder sie durch Opsonisierung für Phagozyten und Antigen präsentierende Zellen (APZ) kenntlich machen (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort verstärkt gleichzeitig eine weitere Immunreaktion, die durch Pathogen-spezifische Erkennungsmechanismen charakterisiert ist: Die sogenannte erworbene bzw. adaptive Immunität (Abbildung 1.2). Auch die erworbene Immunität kann in eine zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt werden. Die zelluläre Immunreaktion beinhaltet die Antigen-induzierte Differenzierung, Konditionierung und klonale Vermehrung von Lymphozyten zu Effektorzellen, während die humorale Immunantwort durch von B-Zellen produzierte, spezifische Antikörper gekennzeichnet ist. Die nach Antigen-Kontakt aktivierten B-Lymphozyten produzieren spezifische Antikörper, die an extrazelluläre Mikroben binden, sodass diese durch Komplementaktivierung bzw. verstärkte Phagozytose eliminiert werden können (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

Innerhalb der zellulären Immunität spielen T-Helferzellen (T_H -Zellen) und zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) eine besonders große Rolle bei der Beseitigung von Pathogenen: Antigen präsentierende Zellen, darunter fallen Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen, sind in der Lage fremde Antigene in Verbindung mit körpereigenen Haupthistokompatibilitätsantigenen vom Typ I bzw. II (*major histocompatibility complex*,

MHC) zu präsentieren. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an die über MHC präsentierten Fremdantigene, führt in Abhängigkeit von kostimulatorischen Signalen zur T-Zell-Aktivierung, -Differenzierung sowie zur klonalen Expansion der T-Zellen. Zu welchem Effektor-Zelltyp die T-Zellen letzten Endes differenzieren, ist abhängig vom lokalen Zytokinmilieu während einer Infektion.

Effektor-T-Zellen lassen sich in Untergruppen einteilen, die individuelle Zytokine produzieren und in solche die zytotoxische Effekte vermitteln. Dazu gehören z. B. CD4 positive T-Helferzellen wie T_H1 , T_H2 und T_H17 und die CD8 positiven zytotoxischen „Killerzellen“. Die Zellen der jeweiligen Untergruppe sind wiederum für die Entstehung eines individuellen Zytokinmilieus verantwortlich, welches unterschiedliche Effekte während der Immunantwort auslöst: Während die Effektorzellen vom T_H1 -Typ hauptsächlich Abwehrvorgänge gegen intrazelluläre Pathogene vermitteln und hauptsächlich $IFN\gamma$, IL-12 und $TNF\alpha$ sezernieren, produzieren T_H2 -Zellen besonders IL-10, IL-4 und IL-6 und sind insbesondere bei der Abwehr von Helminthen und bei allergischen Reaktionen von Bedeutung. Andererseits wirken diese T_H2 -Zytokine oft antiinflammatorisch und hemmen eine T_H1 -getriebene Immunantwort (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

Durch die Sekretion von IL-17 sind T_H17 Zellen vorrangig an der Abwehr von Bakterien beteiligt, wo sie für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind (Murphy, Travers und Walport, 2006).

CTLs sind vorrangig bei der Immunantwort gegen Viren wichtig und lysieren infizierte Zellen: Naive CTLs können über MHC I präsentierte Antigene, die zumeist endogenen Ursprungs sind, über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen. Zusätzliche kostimulatorische Signale der APZ führen daraufhin zur Aktivierung der CTL, die die Lyse der infizierten Zellen vermittelt ($CD8^+$ CTLs). Außerdem sezernieren CTLs $IFN\gamma$, was die weitere Aktivierung von Makrophagen ermöglicht und die Eliminierung der Pathogene fördert (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

Eine Infektion mit *T. gondii* resultiert stets in der Ausbildung einer starken T_H1 -Antwort (Gazzinelli et al., 1991; Hunter et al., 1992; Pifer und Yarovinsky, 2011). In den folgenden Kapiteln wird sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort, die durch die Infektion mit *T. gondii* ausgelöst wird, detailliert beschrieben.

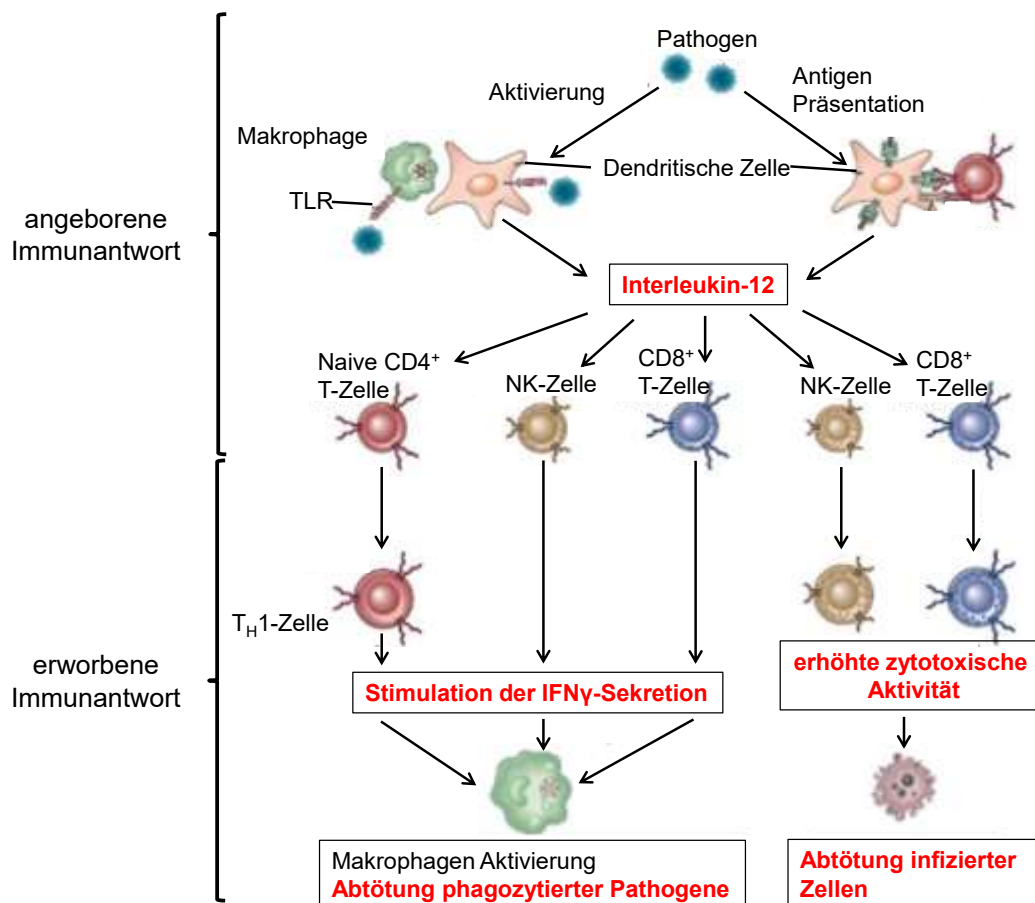


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene.

Nach Stimulation durch Mikroorganismen, wie z. B. *T. gondii*, oder Interaktion mit T-Zellen, sezernieren dendritische Zellen und Makrophagen Interleukin-12. Dadurch wird die Sekretion von IFN γ stimuliert und eine spezifische T_H1 Immunantwort begünstigt. Zusätzlich werden NK- und zytotoxische T-Zellen aktiviert, bei denen IFN γ eine Steigerung ihrer Zytotoxizität auslöst. Auf diese Weise wird die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen ermöglicht (modifiziert nach Abbas, Lichtmann und Pillai, 2010).

1.3.1. Das angeborene Immunsystem und die Detektion von *T. gondii*

Im Falle einer Infektion mit *T. gondii* spielen die anatomischen Barrieren bzw. das saure Milieu des Magens keine große Rolle, da die in der Zyste des Parasiten befindlichen Bradyzoiten das saure Milieu des Magens unbeschadet passieren und daraufhin problemlos in die Zellen des Dünndarms oder in intra-epitheliale Zellen einwandern können (Jacobs et al., 1960). Dort gewährleisten Immunzellen der angeborenen Immunität, vor allem residente Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten, eine rasche Abwehr gegen *T. gondii*: Die Detektion von *T. gondii* im murinen System wird über die Bindung von Profilin, einer Oberflächenstruktur des Parasiten, an die endosomalen Toll-like-Rezeptoren (TLR) 11 und TLR12 realisiert (Koblansky et al., 2013; Pifer und Yarovinsky, 2011; Plattner et al., 2008), die von dendritischen Zellen, aber auch anderen Zelltypen, exprimiert werden (Plattner et al., 2008). Zusätzlich kann auch über den TLR7 und den TLR9 RNS bzw. DNS des internalisierten Parasiten detektiert werden (Andrade et al., 2013). Neben der Erkennung über die endosomalen TLRs, ist auch die Detektion von Toxoplasma spezifischem

Glykosylphosphatidylinositol an den membranständigen TLR2 und TLR4 möglich (Debierre-Grockiego et al., 2007). Die Bindung von *T. gondii*-Strukturen an die TLRs führt zu der unerlässlichen Aktivierung der MyD88-abhängigen Signalkaskade (Sukhumavasi et al., 2008), die schließlich in der Ausschüttung proinflammatorischer Interleukine (IL), wie IL-1 β , IL-6 und IL-12, sowie in der Ausschüttung des Tumornekrosefaktors α (TNF α) resultiert (Chang et al., 1990; Hunter et al., 1995b). Durch die Ausschüttung von IL-12 wird insbesondere die Sekretion von IFN γ durch NK-Zellen und T-Zellen induziert (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

IFN γ und IL-12 sind als die wichtigsten Mediatoren der frühen angeborenen Immunantwort gegen *T. gondii* beschrieben (Hunter et al., 1995a; Suzuki et al., 1988). Dass vor allem der IFN γ /IL-12-Achse eine zentrale Rolle für die Bekämpfung der eingedrungenen Parasiten zugesprochen wird, zeigten Infektionsversuche im Mausmodell: Experimentelle Infektionen mit Zysten des *T. gondii* Typ 2 Stammes (ME49) bei IL-12 bzw. IFN γ (Scharton-Kersten et al., 1996) oder IFN γ -Rezeptor defizienten Tieren (Deckert-Schlüter et al., 1996), führten zu einer 100 prozentigen Mortalität dieser Tiere innerhalb der ersten 14 Tage der Infektion, während die wildtypische Kontrollgruppe überlebte. Weiterhin ist IL-18, das einerseits in Anwesenheit von IL-12 die IFN γ -Sekretion verstärkt und andererseits selbst proinflammatorische Effekte vermittelt, von Bedeutung, da die IL-12 vermittelte Produktion von IFN γ durch IL-18 verstärkt werden kann: Die Administration von exogenem IL-18 führt zu einer verbesserten Überlebensrate bei *T. gondii* (ME49) infizierten SCID Mäusen (*severe combined immunodeficiency*), die keine B- und T-Zellen besitzen. Die Verringerung der Verfügbarkeit von endogenem IL-18 durch neutralisierende Antikörper führt hingegen zu einer starken Verringerung des IFN γ -Spiegels. (Cai et al., 2000).

1.3.2. Das erworbene Immunsystem

Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort mit einhergehender Freisetzung inflammatorischer Zytokine beeinflusst die nachfolgende Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3).

Im Falle einer *T. gondii* Infektion entsteht in der Regel zunächst eine starke T_H1-getriebene Zellantwort (Pifer und Yarovinsky, 2011). Dabei unterstützt vor allem IL-12 die Differenzierung von naiven CD4⁺ T_H-Zellen zu aktivierten IFN γ -produzierenden T_H1-Zellen. Das sezernierte IFN γ ist essentiell für die Auslösung der in Kapitel 1.3.3. beschriebenen antiparasitären Effektormechanismen. Auch CD8⁺ Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen *T. gondii* (Abbildung 1.3). Diese Zellen können einerseits Toxoplasmen-infizierte Zellen lysieren und haben andererseits als Produzenten von IFN γ und IL-12 eine weitere wichtige Bedeutung bei der Eliminierung von *T. gondii* (Mashayekhi et al., 2011; Parker et al., 1991).

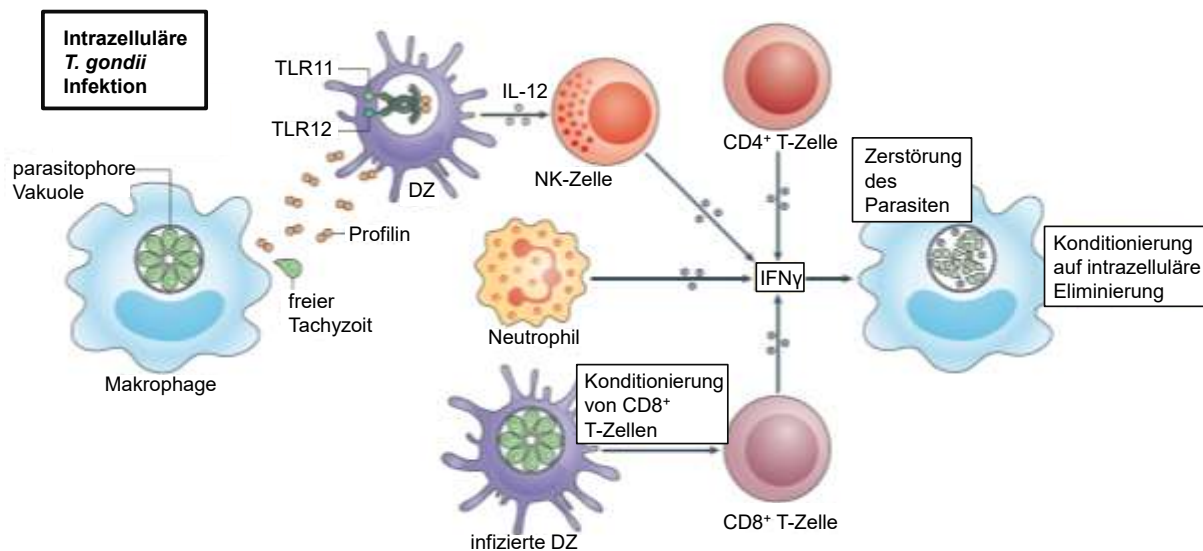


Abbildung 1.3: Immunreaktion nach *T. gondii* Infektion. Die IFN γ Sekretion ist entscheidend für die Kontrolle einer *T. gondii* Infektion. Die Produktion von IL-12 und IFN γ ist abhängig von der Erkennung von *T. gondii* Profilin durch dendritische Zellen (DZ) über TLR11 und TLR12 mit einer daraus resultierenden IL-12 Sekretion. IL-12 stimuliert weitere Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die daraufhin IFN γ sezernieren. Es folgt die Induktion antiparasitärer Effektormechanismen zur Eliminierung des Parasiten (modifiziert nach (Yarovinsky et al., 2005)).

Die Bedeutung der T-Zellen während der Toxoplasmose ist durch Immunisierungs-Experimente belegt. BALB/c Mäuse, die experimentell mit einem Temperatur-sensitiven Stamm von *T. gondii* (TS-4) immunisiert wurden, überleben erwartungsgemäß eine weitere, letale Infektion mit einem hoch virulenten Toxoplasmen Stamm (RH). Die Elimination von T-Zellen mit neutralisierenden anti CD4 und CD8 Antikörpern führt jedoch, innerhalb von 14 Tagen nach der Zweitinfektion, zu einer 100 prozentigen Mortalität der immunisierten Tiere. Die isolierte Elimination von CD4 bzw. CD8 positiven T-Zellen löste nur eine geringere Mortalität aus (Gazzinelli et al., 1992; Gazzinelli et al., 1991).

Eine Aktivierung von T_H1 Zellen ist mit der Entstehung starker Gewebsschädigungen durch die sezernierten proinflammatorischen Zytokine gekennzeichnet (Yap et al., 2006). Daher ist die Ausbildung von T_H2-Zellen bzw. regulatorischen T-Zellen für das Langzeit-Überleben nach Toxoplasmeninfektionen wichtig. T_H2-Zellen fördern durch Produktion von IL-4 die Aktivierung von B-Zellen, deren spezifische Antikörper-Produktion und deren Differenzierung zu Gedächtniszellen (Johnson und Sayles, 2002). Darüber hinaus hemmt IL-4 eine überschießende T_H1-Aktivierung. Zusätzlich kann das T_H2-Zytokin IL-10 weitere immunsuppressive Effekte auf T_H1-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen vermitteln und einer schädlichen Inflammation entgegenwirken (Alexander et al., 1997; Berger, 2000). Die Bedeutung der immunsuppressiven Wirkung von IL-10 wurde in Experimenten mit IL-10 defizienten Mäusen nachgewiesen. Diese Tiere waren nicht mehr in der Lage die proinflammatorische T_H1-Antwort zu hemmen, sodass die Mäuse während der akuten Phase der Toxoplasmeninfektion an einer überschießenden Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch hohe Konzentrationen an IFN γ , IL-12 und TNF α , verstarben (Gazzinelli et al., 1996).

Überdies können tolerogene dendritische Zellen die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen vermitteln. Dabei können diese tolerogenen dendritischen Zellen IL-10 bzw. TGFβ sezernieren. Aber auch eine Stimulation der CD4 positiven Zellen über eine Interaktion von CTLA4 mit CD80/86 auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, kann zu einer Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase mit nachfolgender Tryptophan-Verarmung bzw. Kynurenin-Produktion führen (siehe Kapitel 1.3.4.), wodurch die Entstehung von T_{regs} gefördert wird (Orabona und Grohmann, 2011; Puccetti und Grohmann, 2007). Dies stellt einen weiteren Mechanismus dar, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden.

1.3.3. IFNγ-vermittelte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*

Dass vor allem die IFNγ-Signalkaskade essentiell für die Ausbildung der Abwehr einer Toxoplasmeninfektion ist, zeigte sich bereits 1988: Mäuse, denen während einer Typ 2 Toxoplasmeninfektion neutralisierende monoklonale anti IFNγ-Antikörper injiziert wurden, starben an einer akuten Toxoplasmose (Suzuki et al., 1988). Zusätzlich zeigte sich in Experimenten mit IFNγ-Rezeptor defizienten Tieren, dass der IFNγ-Signalweg unerlässlich für die Ausbildung einer protektiven Immunantwort ist: IFNγ-Rezeptor^{-/-} Tiere verstarben in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion (Typ 2), während wildtypische Kontrolltiere überlebten (Deckert-Schlüter et al., 1996). Demnach ist vor allem die Sekretion von IFNγ für die Auslösung einer protektiven Immunantwort wichtig: Die Bindung von IFNγ an den IFNγ-Rezeptor stimuliert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), wodurch die Transkription von Genen induziert wird, die typischerweise Abwehrvorgänge verstärken (Boehm et al., 1997). Im Rahmen einer Toxoplasmeninfektion werden speziesabhängig unterschiedliche Effektormechanismen induziert (Abbildung 1.4):

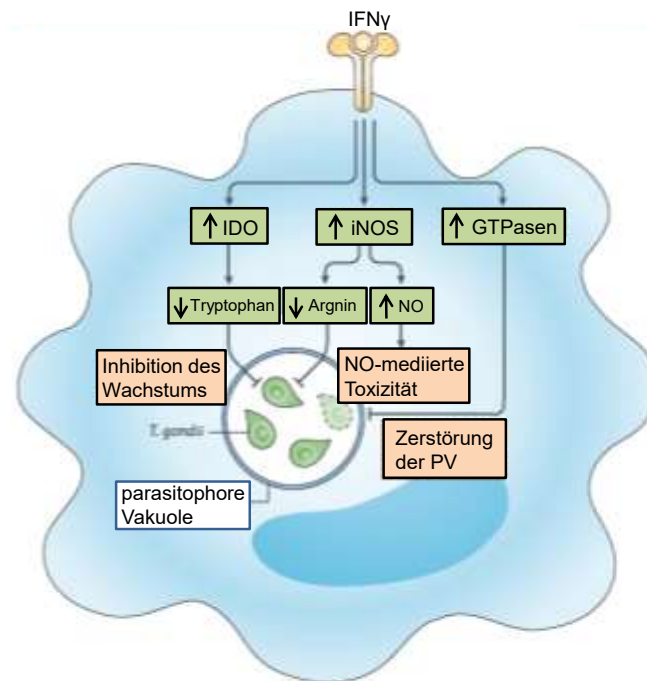


Abbildung 1.4: IFN γ -induzierte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*. Um den Parasiten zu bekämpfen, stehen Mechanismen zur Verfügung, die antiparasitäre Funktionen erfüllen. NO, das von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) produziert wird, wirkt toxisch auf *T. gondii*. Die Expression und Rekrutierung von Guanosintriphosphatasen zur parasitophoren Vakuole (PV) führt zu der Zerstörung der PV, sodass die freigesetzten Parasiten im Endolysosom der Zelle abgebaut werden. Die Degradation von Tryptophan via IDO führt zu einer Inhibition des Wachstums von *T. gondii* (modifiziert nach (Yarovinsky, 2014; Yarovinsky et al., 2005)).

Im murinen System sind vor allem Guanosintriphosphatasen (GTPasen) an der Immunabwehr gegen *T. gondii* beteiligt. Sie interagieren mit der parasitophoren Vakuole von *T. gondii* und vermitteln dadurch die Zerstörung des Parasiten. Es gibt zwei Haupttypen der GTPasen: Zum einen die *immunity related GTPasen* (IRGs) und zum anderen die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs). Es konnte gezeigt werden, dass GBP defiziente Mäuse (sechsfach *Knockout*) eine erhöhte Mortalität während der akuten sowie chronischen Phase einer *T. gondii* Infektion (Typ 2) aufweisen (Yamamoto et al., 2012). Auch IRG defiziente Tiere sind im Verlauf einer Toxoplasmeninfektion verglichen mit dem Wildtyp hoch suszeptibel (Khaminets et al., 2010; Liesenfeld et al., 2011).

Außerdem ist auch die Bildung von toxischen Stickoxiden durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ein Mechanismus zur Bekämpfung von *T. gondii* in der Maus. iNOS defiziente Tiere weisen während einer Typ 2 *T. gondii* Infektion eine hohe Mortalitätsrate in der späteren Phase der Infektion (Tag 21 - 25 *post infectionem* (p.i.)) auf (Silva et al., 2009). Sowohl die IRGs als auch die iNOS stellen im murinen System potente Abwehrmechanismen dar, die jedoch im humanen System eine untergeordnete Rolle spielen. Ein weiteres Protein, welches die Vermehrung von *T. gondii* negativ beeinflussen kann, ist die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). Dieses Enzym vermittelt durch seine Tryptophan degradierende Funktion antiparasitäre Effekte, die bisher ausschließlich *in vitro* in humanen Zellkultursystemen beschrieben sind (siehe Kapitel 1.3.4.). Die Übertragung der Ergebnisse, die im humanen System generiert wurden, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit *in vivo* im Mausmodell nicht bekannt, obwohl die Induktion der Genexpression der IDO durch eine

Toxoplasmeninfektion im Mausmodell beschrieben war (Notarangelo et al., 2014; Silva et al., 2002). Im folgenden Kapitel 1.3.4. werden die Funktionen und Eigenschaften der IDO detailliert beschrieben. Die konträren Daten zur antiparasitären Funktion der IDO in murinen und humanen Zellkultursystemen und die Unterschiede der murinen IDO-Expression *in vitro* und *in vivo* werden in Kapitel 1.6. zusammengefasst.

1.3.4. Die Tryptophan degradierende Indolamin 2,3-Dioxygenase

Bereits 1975 wurde beschrieben, dass die IDO eine hohe katalytische Aktivität gegenüber Tryptophan aufweist. Dabei setzt die IDO Tryptophan wesentlich besser um als andere Substrate (5-Hydroxytryptophan, Melatonin und Serotonin) (Hayaishi et al., 1975; Hirata et al., 1975; Shimizu et al., 1978). Die IDO ist ein etwa 43 kDa großes Monomer und enthält ein Häm-Molekül als prosthetische Gruppe, was bedeutet, dass ihre Aktivität sauerstoffabhängig ist. Die IDO wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern über Zytokine induziert: Vor allem IFN γ (Pfefferkorn, 1984) dient als einer der wichtigsten Stimulatoren der Tryptophan-Degradation *in vitro*. Durch IFN γ kann die Aktivität der IDO *in vitro* in nahezu allen humanen, kernhaltigen Zelltypen ausgelöst werden. *Ex vivo* Versuche mit murinen dendritischen Zellen zeigten außerdem, dass auch TGF- β die Expression der IDO induzieren kann (Pallotta et al., 2011). Neben diesen löslichen Faktoren können auch Oberflächenmoleküle wie CD40 (Hwu et al., 2000; Munn et al., 1999) oder CD80 und CD86 (Munn et al., 2004) nach Bindung an ihre Liganden eine IDO-Induktion auslösen, wie Experimente mit humanen Zellen zeigen.

Die IDO vermittelt eine sauerstoffabhängige Oxidation von Tryptophan, wodurch das sogenannte N-Formylkynurenin entsteht, welches über weitere enzymatische Reaktionen zu zahlreichen Metaboliten, die zusammengefasst als Kynurenine bezeichnet werden, verstoffwechselt werden kann. Diese Metabolite können renal eliminiert werden, sobald sie in zu hoher Konzentration vorhanden sind (Ball et al., 2007; Takikawa, 2005). Letztendlich entsteht innerhalb des Kynurenin-Stoffwechsels Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD $^{+}$) (Chen und Guillemin, 2009), das als wichtiges Koenzym für zahlreiche Redoxreaktionen, z. B. in der Atmungskette, benötigt wird (Löffler und Petrides, 1990) (Abbildung 1.5).

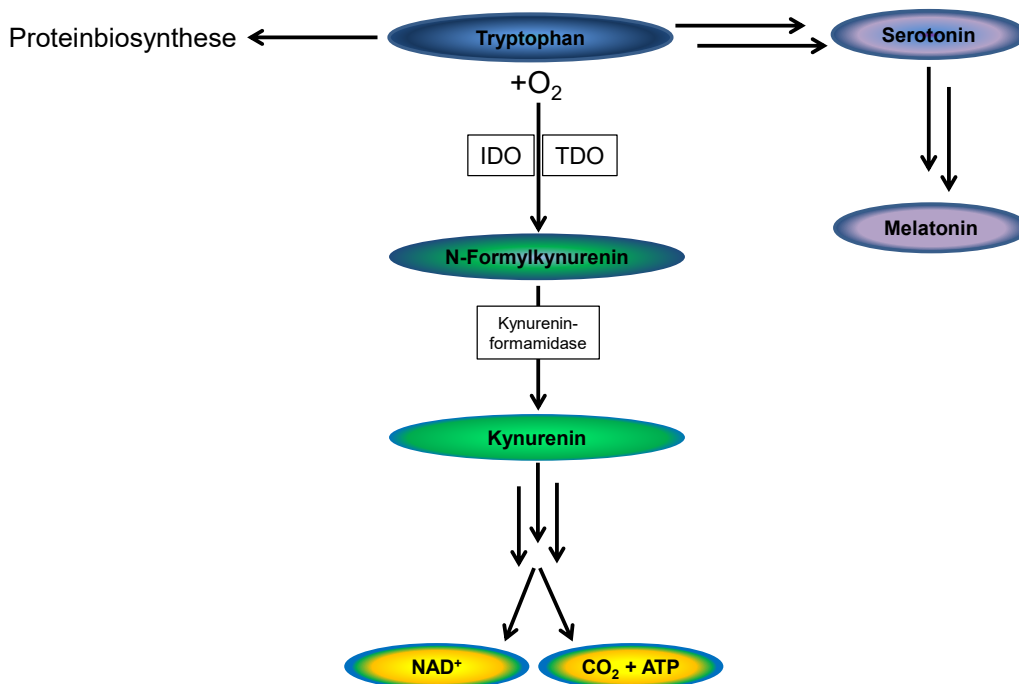


Abbildung 1.5: Tryptophan-Stoffwechsel. Tryptophan wird zu Serotonin und Melatonin verstoffwechselt. Die Oxidierung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin wird durch die IDO oder die TDO katalysiert. Es folgt die Hydrolyse von N-Formylkynurenin zu Kynurenin. Nach der Bildung weiterer Metabolite resultiert der Tryptophan-Stoffwechsel in der Bildung des energiereichen ATP und NAD⁺. Mehrere Pfeile bedeuten, dass dort mehrere Zwischenschritte ablaufen.

Sowohl Tryptophan als auch die Kynurenine nehmen eine wichtige Rolle innerhalb des Stoffwechsels ein: Tryptophan ist eine essentielle proteinogene Aminosäure, die über die Nahrung aufgenommen werden muss. Insbesondere in Fleisch, Milch, Nüssen, Eiern und Reis ist viel Tryptophan enthalten (Löffler und Petrides, 1990). Tryptophan ist ein Ausgangsstoff für die Synthese von Serotonin, auch 5-Hydroxytryptophan genannt (Cooper und Melcer, 1961), welches ein wichtiges Gewebshormon sowie ein relevanter Neurotransmitter ist und in viele metabolische Signalwege eingebunden wird (Arreola et al., 2015). Auch Melatonin, das eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Tag-Nacht-Rhythmus einnimmt, entsteht als Metabolit im Tryptophan-Stoffwechsel (Fukushige et al., 2014; Marczyński et al., 1964).

Eine besondere immunologische Bedeutung hat Tryptophan bei der T-Zell-Proliferation (Mellor et al., 2003b; Munn et al., 1999). Durch einen Mangel von Tryptophan wird ein Zellzyklus-Arrest von T-Zellen induziert. Die IDO-vermittelte Herabsetzung der lokalen Tryptophan-Konzentration resultiert in einem erhöhten Level an unbeladener tRNS in den T-Zellen, wodurch die Aktivierung der Aminosäuren-sensitiven „Stresskinase“ GCN2 (*general control non-depressible 2*) aktiviert wird. Dies führt letzten Endes zum Zellzyklus-Arrest und zum Proliferationsstop der T-Zellen (Munn et al., 1999; Munn et al., 2005). Bestätigend konnte die eigene Arbeitsgruppe *in vitro* zeigen, dass die Proliferation von humanen T-Zellen, durch die Supplementation mit Tryptophan, wieder hergestellt werden kann (Müller et al., 2009). Zusätzlich zu der IDO-vermittelten Tryptophan-Depletion, können die beim Tryptophan-Abbau entstehenden Kynurenine eine hemmende Wirkung auf T-Zellen (Fallarino et al.,

2003b; Frumento et al., 2002; Moffett und Namboodiri, 2003; Terness et al., 2002), NK-Zellen (Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002) und B-Zellen (Terness et al., 2002) (Abbildung 1.6) vermitteln, indem sie die Apoptose dieser Zellen induzieren.

Eine weitere immunsuppressive Wirkung der IDO-vermittelten Tryptophan-Degradation wurde in *ex vivo* Experimenten mit murinen dendritischen Zellen nachgewiesen. Diese Zellen exprimieren z. B. nach TGF- β -Stimulation die IDO und fördern die Ausbildung von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{regs}, die eine potente Immunsuppression vermitteln (Fallarino und Grohmann, 2011; Fallarino et al., 2003a; Sharma et al., 2007). Neben ihrer direkten inhibitorischen Wirkung auf T-Zellen, sind T_{regs} in der Lage die Expression der IDO in murinen dendritischen Zellen zu stimulieren (Fallarino et al., 2003a), indem sie über den Ko-Rezeptor CTLA4 direkt an CD80/86 der dendritischen Zelle binden (Grohmann et al., 2002; Mellor et al., 2003a). Über diesen positiven *Feedback*-Mechanismus wird die immunsuppressive Wirkung der T_{regs} potenziert (Fallarino et al., 2003a; Pallotta et al., 2011).

Um eine schnelle Immunabwehr gegen verschiedene Erreger zu vermitteln, gibt es, wie in 1.3.3 beschrieben, Mechanismen, die durch IFN γ induziert werden und gegen ein breites Spektrum von Pathogenen wirken. Dazu gehört auch die lokale Herabsetzung der Tryptophan-Konzentration, wodurch die Vermehrung und das Überleben von Tryptophan-auxotrophen Mikroorganismen, z. B. *T. gondii*, in humanen Zellkultursystemen inhibiert werden kann.

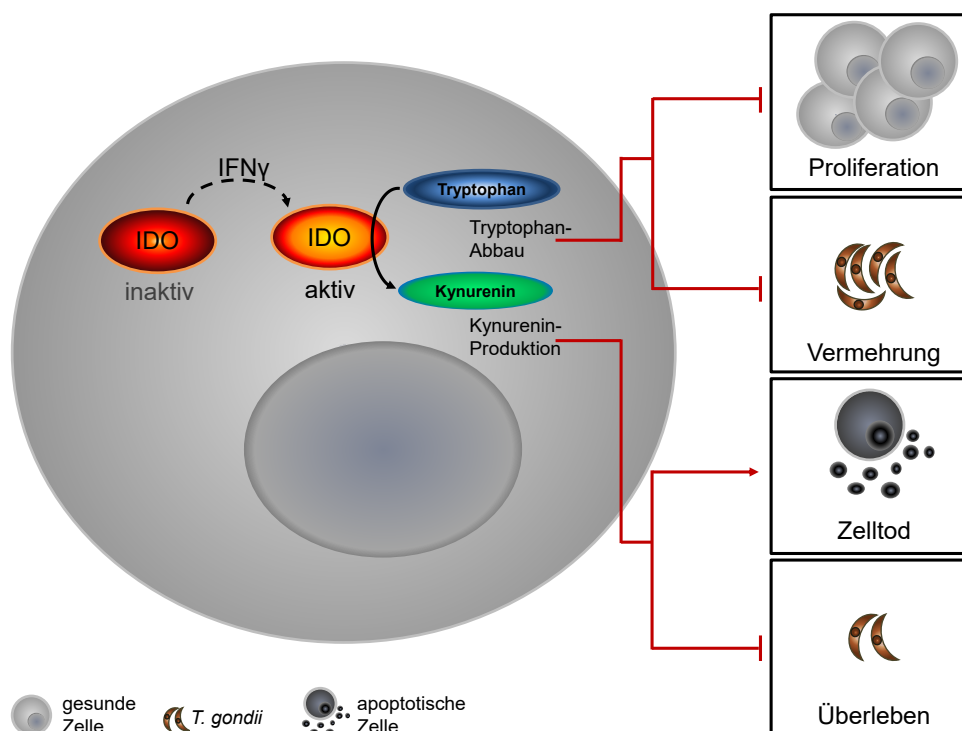


Abbildung 1.6: IDO-medierte Effekte im humanen System. Abgebildet ist die IFN γ -induzierte Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase in einer gesunden Zelle. Durch die Aktivität der IDO wird Tryptophan zu Kynurenin oxidiert bzw. hydrolysiert. Der Tryptophan-Abbau führt einerseits zur Inhibition der Zellproliferation. Zum anderen wird auch die Vermehrung des Parasiten gehemmt. Zusätzlich inhibiert das toxische Kynurenin das Wachstum von *T. gondii* und führt Zellen in den Zelltod.

Die Fähigkeit der IDO durch seine Tryptophan-Degradation das Wachstum von *T. gondii* zu inhibieren, wurde erstmals 1986 *in vitro* durch Daten von Pfefferkorn *et al.* gezeigt. In seinen Versuchen verwendete er humane Fibroblasten, die nach Stimulation mit rekombinantem IFN γ , eine Tryptophan-abhängige Hemmung des Wachstums von *T. gondii* vermittelten (Pfefferkorn *et al.*, 1986). Dieser Befund wurde in den folgenden Jahren mit weiteren humanen Zelllinien reproduziert. So wurde in humanen mesenchymalen Stammzellen (Meisel *et al.*, 2011), in humanen Lungenepithelzellen (Heseler *et al.*, 2008), in humanen mikrovaskulären Endothelzellen des ZNS (Däubener *et al.*, 2001) und auch in Astrozyten (Oberdörfer *et al.*, 2003) eine IDO-vermittelte Hemmung des Toxoplasmenwachstums in *in vitro* Systemen beschrieben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur *T. gondii*, sondern auch weitere Mikroorganismen durch die Tryptophan degradierende Wirkung der IDO in humanen Zellkultursystemen gehemmt werden können. Dazu gehören das Herpes simplex Virus (Adams *et al.*, 2004), das Masernvirus (Obojes *et al.*, 2005), Streptokokken der Gruppe B (MacKenzie *et al.*, 1999) und Chlamydien (Carlin *et al.*, 1989a).

Weitere Arbeiten belegen, dass nicht nur ein Tryptophan-Mangel das Wachstum von Mikroorganismen inhibiert, sondern dass auch einige Kynurenine direkt antiproliferativ auf Mikroorganismen, wie z. B. *Listeria monocytogenes*, wirken (Nino-Castro *et al.*, 2014).

In Säugetieren wird der Tryptophan-Abbau zu Kynurenin nicht nur über die induzierbare IDO vermittelt: Die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) und die Indolamin 2,3-Dioxygenase 2 (IDO2) sind ebenfalls Tryptophan degradierende Dioxygenasen (Ball *et al.*, 2014).

Die TDO wird hauptsächlich konstitutiv in der Leber exprimiert (Dang *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die TDO in geringem Umfang im zentralen Nervensystem (Haber *et al.*, 1993) und auch in Tumorzellen nachweisbar (Pilotte *et al.*, 2012). Die Hauptaufgabe der hepatischen TDO ist die Tryptophan-Homöostase. Dazu passt, dass die Tryptophan-Konzentration selbst die wichtigste Einflussgröße auf die Aktivität der TDO darstellt, wie Nakamura *et al.* zeigen konnten (Nakamura *et al.*, 1980). Eine Regulation durch das Immunsystem konnte für die TDO bisher nicht nachgewiesen werden.

Die IDO2 wird konstitutiv in der Leber, der Niere, dem Gehirn, in den Hoden, Nebenhoden und in der Plazenta exprimiert (Metz *et al.*, 2007) und besitzt eine deutlich schwächere Tryptophan metabolisierende Aktivität als die IDO. Trotzdem werden auch diesem Enzym, insbesondere im murinen Modell, immunregulatorische Funktionen zugeschrieben (Ball *et al.*, 2007). Zusätzlich konnten Metz *et al.* zeigen, dass stimulierte Makrophagen von IDO defizienten Tieren das Fehlen der IDO mit einer Hochregulation der IDO2 teilweise kompensieren können (Metz *et al.*, 2007; Metz *et al.*, 2014).

Es wird deutlich, dass die IDO nicht nur durch ihre Tryptophan degradierende Funktion die Proliferation von Zellen und Mikroorganismen (*in vitro*) inhibieren kann, sondern auch durch immunregulatorische Effekte eine große physiologische Bedeutung hat, die im folgenden Kapitel 1.4. dargestellt wird.

1.4. Immunregulatorische Funktion der IDO

Eine Bedeutung der IDO als immunregulatorisches Molekül wurde anfänglich von der Arbeitsgruppe Mellor und Munn im Modell einer allogenen Trächtigkeit bei Mäusen erkannt. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition der IDO mit 1-Methyl-Tryptophan (1-MT) zu einem Absterben allogener Foeten führte, während syngene Foeten durch eine Behandlung mit 1-MT nicht beeinflusst wurden (Munn et al., 1998). Damit war die Arbeitsgruppe von Mellor und Munn die Erste, die der schon lange bekannten IDO-Expression in der Plazenta (Kamimura et al., 1991), eine funktionelle Bedeutung bei der Toleranzentwicklung gegenüber foetalem Gewebe zuordnete.

Eine weitere, klinisch höchst interessante Beobachtung wurde von Uyttenhove et al. veröffentlicht. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass viele humane Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs das IDO-Protein exprimieren. Ferner konnte diese Arbeitsgruppe belegen, dass IDO-positive Tumorzellen die Anti-Tumor-Antwort inhibieren können (Uyttenhove et al., 2003). Ausgehend von diesem Befund erscheint es möglich IDO-Inhibitoren zu nutzen, um die Tumor-bedingte Blockade der T-Zellantwort aufzuheben. So zeigen Experimente einer anderen Arbeitsgruppe, dass z. B. die Administration des kompetitiven IDO-Inhibitors 1-MT in MMTV-Neu Mäusen (etabliertes Brustkrebs Modellsystem) zu einer Verringerung der Progression des Tumors führt (Muller et al., 2005). Ob es sich bei der Inhibition der Tumor-Progression um direkte Effekte des 1-MT auf die IDO-Aktivität oder um indirekte Effekte auf die Signalkaskade bei der T-Zell-Aktivierung handelt, ist unklar. Im therapeutischen Sinne scheint eine Kombination von klassischer Chemotherapie mit IDO-Inhibitoren im Tiermodell besonders effektiv zu sein (Löb et al., 2009a; Muller et al., 2005; Muller und Prendergast, 2005).

Die immunregulatorische Wirkung der IDO ist auch bei der Transplantation solider Organe von großer Bedeutung. So führt die pharmakologische Inhibition der IDO nach einer Lebertransplantation im Mausmodell zu einer verstärkten *Host-versus-Graft*-Reaktion (Miki et al., 2001). Befunde unserer Arbeitsgruppe belegen, dass eine infektionsbedingte IDO Inhibition durch das humane Zytomegalovirus (CMV) eine verstärkte T-Zellaktivierung auslöst (Heseler et al., 2013). Dies könnte die klinische Beobachtung erklären, dass eine aktive CMV Infektion z. B. nach einer Nierentransplantation, zu einer erhöhten Rate der Organabstoßung führt (Miki et al., 2001).

Auch bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation stellt die IDO-vermittelte Immunregulation eine wichtige Stellgröße dar. Das von IDO-positiven Monozyten produzierte Kynurenin löst eine Apoptose alloreaktiver T-Zellen aus (Hainz et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität in dendritischen Zellen und Monozyten von Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation negativ mit der Schwere der Abstoßungsreaktion korreliert. Je höher die IDO-Aktivität war, desto geringer fiel die Abstoßungsreaktion aus (Steckel et al., 2003). Dieser IDO-Effekt kann therapeutisch ausgenutzt werden: In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe IDO-positiver mesenchymaler Stammzellen (MSZ) geeignet ist, eine Steroid-resistente *Graft-versus-Host*-Reaktion einzudämmen (Le Blanc et al., 2008; Ringden et al., 2006).

Nicht nur bei Transplantationen, möglichen Abstoßungsreaktionen und bei Krebserkrankungen, sondern auch bei Autoimmunerkrankungen scheint die IDO eine Rolle zu spielen. Im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, zeigte sich im Verlauf der Erkrankung eine IDO-Aktivität in Makrophagen und Mikroglia-Zellen des zentralen Nervensystems. Die Administration des IDO-Inhibitors 1-MT führt in diesem Modell zu einer Erhöhung des Schweregrades der EAE. Somit hat die pathophysiologische Expression der IDO im ZNS eine protektive Rolle bei dieser Autoimmunerkrankung (Kwidzinski et al., 2005; Sakurai et al., 2002).

Es wird deutlich, dass die Aktivität der IDO bei zahlreichen Krankheitsbildern sowie bei der Schwangerschaft und bei der Toleranz gegenüber Transplantaten eine wichtige Rolle einnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit ist es von besonderem Interesse zu analysieren, ob die organspezifische Aktivität der IDO auch bei Infektionskrankheiten, wie der Toxoplasmose, immunregulatorische Effekte vermittelt.

1.5. Organspezifische Pathogenabwehr

Im Verlauf der akuten Toxoplasmose sind Leber und Lunge wichtige Zielorgane für Toxoplasmen (Derouin und Garin, 1991; McLeod et al., 1989; Silva et al., 2002; Silva et al., 2009), während viele gegen Toxoplasmen gerichtete Immunreaktionen in der Milz, die immunologisch relevante Zellen besitzt, mediiert werden (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010). Daher sollen in den folgenden Kapiteln anatomische Besonderheiten und organspezifische Immunantworten von Lunge, Milz und Leber dargestellt werden.

1.5.1. Die Lunge als Zielorgan während der Toxoplasmose

Die Lunge ist das Organ, in dem der Gasaustausch des Blutes stattfindet: Sauerstoff wird aufgenommen, während schädliches Kohlendioxid abgegeben wird. Durch die Aufnahme des Sauerstoffs liefert die Lunge einen wichtigen Baustein für die Gewinnung des energiereichen, universell verfügbaren Adenosintriphosphates (ATP) innerhalb der Atmungskette. Die gesamte Sauerstoff-Versorgung der Lunge wird über den sogenannten Bronchialbaum gewährleistet: Es gibt sowohl beim Menschen als auch in der Maus zwei Lungenflügel mit insgesamt fünf Lungenlappen, in denen sich bronchiale Hauptäste stets weiter verzweigen, sodass nach etwa 20 - 25 Teilungsschritten das weit verzweigte System des Bronchialbaums entsteht. Am Ende dieser Verzweigung befinden sich die dünnen alveolentragenden Endaufzweigungen (Lungenbläschen), in deren Wänden schließlich der Gasaustausch stattfindet. Die Lungenbläschen sind durch ein flaches Oberflächenepithel sowie ein kollagenreiches und elastisches Bindegewebe charakterisiert. In diesem Oberflächenepithel befinden sich Fibrozyten, alveolare Makrophagen und Pneumozyten vom Typ I und Typ II, die an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind (Fritsch und Kühnel, 2005; Lippert, Herbold und Lippert-Burmester, 2010; Welsch, 2002; Speckmann und Wittkowski, 1994).

Eine Infektion der Lunge, auch Pneumonie genannt, kann nach pathologischen Kriterien in drei Gruppen unterteilt werden: Während die klassische lobäre Pneumonie durch ein entzündliches Infiltrat innerhalb der Alveolen in einem Lungenlappen charakterisiert ist, weist die Broncho-Pneumonie einzelne Entzündungsherde in räumlicher Nähe zu den Bronchien in verschiedenen Lungenlappen auf. Eine interstitielle Pneumonie hingegen ist ausschließlich über entzündliche Veränderungen nahe der dünnen Alveolenwand gekennzeichnet (Fritsch und Kühnel, 2005; Lippert, Herbold und Lippert-Burmester, 2010; Welsch, 2002; Speckmann und Wittkowski, 1994). Die Toxoplasmen-Pneumonie verläuft beim Menschen als interstitielle Pneumonie (Pomeroy und Filice, 1992).

Silva et al. z. B. beschrieben, dass es im Verlauf der Toxoplasmose zu einer pulmonalen IDO-Induktion kommt, die mit einer Verringerung der Tryptophan-Konzentration und der Erhöhung der Kynurenin-Konzentration in der Lunge einhergeht (Silva et al., 2002). Auch die Gruppe von Hayashi et al. zeigt in einem anderen murinen Infektionsmodell mit *Mycobacterium avium* eine Rolle der IDO *in vivo*. Nach Stimulation mit immunstimulatorischen DNS-Sequenzen (ISS-ODN) kommt es in den Alveolarzellen zu einer

IDO-Induktion. Gleichzeitig führt die ISS-ODN-Injektion zu einer Inhibition des Wachstum von *Mycobacterium avium* im Lungengewebe (Hayashi et al., 2001).

Demnach ist es interessant, den Verlauf einer Toxoplasmose in der Lunge von WT und IDO defizienten Tieren detailliert zu untersuchen.

1.5.2. Immunologische Bedeutung der Milz im Rahmen der Toxoplasmose

Die stark durchblutete Milz gehört zu den sekundären lymphatischen Organen. Ihre Funktion ist die Filtration und Überwachung des Blutes: Bei einer hämatogenen Ausbreitung von Krankheitserregern ist die Milz ein zentrales Abwehrorgan. Jedoch hat die Milz keine lebensnotwendige Funktion. Ihre Aufgaben als lymphatisches Organ können im humanen System weitestgehend von anderen lymphatischen Organen übernommen werden (Lippert, Herbold und Lippert-Burmester, 2010; Murphy, Travers und Walport, 2006).

Anatomisch wird die Milz in die rote und weiße Pulpa eingeteilt. Die rote Pulpa macht etwa 80% der Milz aus und besteht überwiegend aus Blutgefäßen und residenten Makrophagen: In der roten Pulpa werden die alten, in ihrer Form veränderten oder durch Membran- oder Enzymdefekt geschädigten Erythrozyten bzw. Leukozyten durch residente Makrophagen abgebaut. Die weiße Pulpa hingegen ist eine Lymphozyten-reiche Region: Hier wird zwischen B- und T-Zell-Zonen differenziert. Aktivierte dendritische Zellen bzw. Makrophagen bringen Pathogen-spezifische Antigene in die weiße Pulpa ein. Dort findet daraufhin die Antigen-induzierte Aktivierung, Differenzierung und klonale Vermehrung von B- und T-Zellen statt (Abbas, Lichtman und Pillai, 2010).

In der Früh-Phase einer Toxoplasmose sind Parasiten in der Milz nachweisbar. Dabei ist die Parasiten-Last bei Immun-defizienten Tieren deutlich höher als in immunkompetenten (Silva et al., 2009). Daher ist es möglich, dass Milzzellen im Rahmen der Toxoplasmose antiparasitäre bzw. immunregulatorische Effekte vermitteln, die in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden sollen.

1.5.3. Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber ist ein zentrales, stark durchblutetes Organ mit essentiellen Aufgaben im Kohlenhydrat-, Protein- und Fett-Stoffwechsel. Ferner werden in der Leber, die mit der Nahrung aufgenommenen, aber auch im Körper selbst entstehenden, toxischen Stoffwechselprodukte abgebaut. Im Rahmen von Entzündungsprozessen erfolgt die intrahepatische Synthese von Akute-Phase-Proteinen, die während einer Infektion zur Abwehr der eingedrungenen Pathogene benötigt werden (Fritsch und Kühnel, 2009; Lippert, Herbold und Lippert-Burmester, 2010).

Der Blutfluss durch die Leber ist enorm: Jede Minute fließen 30% des gesamten Blutvolumens hindurch (Sheth und Bankey, 2001). Vor allem das venöse Blut aus der Pfortader, das aus dem Kapillargeflecht des Darms stammt, kann Pathogene und Pathogen-spezifische Antigene enthalten, die somit ins Lebergewebe eingeschwemmt werden. So erscheint es nicht überraschend, dass der Leber, zusätzlich zu ihrer Funktion als zentrales Stoffwechselorgan, auch innerhalb des Immunsystems eine entscheidende Rolle zugesprochen wird (Jenne und Kubes, 2013).

Die Leber besteht zu 80% aus Hepatozyten. Die restlichen 20% sind Nicht-Parenchym-Zellen, wie z. B. NK-Zellen, NK-T-Zellen sowie Kupffer'sche Sternzellen (residente Leber-Makrophagen). Diese Zellen können Mikroorganismen aufnehmen und eliminieren und sezernieren gleichzeitig Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 (Jenne und Kubes, 2013).

Die Bedeutung von Kupferzellen für Abwehrreaktionen ist daran erkennbar, dass die Depletion dieser Zellen bei einer Infektion mit einer subletalen Bakterien-Dosis (*Listeria monocytogenes* oder *Borrellia burgdorferi*) zu einer erhöhten Mortalität der Tiere führt (Ebe et al., 1999; Lee et al., 2010).

Im Rahmen von Infektionen wird häufig eine Apoptose oder Nekrose von Hepatozyten ausgelöst. Dadurch werden die gewöhnlich nur in Leberzellen vorkommenden Aminotransferasen freigesetzt und sind in erhöhter Menge im Blut nachweisbar. Damit korreliert die Konzentration von Aminotransferasen im Blut mit dem Schweregrad eines Leberschadens (Löffler und Petrides, 1990). Eine eindeutig leberspezifische Aminotransferase ist die Alanin-Aminotransferase (ALT, früher Glutamat-Pyruvat-Transaminase: GPT). Auch der Nachweis der Aspartat-Aminotransferase (AST, früher Glutamat-Oxalacetat-Transferase: GOT) im Serum kann auf eine Leberzellschädigung hindeuten. Dieses Enzym wird jedoch auch bei Schädigungen von Skelett- und Herzmuskelzellen freigesetzt und ist daher weniger leberspezifisch (Ceriotti et al., 2010; Haan et al., 1977).

Da die Leber während einer Toxoplasmeninfektion als Zielorgan des Parasiten beschrieben ist (Silva et al., 2002), besteht in diesem Organ die Möglichkeit, dass die Aktivität der konstitutiv exprimierten TDO bzw. der infektionsbedingt induzierten IDO-Aktivität antiparasitäre bzw. immunregulatorische Effekte vermittelt. Daher ist die Analyse der Toxoplasmose in TDO bzw. IDO defizienten Tieren von besonderem Interesse.

1.6. Humane IDO im Vergleich mit muriner IDO: Zielsetzung der Arbeit

Wie in Kapitel 1.3.4. beschrieben, ist die IDO-Expression in humanen Zellen ein bedeutsamer antimikrobieller Effektormechanismus gegen *T. gondii*.

Im Gegensatz dazu gibt es in der Literatur keine belastbare Information über IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte in murinen Zellen. Wieder war es die Forschergruppe um Pfefferkorn, die nach der Beschreibung der IFN γ -vermittelten Tryptophan-Degradation in humanen Fibroblasten (Pfefferkorn, 1984) Spezies-spezifische Unterschiede beschrieb: Nach Stimulation muriner Fibroblasten mit murinem rekombinantem IFN γ , konnte diese Gruppe keine antiparasitäre Wirkung der IDO nachweisen (Schwartzman et al., 1990). Auch in murinen MSZ ist die IDO-Expression *in vitro*, im Gegensatz zu humanen MSZ, nicht induzierbar (Meisel et al., 2011). Prinzipiell ist jedoch auch die murine IDO *in vitro* in der Lage das Wachstum von Toxoplasmen zu inhibieren. Das ergibt sich aus artifiziellen Experimenten von Habara-Ohkubo: Murine rektale Karzinomzellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das unter der Kontrolle des Promotors Methallothionein die murine IDO exprimiert. Diese Zellen wurden mit *T. gondii* infiziert, die Expression der IDO mittels Methallothionin induziert, woraufhin die Tryptophan degradierende Aktivität der IDO einen antiparasitären Effekt vermittelte (Habara-Ohkubo et al., 1993).

Die Literaturrecherche ergibt somit, dass die Ergebnisse der *in vitro* Analysen bezüglich der antiparasitären Effekte der IDO im humanen Zellkultursystem nicht auf das murine Zellkultursystem übertragbar sind. Im Gegensatz zu den negativen Befunden einer IDO-Induktion in murinen Zellkultursystemen, konnte jedoch bereits 1979 gezeigt werden, dass die Expression der murinen IDO *in vivo* induzierbar ist: Die intraperitoneale (*i.p.*) Infektion von Mäusen mit dem PR8 Influenza Virus (Yoshida et al., 1979) oder *i.p.* Stimulation mit bakteriellem Endotoxin (LPS) führte zu einer Expression des IDO-Proteins in der Lunge von Mäusen (Yoshida und Hayaishi, 1978). Weiterführende Analysen zur Aktivität der IDO wurden zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht durchgeführt. Dass die Ergebnisse der IDO-Induktion durch LPS oder dem Influenza Virus im Mausmodell auch auf eine Infektion mit *T. gondii* übertragbar sind, wurde 2002 gezeigt: Silva et al. konnten im Verlauf einer Toxoplasmose IDO mRNS, IDO-Protein und IDO-Aktivität in der Lunge infizierter Mäuse nachweisen (Silva et al., 2002).

Ein sicherer Nachweis der antiparasitären Wirkung der murinen IDO steht bis heute aus (Divanovic et al., 2012; Murakami et al., 2012). Kontrovers bleibt, dass IDO defiziente Tiere zwar keine erhöhte Mortalitätsrate während einer Toxoplasmeninfektion aufweisen, die Hemmung der IDO Aktivität in WT Tieren, durch Gabe des kompetitiven IDO-Inhibitors 1-MT, jedoch eine 100 prozentige Mortalität in der chronischen Phase der Toxoplasmeninfektion auslöst (Divanovic et al., 2012). Ob es sich bei der Erhöhung der Mortalitätsrate der Toxoplasmen-infizierten und 1-MT behandelten wildtypischen Mäuse um einen direkten Effekt des IDO-Inhibitors oder um indirekte Effekte des 1-MT auf die Immunstimulation handelt, bleibt jedoch in der Arbeit von Divanovic et al. unklar.

Zusammenfassend ist insbesondere die Expression der IDO im Lungengewebe während Toxoplasmeninfektionen gut belegt (Murakami et al., 2012; Silva et al., 2002). Jedoch gibt es keine Nachweise dafür, dass die IDO *in vivo* inhibitorisch auf die Vermehrung der Toxoplasmen wirkt. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung der antiparasitären Funktion des Enzyms und seiner Aktivität während der Toxoplasmose am Modell von WT und IDO defizienten Mäusen. Zur Abgrenzung zu den bisherigen Arbeiten wurden in der vorliegenden Arbeit schnell replizierende Tachyzoiten anstatt Zysten mit langsam replizierenden Bradyzoiten zur Infektion verwendet.

Um einen ersten Hinweis auf die Intensität der Immunantwort in WT und IDO^{-/-} Tieren während der *T. gondii* Infektion zu erhalten, wurden orientierende Serumanalysen auf proinflammatorische Zytokine durchgeführt. Des Weiteren wurden Western Blot Analysen angefertigt, um eine organspezifische, infektionsbedingte IDO-Expression zu detektieren. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen von Tryptophan und Kynurenin in Organ-Homogenisaten und im Serum infizierter Tiere mittels eigens etablierter Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) bestimmt, um die infektionsbedingte IDO Aktivität *in vivo* zu ermitteln. Überdies wurde durch quantifizierende Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (Echtzeit-PCR) analysiert, ob die Toxoplasmen-Last in den Organen der genetisch ungleichen Tiere variiert.

Zusätzlich wurde ermittelt, ob die IDO Defizienz einen Einfluss auf Immun-vermittelte Apoptose- und Nekrosevorgänge im Milz- und Leberparenchym infizierter Tiere hat. Ferner wurde analysiert, ob das Fehlen der IDO eine Auswirkung auf die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats während der interstitiellen Pneumonie hat.

Die Relevanz des IDO-Enzyms für den Gesamt-Organismus während der Toxoplasmose wurde mit Überlebensstudien überprüft, wobei gleichzeitig die Schwere der Infektion durch Bestimmung der infektionsbedingten Gewichtsreduktion in WT und IDO defizienten Tieren bestimmt wurde.

Als weitere Parameter zur Bestimmung der Relevanz der IDO als immunregulatorisches Molekül im Mausmodell, wurden Immunisierungs-Studien mit WT und IDO defizienten Tieren durchgeführt. Dazu wurden beide Mausstämmen zunächst mit einer subletalen Dosis mit Typ 2 Tachyzoiten immunisiert und die Tiere nach Abklingen der Krankheitssymptome mit einer üblicherweise letalen Menge mit Tachyzoiten des Typ 1 Stammes konfrontiert.

Mit Hilfe der hier beschriebenen Experimente sollte zum einen analysiert werden, ob die murine IDO durch ihre Tryptophan degradierende Funktion eine antiparasitäre Wirkung auf den Tryptophan-auxotrophen Parasiten *T. gondii* im Mausmodell ausübt. Zum anderen sollte erfasst werden, ob die immunmodulatorische Funktion der IDO einen Einfluss auf den Verlauf der Toxoplasmose hat.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/Enzym	Bezugsquelle
A cton	Merck, Darmstadt, D
Acetonitril Chromasol V®HPLC gradient grade	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Agarose	Lonza, Rockland, USA
B indepuffer 10x	BD Biosciences, Heidelberg, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
C ollagenase Typ VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
D API	Roche, Mannheim, D
Destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
DNase	Roche, Mannheim, D
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
E isessig	Merck, Darmstadt, D
Enhanced Chemiluminescence System (ECL)	GE Healthcare, Freiburg, D
Entellan™	Merck, Darmstadt, D
Entwickler-Lösung	AGFA, Leverkusen, D
Eosin G	Merck, Darmstadt, D
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt am Main, D
Essigsäure 96%	Merck, Darmstadt, D
Ethanol absolut	VWR chemicals, Langenfeld, D
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie AG, St. Gallen, CH
F ixierer-Lösung	AGFA, Leverkusen, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Lonza, Rockland, USA
G lycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
H ämatoxin	Merck, Darmstadt, D
IMDM Medium	Lonza, Rockland, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
KP-CryoCompound Einbettmedium	Klinipath BV, Duiven, NL
K ynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
M ercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol HPLC gradient grade	VWR international, Langenfeld, D
Milchpulver, entrahmt	Oxoid, Microbiology Products, Hampshire, UK
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
N atriumacetat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Nitro-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
O ligonukleotide	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
P hosphat gepufferte Saline (PBS), Pulver, Dulbecco	Merck, Darmstadt, D
PBS Dulbecco (steril)	life technologies, Darmstadt, D
Percoll®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polymerase (<i>high fidelity</i>)	Roche, Mannheim, D
Proteinase K	Roche, Mannheim, D

qPCR™ "Mastermix – no ROX"	Eurogentec, Köln, D
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Roti®-Histol (Xylol)	Roth, Karlsruhe, D
RPMI Medium	Lonza, Rockland, USA
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
Standard für <i>T. gondii</i> Analysen	Diagnostisches Institut für med. Mikrobiologie & Krankenhaushygiene, Düsseldorf, D
Tissue Tek™ Compound Einbettmedium	Sakura, Alphen aan Rijn, NL
Trichlor-Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypsin 0,05%	life technologies, Darmstadt, D
Tryptophan (L-)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D

2.1.2. Medien und Puffer

Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1% Agarose	1 g Agarose 10 µl Ethidiumbromid ad 100 ml 1x TAE-Puffer
1 x Bindepuffer	1 ml 10 x Bindepuffer 9 ml PBS
3-Nitro-Tyrosin-Lösung	1 g 3-Nitro-Tyrosin ad 100 ml PBS
5 x DNS-Ladepuffer	0,025 g Bromphenolblau 0,025 g Xylencyanol 25 ml 10 x TAE 25 ml Glycerin
5 x SDS-Probenpuffer	10% SDS 0,4 M Tris/HCl (pH 6,8) 25% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
20 x MOPS-Puffer (pH 7,7)	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1% SDS (w/v) 1 mM EDTA
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
Eosin-Lösung	180 ml H ₂ O 20 ml 1% Eosin G 400 µl Eisessig
Ethanol 70%	30% H ₂ O 70% Ethanol absolut
Ethanol 96%	4% H ₂ O 96% Ethanol absolut

FACS-Puffer	1x PBS 2% FCS 2 mM EDTA
Laird's Tail-Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 8,5) 5 mM EDTA, pH 8 0,2% SDS 200 mM NaCl
Natriumacetatpuffer (pH 4,2), entgast	4,1 g Natriumacetat ad 1 l dH ₂ O
NuPAGE® Transfer Puffer	50 ml NuPAGE® Transfer Puffer (20x) 200 ml Methanol 750 ml H ₂ O
Organ-Verdaupuffer	250 µl 100 mg/ml Collagenase 1,5 ml 3000 U/ml DNase I
Percoll 70%	70% Percoll-Lösung 30% RPMI Medium
Percoll 40%	40% Percoll-Lösung 60% RPMI Medium
STOP-Puffer	1% 1 x PBS 10 mM EDTA
TAE-Puffer (10x)	400 mM Tris 10 mM EDTA 400 mM Essigsäure
TE-Puffer	1 M Tris/HCl 0,5 M EDTA

2.1.3. Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad, München, D
Blottingkammer (<i>semi dry</i>)	Peqlab GmbH, Erlangen, D
Eismaschine SPR 165	Nordkap, München, D
Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR	Cawo, JH Technik, Ilbesheim, D
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, D
Feinwaage Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf, D
Gefrierschrank premium -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank economic-super -20 °C	Bosch, Giengen an der Brenz, D
Gefrierschrank Revco -80 °C	Welabo, Düsseldorf, D
Geldokumentationssystem: BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen, D
HPLC -System	Beckman Coulter, Krefeld, D
Inkubator Binder	Binder, Tuttlingen, D
Kamera zur Organ-Dokumentation	Nikon Coolpix, Düsseldorf, D
Kamera für Histologie Axiocam 105 color	Zeiss, Oberkochen, D
Kryotom (HM 650)	Thermo Scientific, Bonn, D
Kühlschrank economic cooler +4 °C	Bosch, Giengen an der Brenz, D
LiChrospher® 100 RP-18 (4-4, 5µm) Vorsäule	Merck, Darmstadt, D
Luminex xMAP™ Technology	Bio-Rad, München, D
Magnetrührer	Ikamag® RCT, Staufen, D
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, D
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowelle	Bosch, Giengen an der Brenz, D
Millipore-Anlage Milli-Q	Merck, Darmstadt, D

Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, D
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, D
Owl separation Systems	peqlab, Erlangen, D
pH-Messgerät MP 225	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Precellys Homogenisator	VWR International, Erlangen, D
Purospher Star RP-18 (55-4, 3 µm) Trennsäule	Merck, Darmstadt, D
Realtime-System CFX-96	Bio-Rad, München, D
Röntgenfilmkammer	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg,
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, D
Spannungsgeber peqPOWER 250	peqlab, Erlangen, D
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, München, D
Spannungsgeber Power Supply – EPS 301	GE healthcare, Freiburg, D
Spotchem EZ: SP-4430	Axonlab, Stuttgart, D
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Kehlheim, D
Thermal Cycler C1000™	Bio-Rad, München, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozykler PTC-200	MJ-Research (Bio-Rad), München, D
Ultraschallbad Branson 32	Branson, Hayward, USA
Vortex-Gerät	J&K IKA®-Labortechnik, Staufen, D
Waage Sartorius 1209 MP	Sartorius AG, Göttingen, D
XCell Dure Lock™	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Eppendorf mini spin	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Sorvall® RC-4	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge Universal 32-R	Hettich, Tuttlingen, D

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bindfaden Nylon 5/0 DSM13 USP	Resorba Medical GmbH, Nürnberg D
Chromatographiepapiere	Whatman, Dassel, D
Deckgläschen (24 x 60 mm)	Thermo Scientific, Bonn, D
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Flow™ Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS™ Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
Filter Millex® – GV 0,22 µm	Merck, Darmstadt, D
Gummideckel für Kurzgewindeflaschen	VWR international, Erlangen, D
Kanülen sterican® (divers)	Braun, Melsungen, D
Kurzgewindeflaschen mit Mikrotitereinsatz	VWR international, Erlangen, D
Mikrotomklingen	Thermo Scientific, Bonn, D
Nitrocellulosemembran Whatman™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NuPAGE 10% Bis-Tris Gele	life technologies, Darmstadt, D
Objektträger Super Frost	Thermo Scientific, Bonn, D
Plastikschlauch Jelco® aus I.V. Katheter (ø 0,9 mm)	Smiths Medical, Ashford, UK
Plastikwaren (divers)	NUNC, Wiesbaden, D
	Applied Biosystems, Darmstadt, D
	BD Biosciences, Heidelberg, D
	Eppendorf, Hamburg, D
	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Precellys Ceramic Kit 2,8 mm, 2 ml	Corning, Amsterdam, NL
Precellys Ceramic Kit 2,8 mm, 7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Probengefäß für Spotchem	Neolab, Heidelberg, D
Röntgenfilme Hyperfilm™ ECL	peqlab, Erlangen, D
Serum-Küvetten für Spotchem	peqlab, Erlangen, D
Siebgewebe MW = 70 & 100 µm	Akroy Inc., Amstelveen, NL
Teststreifen spotchem	GE healthcare, Freiburg, D
Tissue-Tek Cryomold® (Plastikschalen)	Akroy Inc., Amstelveen, NL
Zellsieb 40 µm	Neolab, Heidelberg, D
	Arkroy Inc., Amstelveen, NL
	Sakura, Alphen aan Rijn, NL
	BD Biosciences, Heidelberg, D

2.1.5. Antikörper für den Nachweise von Proteinen in Western Blot Analysen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kaninchen monoklonaler AK anti murin GBP2	Klaus Pfeffer, Düsseldorf, D
Kaninchen monoklonaler AK anti murin IRGa6	Gereon Schares, Greifswald, D
Kaninchen polyklonaler AK anti murin IDO	Merck, Darmstadt, D
Maus monoklonaler AK anti murin β-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ziege anti Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Jackson Laboratories, West Grove, USA
Ziege anti Maus Peroxidase gekoppelt	Jackson Laboratories, West Grove, USA

Alle Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,5% Milchpulverlösung für den Nachweis von Proteinen verwendet.

2.1.6. Antikörper und Proteine für durchflusszytometrische Analysen

Bezeichnung	Marker für	Bezugsquelle
Annexin V	Apoptosenachweis	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus B220	B-Zellen (spezifisch)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus CD11b	Makrophagen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Hamster anti-Maus CD11c	Dendritische Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus CD16/32	Blockierungs-AK	BioLegend, London, UK
Ratte anti Maus CD19	B-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Hamster anti Maus CD3ε	T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus CD4	CD4 T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus CD8α	CD8 T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Ratte anti Maus Gr1	Granulozyten	BD Biosciences, Heidelberg, D
Maus anti Maus NK1.1bio	NK-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Streptavidin	Biotinylierte AK	BD Biosciences, Heidelberg, D

Alle AK wurden 1:100 in FACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Annexin wurde 1:20 in FACS-Puffer verdünnt eingesetzt.

2.1.7. Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bezeichnung	Sequenz
<i>mido-forward</i>	5'-TGGAGCTGCCCCGACGC-3'
<i>mido-reverse</i>	5'-TACCCTCCGAGCCCAGACAC-3'
<i>neokassette-forward</i>	5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'
<i>neokassette-reverse</i>	5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'
Toxoplasmen- <i>forward</i> -Primer	5'-GCTAAAGGCGTCATTGCTGTT-3'
Toxoplasmen- <i>reverse</i> -Primer	5'-GGCGGAACCAACGGAAT-3'
Toxoplasmen-Sonde	5'-FAMATCGCAACGGAGTTCTTCCCAGACGTBHQ1-3'

2.1.8. Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Darmstadt, D
Mouse Cytokine Kit Array Panel A	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-1 ra Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse premixed Magnetic Assay/Multi-Plex	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse TIMP-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.9. Größenstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Ipswich, USA
See Blue® Plus 2 Prestained Standard	life technologies, Darmstadt, D

2.1.10. Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Humane Vorhautfibroblasten (HFF)	ATTC, Wesel, D

2.1.11. Parasiten

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Toxoplasma gondii</i> Typ 1, RH	ATTC, Wesel, D
<i>Toxoplasma gondii</i> Typ 2, ME49	ATTC, Wesel, D

2.1.12. Mausstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
C57BL/6 (wildtypische Mäuse, WT)	Janvier Labs, Saint Berthevin Cedex, F
Indolamin 2,3-Dioxygenase defiziente Mäuse (IDO ^{-/-}), C57BL/6 Hintergrund	Jackson Laboratories, Maine, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur Methoden

2.2.1.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen und Parasiten

Um die verwendeten Zellen und Parasiten dauerhaft aufzubewahren, wurden diese nach Entnahme aus ihren Zellkulturflaschen und Überführung in 50 ml Röhrchen durch Zentrifugation bei 1200 UpM (347 G) sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen und nach Überführung in Einfrierröhrchen bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt und hier gelagert.

2.2.1.2. Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden als Wirtszellen für die Parasiten verwendet. Die Zellen wurden in 25 cm² (5 ml Füllmenge) bzw. 165 cm² (20 – 30 ml Füllmenge) Zellkulturflaschen angezüchtet und in IMDM-Medium mit 10% FCS bei 37 °C und 10% CO₂ kultiviert. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, konnten sie für die Anzüchtung der Parasiten wie in Kapitel 2.2.1.3. beschrieben (25 cm² Zellkulturflaschen) oder für eine Expansion (165 cm² Zellkulturflaschen) verwendet werden.

Für die Expansion wurden die Zellen zuvor in der Zellkulturflasche mit PBS gespült und danach in 0,05% Trypsin inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nachdem die Zellen für 10 min bei 1200 UpM (347 G) sedimentiert wurden, wurde das Pellet in 10 – 20 ml Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:15 auf neue Flaschen verteilt.

2.2.1.3. Kultivierung von Parasiten

Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes Typ 1 (RH) und Typ 2 (ME49) wurden in HFF in IMDM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Dazu wurde eine voll bewachsene HFF-Zellkulturflasche mit 10⁶ Parasiten infiziert. Das Medium in der Zellkulturflasche wurde vor der Umsetzung der Parasiten gewechselt. Nach einer Vermehrungsdauer von drei bis vier Tagen, konnten die Parasiten geerntet und zur Vermehrung oder für Experimente verwendet werden.

2.2.2. Tierversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden gemäß §8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung der Versuche erfolgte durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen von der Bezirksregierung Düsseldorf (Projektnummer G271/13, Aktenzeichen 84-02.04.2013.A271).

2.2.2.1. Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT), Düsseldorf, unter sterilen Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen (IVC, 370 cm² Grundfläche, nie mehr als sechs Tiere pro Käfig) gehalten. Es wurde ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*.

2.2.2.2. Beobachtung der Versuchstiere

Nach erfolgter Infektion wurde der Zustand der Tiere täglich überprüft. Ihr Gewicht wurde täglich mittels Waage kontrolliert. Beim Eintreten definierter Abbruchkriterien (rapider, mehr als 20 prozentiger Gewichtsverlust, Apathie, struppiges Fell, geschlossene Augenlider, Ausbildung eines Buckels, abnorme Körperhaltung, Bewegungsunfähigkeit) wurden die entsprechenden Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen und durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.2.3. Mauslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden C57BL/6 (Wildtyp, WT) und genetisch veränderte, spezifisch-pathogenfreie Indolamin 2,3-Dioxygenase defiziente Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund (IDO^{-/-}) verwendet. Die Mäuse wurden im Alter von 7 – 9 Wochen in den Infektionsversuchen eingesetzt.

2.2.3. Infektionsbiologische Methoden

2.2.3.1. Präparation der Parasiten zur *in vivo* Infektion

Für die Toxoplasmeninfektion von Mäusen wurden frisch vermehrte *T. gondii* Tachyzoiten in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 600 UpM (87 G) zentrifugiert, um restliche Zellbestandteile zu sedimentieren. Die im Überstand befindlichen Parasiten wurden in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 3000 UpM (2167 G) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Anzahl der Parasiten mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach Versuchsansatz wurde die Parasitenkonzentration auf 5×10^3 , 5×10^4 oder 5×10^5 Parasiten pro ml PBS eingestellt, um 1×10^3 , 1×10^4 oder 1×10^5 Parasiten pro 200 µl zu injizieren. Die Proben wurden in 1 ml Spritzen überführt. WT und IDO^{-/-} Tiere wurden unter sterilen Bedingungen intraperitoneal (*i.p.*) unter Verwendung einer 26er x ½" Kanüle infiziert. Als Kontrolle wurden stets Mäuse mitgeführt, bei denen eine Schein-Infektion durch die Injektion von PBS erfolgte.

2.2.4. Entnahme von Untersuchungsmaterial

Zur Entnahme von Untersuchungsmaterial wurden die Mäuse zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Vorgehen der weiteren Entnahme ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.2.4.1. Gewinnung von Serum

Für die Serumanalyse erfolgte direkt nach zervikaler Dislokation die Abnahme des Blutes aus der Herzkammer. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht (ü. N.) bei 4 °C gelagert. Dann wurde die Probe bei 13000 UpM (5678 G) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und ein zweites Mal bei 13000 UpM (5678 G) zentrifugiert. Der Überstand bzw. das Serum wurde mit einer Pipette abgenommen, in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4.2. Organentnahme

Folgende Organe bzw. Gewebe wurden entnommen: Leber, Milz, und Lunge. Die Organe wurden in 15 ml Gefäße (Leber) oder in 2 ml Reaktionsgefäße (Lunge, Milz) überführt und ihr Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Die Größe der Milz wurde direkt nach der Entnahme zusätzlich photographisch festgehalten. Sofern die Organe nicht direkt weiterverarbeitet wurden, wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4.3. Homogenisation der Organe

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen und gleichzeitig die Menge an Tierversuchen zu reduzieren, wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht, aus *einem gesamten* Organ mehrere Fragestellungen zu beantworten (Abbildung 2.1). Die übliche Zerstückelung eines Organs in mehrere Teile bringt nämlich folgenden Nachteil mit sich: Die Expression und Konzentration von Proteinen, Zytokinen und Aminosäuren kann innerhalb eines Organs variieren, sodass falsch negative Ergebnisse bei der üblichen Teilung der Organe ermittelt werden können. Auch die Verteilung von *T. gondii* kann innerhalb eines Gewebes variieren. Um diese falsch negativen Ergebnisse ausschließen zu können, wurde die vollständige Homogenisation eines *gesamten* Organs durchgeführt. Zur Präparation wurden die jeweiligen Organe zuvor gewogen und in Homogenisations-Gefäße mit Keramik-Kugeln (Durchmesser 2,8 mm) überführt. Die Organe wurden mit dem dreifachen Volumen ihres Gewichts mit PBS versetzt (Beispiel: 160 mg Gewebe + 480 µl PBS). Die Proben wurden mit dem Precellys-Homogenisator durch 5000 Schüttelbewegungen pro Minute homogenisiert. Die Dauer der Homogenisation wurde je nach Gewebetyp (Lunge: 2 x 20 sek, Leber 1 x 20 sek) variiert. Dann wurden 10% des Homogenisats für die Bestimmung der Parasiten-Last abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Nach fünfminütiger Zentrifugation des restlichen Homogenisats bei 13000 UpM (5678 G) wurde der komplette Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Dieser Überstand wurde für proteinbiochemische Untersuchungen (HPLC, Western Blot, ELISA, Multi-Plex Analyse) der Organe verwendet. Das Pellet wurde verworfen.

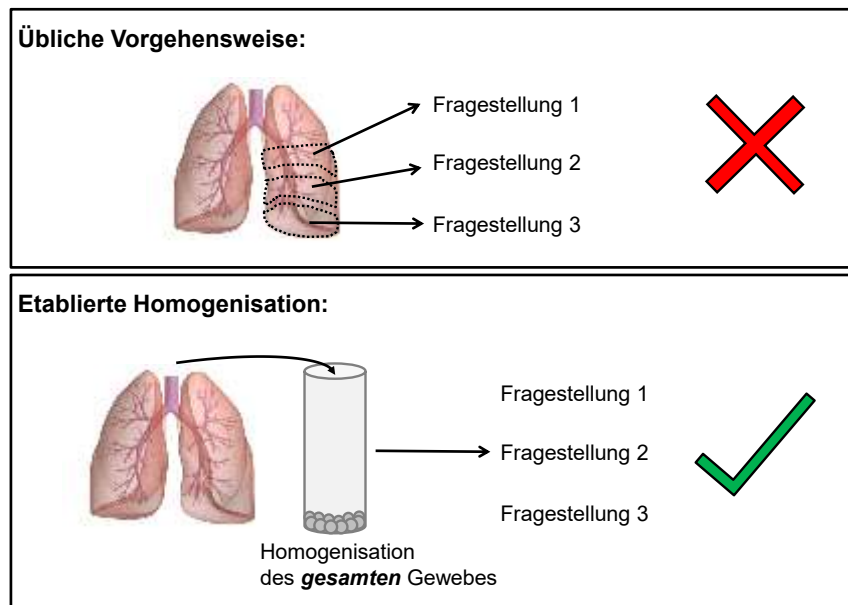


Abbildung 2.1: Darstellung der Homogenisation. Abgebildet ist die übliche (oberes Bild) und neu etablierte Vorgehensweise der Präparation eines Organs. Das untere Bild zeigt die etablierte Vorgehensweise, die eine zuverlässige und reproduzierbare Bearbeitung mehrerer Fragestellungen aus einem Organ erlaubt.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1. Etablierung des Messverfahrens der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ist eine Methode, bei der Substanzen analytisch aufgetrennt werden können. Zusätzlich erlaubt diese Methode die konkrete Identifizierung und Quantifizierung zahlreicher Substanzen. Die Proben mit der zu untersuchenden Substanz werden mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, über eine Trennsäule, der sogenannten stationären Phase, gepumpt. Das Trennvermögen ist dabei abhängig von den beiden verwendeten Phasen: Zum einen kann die Elutionskraft der mobilen Phase, die auf die Verweildauer der Substanzen in der stationären Phase wirkt, durch eine veränderte Zusammensetzung der gewählten Lösungen verstärkt oder vermindert werden. Dadurch wird der Elutionszeitpunkt der Substanzen beeinflusst und eine bestmögliche Auftrennung garantiert. Zusätzlich kann dadurch auch die Dauer eines Laufs optimiert werden. Zum anderen ist die korrekte Wahl der stationären Phase entscheidend für die Bearbeitung der jeweiligen Fragestellung und abhängig von den zu eluierenden Substanzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode etabliert, die es ermöglicht, Tryptophan und Kynurenin in Zellkultur-Überständen, Serum-Proben und Organ-Homogenisaten zu messen. Dazu wurde für die mobile Phase eine sogenannte Gradiententrennung verwendet. Bei der Gradiententrennung werden die prozentualen Anteile der Puffer der mobilen Phase (hier: Natrium-Acetat-Puffer und Acetonitril) kontinuierlich über die Zeit verändert, wodurch eine Verstärkung der Elutionskraft ausgelöst wird. Die prozentualen Anteile der Lösungen wurden über die Zeit, wie in Tabelle 2.1 angegeben, verändert:

Tabelle 2.1: Prozentualer Anteil verwendeter Puffer im Verlauf der HPLC zur chromatographischen Trennung von Tryptophan und Kynurenin. Die Tabelle zeigt die sogenannte Gradiententrennung zur Verstärkung der Elutionskraft der mobilen Phase. Die Erhöhung des Anteils von Acetonitril über die Zeit, führt zu einer, für diese Fragestellung, optimalen Elution der Substanzen von der stationären Phase.

Zeitpunkt des Laufs	Natriumacetat-Puffer (%)	Acetonitril (%)
1. min	97,3	2,7
2. min	97,3	2,7
3. min	94,6	5,4
4. min	91,9	8,1
5. min	89,2	10,8
6. min	10,0	90,0
7. min	10,0	90,0
8. - 10. min	97,3	2,7

Damit die Säule vor der nächsten Proben-Injektion wieder ins Gleichgewicht kommt, ist es unbedingt erforderlich auf eine Reäquilibrierungsphase (siehe Tabelle 2.1: 8. - 10. min) zu achten, die bei dieser Methode insgesamt 2 min betrug.

Als stationäre Phase wurde eine RP-18-Säule (Länge 55 mm, Innendurchmesser 4 mm), bestehend aus einem Kieselgel (Partikelgröße 3 µm), an deren Oberfläche C18-Ketten gekoppelt sind, verwendet. Durch diese C18-Kohlenwasserstoff-Ketten werden die verschiedenen durchlaufenden Substanzen unterschiedlich lange in der stationären Phase festgehalten. Zusätzlich zu der sich stetig verstärkenden Elutionskraft der mobilen Phase, findet auf diese Art die Trennung der Substanzen aus einem Gemisch statt. Die einzelnen Probenkomponenten werden daraufhin mittels UV-Detektor registriert und als Absorptions Units (AU) in einem Chromatogramm mit einzelnen Peaks je aufgetrennter Substanz ausgegeben. Die angegebene Fläche unterhalb dieser Peaks ist dabei proportional zu deren Konzentration. Mit Hilfe von Standards kann die entsprechende Substanz, hier Tryptophan bzw. Kynurenin, identifiziert und quantifiziert werden. Tryptophan konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 4,5 min bei einer Wellenlänge von 280 nm mittels UV-Detektor registriert werden. Der Elutionszeitpunkt von Kynurenin lag bei 2,3 min und konnte bei einer Wellenlänge von 360 nm detektiert werden. Um jeden einzelnen Lauf zu kontrollieren, wurde jeder Probe eine interne Kontrolle beigefügt. Diese Kontrollsubstanz war 3-Nitro-Tyrosin, hatte einen Elutionszeitpunkt von 3,5 min und konnte bei beiden gewählten Wellenlängen detektiert werden. Die Injektion der Proben lief vollautomatisiert über den Probengeber ab. Es wurde ein Probenvolumen von 30 µl injiziert. Nach jedem Lauf erfolgte ein Waschvorgang mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (250 µl, 1:2 verdünnt).

Da Luftblasen-Bildung in der HPLC stets zu vermeiden ist, wurden die selbst hergestellten Lösungen (Natriumacetat-Puffer und Methanol-Wasser-Gemisch) in einem Ultraschall-Bad entgast (10 min).

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software 32Karat™ 8.0.

2.2.5.2. Aufbereitung der Proben für die HPLC

Folgende Volumina wurden für die Quantifizierung von Tryptophan bzw. Kynurenin vereinigt:

Serum: 100 µl Serum	Organe: 200 µl Überstand des Organ-Homogenisats
100 µl TCA	50 µl TCA
25 µl interne Kontrolle	25 µl interne Kontrolle

Nach Zugabe aller Komponenten wurden die Proben für 10 min bei 13000 UpM (5678 G) zentrifugiert und der Überstand nach Filtration (0,22 µm Porengröße) in eine Kurzgewindeflasche mit integriertem Glas-Mikroeinsatz überführt. Daraufhin konnten die Proben automatisiert in das HPLC-System injiziert werden.

Als Standard diente Tryptophan bzw. Kynurenin in Konzentrationen von 0 – 15 µg/ml, gelöst in PBS.

2.2.5.3. Proteinbestimmung mittels BCA Protein-Assay

Die Proteinbestimmung wird durchgeführt, um identische Protein-Mengen in diversen Analysen einzusetzen und die Proben daraufhin untereinander zu vergleichen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den homogenisierten Proben erfolgte mittels BCATM Protein Assay Kit von Thermo Scientific und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5.4. Western Blot Analyse

Um Proteine darzustellen, die zuvor mittels SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran transferiert wurden, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei werden sechs Chromatographiepapiere (8 x 8 cm) in NuPAGE[®] Puffer getränkt und in eine Semi dry Blotting Kammer gelegt. Auf die Chromatographiepapiere wurde die Membran aus Nitrozellulose gelegt, es folgte das SDS-Gel und eine weitere drei-lagige Schicht aus Chromatographiepapieren. Die Blotting Kammer wurde geschlossen und eine Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche angelegt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran war nach 90 min abgeschlossen.

2.2.5.5. Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran können diese durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern und diversen Waschschritten nachgewiesen werden. Der Nachweis lief nach folgendem Protokoll ab (jede Lösung wurde in einem Volumen von 10 ml verwendet, Inkubationen bei RT):

- 60 min in 5% Milchpulver in PBS zum Blocken unspezifischer Bindestellen
- 60 min in spezifischen 1. Antikörpern (1:5000, 0,5% Milchpulverlösung in PBS)
- 3 x 10 min in PBS-Tween (1%) zum Waschen
- 45 min in HRP-gekoppelten 2. Antikörper (1:5000, 0,5% Milchpulverlösung in PBS)
- 3 x 10 min in PBS-Tween (1%) zum Waschen

Nach diesen Inkubationen auf dem Taumler, wurde die Membran 1 min lang in eine chemilumineszierende Lösung (ECL) gelegt und anschließend in eine Röntgenfilmkammer überführt. Um die Lichtemission detektieren zu können, wurden Röntgenfilme aufgelegt (3 sek – 10 min) und mit Hilfe der Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR entwickelt. Die entstandenen Banden wurden mittels Größenstandards verglichen und analysiert.

2.2.6. Enzymatische Methoden

2.2.6.1. Isolierung und Aufreinigung von DNS aus Gewebeproben

Die bei -20 °C in Reaktionsgefäßen gelagerten Aliquots der homogenisierten Organe wurden zur Bestimmung der Parasiten-Last aufgetaut. Zu jedem Aliquot wurden 5 µl Proteinase-K sowie 500 µl Laird's Tail-Puffer hinzugegeben und die Proben ü. N. bei 56 °C im Schüttler (800 UpM) inkubiert. Nach diesem Verdau wurden die Proben für 5 min bei 13000 UpM (5678 G) zentrifugiert, der ÜS in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Isopropanol hinzugefügt und das Reaktionsgefäß bis zum Ausfällen der DNS invertiert. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 13000 UpM (5678 G) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 UpM (5678 G) wurde der ÜS verworfen und das Pellet 5 – 15 min an der Luft getrocknet. Danach wurde die pelletierte DNS in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere wurden statt des Organ-Homogenisats 1 – 3 mm große Schwanzspitzenbiopsien verwendet und nach gleichem Protokoll verarbeitet.

2.2.6.2. Polymerase-Ketten-Reaktion zur Genotypisierung von Mäusen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde eingesetzt, um spezifische Bereiche von DNS-Fragmenten zu amplifizieren. Dies war bei der Genotypisierung der verwendeten Mauslinien nötig, da kontrolliert werden musste, ob die Zuchten homozygote *Knockout*-Tiere oder heterozygote bzw. homozygote Wildtyp-Tiere hervorgebracht hatten. Der typische Ansatz für die nachfolgende Genotypisierungs-PCR bestand aus spezifischen Oligonukleotiden (Primern), Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einer DNS-Polymerase:

2,5 µl DNS Template
100 pmol je Primer (*mido*, *neokassette*; je *forward* und *reverse*)
1 µl dNTPs
5 µl 5x *high fidelity* Puffer
3 µl Polymerase (*high fidelity*)
ad 50 µl H₂O

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte nach folgendem Programm:

Zyklus 1:	94 °C für 2 min	
Zyklus 2:	94 °C für 15 sek	} 30 x
	57 °C für 30 sek	
	72 °C für 60 sek	
Zyklus 3:	72 °C für 7 min	
	4 °C für ∞	

Nach Ablauf der PCR, die mit Hilfe des Thermozyklers PTC-200 ablief, wurden die Proben mit 5 x DNS-Ladepuffer versetzt und jeweils 20 µl der Proben in jeweils eine Tasche eines 1 prozentigen Agarosegels (mit 0,0001% Ethidiumbromid versetzt) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nach etwa 60 min konnten die nach ihrer Größe aufgetrennten PCR-Amplifikate mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden und nach der Geldokumentation mittels BioDocAnalyzer mit Hilfe eines Standardvergleichs identifiziert werden.

2.2.6.3. Quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der Parasiten-Last

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde verwendet, um die Parasiten-Last in verschiedenen Geweben zu detektieren und zu quantifizieren. Um die Anzahl der Parasiten in den Gewebeproben bestimmen zu können, wurde ein Standard verwendet, der eine definierte Menge an Kopien des Toxoplasmen-Gens *b1* enthält.

Der typische Ansatz für die nachfolgende qRT-PCR zur Bestimmung der Parasiten-Last setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl DNS (pur, Ausnahme: Leber 1:100 vorverdünnt in PBS)
 12,5 µl "qPCR® Mastermix - no ROX"
 (enthält Puffer, dNTPs, DNS-Polymerase,
 MgCl₂, Uracil-N-Glykosylase, Stabilisatoren)
 6 pmol je Primer (*reverse* und *forward*)
 2 pmol Sonde
 ad 25 µl mit dH₂O

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte nach folgendem Programm:

Zyklus 1:	50 °C für 2 min	
	95 °C für 10 min	
Zyklus 2:	95 °C für 15 sek	} 45 x
	60 °C für 1 min	
Zyklus 3:	4 °C für ∞	

Die Analyse wurde mit Hilfe des Realtime-Systems CFX-96 und der Software iQ5 durchgeführt.

2.2.6.4. Enzym-gekoppelter Immunoabsorptions Assay (ELISA)

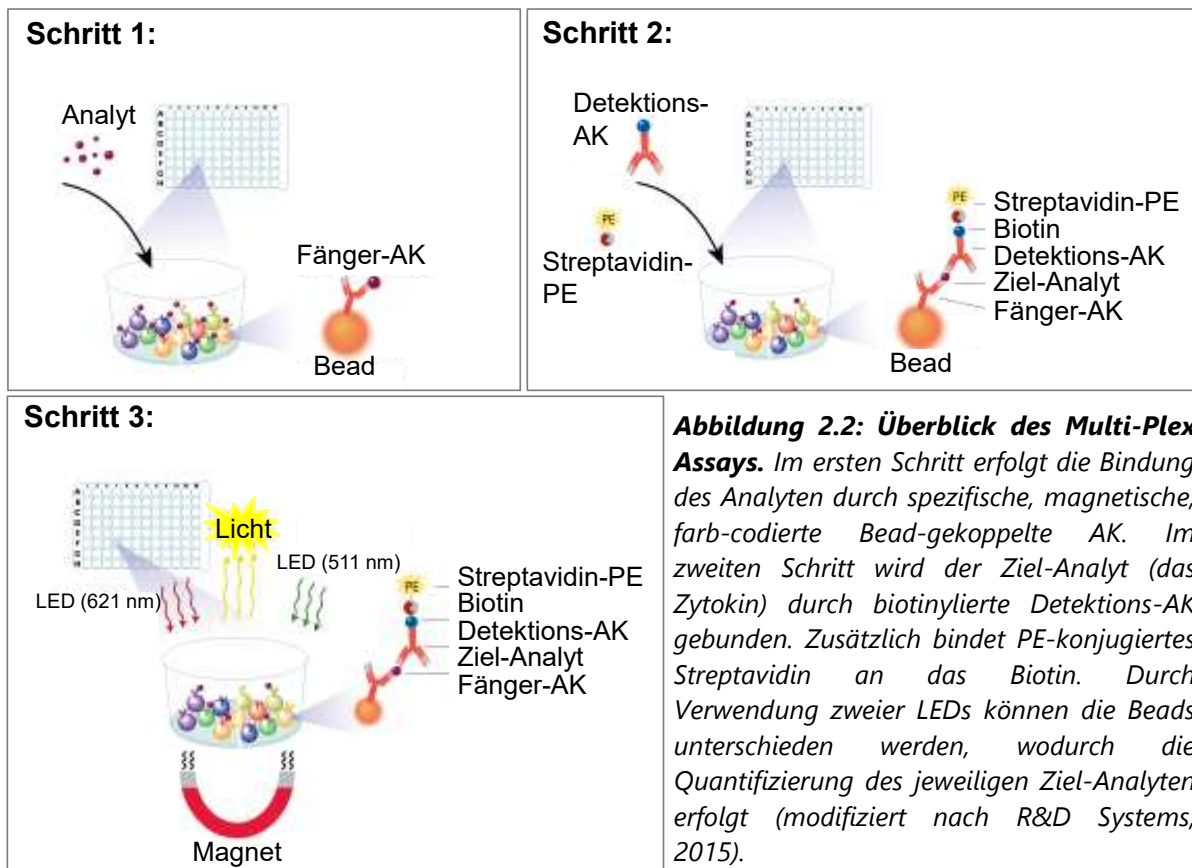
Zur quantitativen Bestimmung der Serum-Konzentration von IL-1 ra (Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist) und TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) wurden Quantikine ELISA Kits von R&D nach Herstellerangaben verwendet, die auf dem Prinzip der „Sandwich-ELISA-Technik“ beruhen. Dabei wird das zu analysierende Zytokin (Ziel-Antigen) durch einen Festphasen-gebundenen monoklonalen Antikörper immobilisiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Zugabe eines biotinylierten anti Zytokin Antikörpers und dessen Bindung an das Antigen. Es folgt die Konjugation der daraufhin zugegebenen Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase an das Biotin. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin eine enzymatische Farbreaktion. Diese wird mit H₂SO₄ abgestoppt und die Farbintensität mittels Photometer Sunrise bestimmt. Die spezifische Proteinkonzentration kann anhand mitgeführter Standards analysiert werden.

2.2.6.5. Membrangebundener Maus-Zytokin Array

Um einen groben Überblick über die Zytokin-Zusammensetzung im Serum zu erhalten, wurde das „Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit Panel A“ von R&D nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit dient einem *Screening* zahlreicher inflammatorischer Zytokine. Die Methodik beruht darauf, dass 40 verschiedene (in Dubletten angelegte) Fänger-Antikörper auf einer Nitrozellulosemembran fixiert sind. Die in den Proben befindlichen Zytokine binden während der Inkubationsphase an diese spezifischen Fänger-Antikörper. Bei Zugabe eines biotinylierten Detektions-Antikörpers und anschließender Zugabe der Meerrettich-Peroxidase, wird die Membran daraufhin in einem chemilumineszierenden Reagens inkubiert. Um die Lichtemission detektieren zu können, wurden Röntgenfilme aufgelegt (5 min). Mit Hilfe der Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR wurden die Röntgenfilme entwickelt.

2.2.6.6. Multi-Plex Analyse zur Bestimmung von Zytokinen in Serum und Gewebe

Die Methodik der hoch effizienten Multi-Plex Analyse ermöglicht es, mehrere Zytokine simultan in einer Probe zu quantifizieren. Zusätzlich ist dieser Assay bei geringen Proben-Volumina von großem Vorteil. Das Prinzip des Assays beruht auf der Verwendung verschiedener farb-codierter magnetischer Beads, an denen verschiedene Fänger-Antikörper vorfixiert werden. Die Zugabe der Probe führt zur Bindung des spezifischen Zytokins (Ziel-Analyten) an die jeweiligen Fänger-Antikörper. Nach Zugabe eines biotinylierten Detektions-Antikörpers erfolgt dessen Bindung an den Ziel-Analyten. Phycoerythrin (PE)-konjugiertes Streptavidin bindet daraufhin an den biotinylierten Detektions-Antikörper. Mit Hilfe des Bio-Plex Dual-Lasers können die Proben analysiert werden. Dabei beleuchten zwei Licht emittierende Dioden (LEDs) die Beads. Sowohl die Stärke des PE-abgeleiteten Signals, als auch die spezifische Farb-Codierung der Beads, werden mit Hilfe der LEDs ermittelt. Dadurch wird eine Unterscheidung der Beads mit gleichzeitiger Quantifizierung der Zytokine gewährleistet (Abbildung 2.2). Der „Mouse premixed Magnetic Assay/Multi-Plex“ von R&D wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Serum wurde pur verwendet, Überstände der Lungen-Homogenisate jeweils 20 µg Protein pro Ansatz). Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des Bio-Plex® 200 Systems und der Luminex xMAP™ Technology vorgenommen. Die weitere Auswertung erfolgte mittels der Software Bio-Plex Manager 6.0.



2.2.6.7. Analyse der Alanin-Amino-Transferase (ALT) und Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Serum

AST und ALT sind leberspezifische Transaminasen, deren Erhöhung im Serum eine Schädigung des Lebergewebes anzeigt. Für die Quantifizierung dieser Enzyme werden Reagenzstreifen verwendet, auf dem sich ein Testfeld befindet, welches sich bei Anwesenheit des Enzyms ALT bzw. AST je nach Konzentration mehr oder minder stark verfärbt. Die Farbreaktion wird mit Hilfe des Analyse-Geräts Spotchem 4430 quantifiziert.

Die Konzentration von ALT konnte direkt aus unverdünntem Serum ermittelt werden. Für die Messung von AST mussten die Serum-Proben infizierter Tiere 1:20 in PBS verdünnt werden.

2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Analyse der Expression diverser Oberflächenmoleküle einzelner Zellen. Dadurch wird eine quantitative und qualitative Charakterisierung von Zellpopulationen innerhalb eines Organs möglich. Das Prinzip beruht auf der Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an spezifische Oberflächenantigene. Die angefärbten Zellen können daraufhin mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysegeräte, eines Fluoreszenz aktivierten Zell Scanners (FACS), charakterisiert werden. Dabei durchläuft jede einzelne Zelle mehrere Laserstrahlen und löst je nach Größe und Granularität eine unterschiedliche Streuung der Strahlen aus. Weitere Detektoren halten zusätzlich die Fluoreszenz-Emissionen

der markierten Antikörper, die an entsprechende Zellen gebunden haben, fest. Auf diese Weise können mehrere Zellpopulationen gleichzeitig charakterisiert werden. Die Färbeprozedur ist abhängig vom jeweils zu analysierenden Gewebe und der Fragestellung.

2.2.7.1. Präparation der Milz mit anschließender Immunmarkierung und FACS-Analyse

Die Milzen wurden nach Entnahme in PBS gefüllten Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen gelagert. Nach Entnahme aller Milzen, wurde das PBS abgesaugt und 2 – 3 ml Organ-Verdaupuffer hinzugegeben. Die Milzen wurden mit Hilfe von Plastikspitzen in etwa 1 – 2 mm große Stücke zerrissen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde mit 2 – 3 ml STOP-Puffer abgeschlossen. Die Proben wurden resuspendiert und über ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße in je ein 50 ml Falcon überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 UpM (347 G) bei RT wurde der Überstand (ÜS) verworfen und das Pellet für 1 – 3 min mit 1 – 3 ml Erylyse-Puffer (je nach Größe des Pellets) inkubiert. Die Reaktion wurde mit STOP-Puffer beendet. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 UpM (347 G) und die Aufnahme der sedimentierten Zellen in 10 ml FACS-Puffer. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Methode (Färbung der Zellsuspension mit Trypanblau: tote Zellen sind blau gefärbt) unter dem Mikroskop bestimmt. Für die Analyse der Vitalität der B- und T-Zellen in der Milz wurden je 1×10^6 Zellen der jeweiligen Zellsuspension durch ein Siebgewebe in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1200 UpM (347 G) und 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl FCS-haltiger Blocklösung, welcher zusätzlich spezifische anti Fc (*fragment crystallisable*)-Rezeptor-Antikörper zugefügt wurden (anti CD16/32 = Isotypen-Kontrolle, 1:100 in FACS-Puffer), um unspezifische Bindestellen an Fc-Rezeptoren zu vermeiden. Die Zellen wurden daraufhin 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 25 µl der spezifischen, direkt markierten Antikörper (anti CD19 und anti CD3ε, jeweils 1:100 in FACS-Puffer). Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 4 °C im Dunkeln. Zum Waschen wurden 2 – 3 ml FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 1200 UpM (347 G), 4 °C). Dann wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend jeweils zentrifugiert (5 min, 1200 UpM (347 G), 4 °C). Nach dem letzten Waschschrift wurden die sedimentierten Zellen in 100 µl 1 x Bindepuffer aufgenommen, um die bevorstehende Bindung des Annexins an die Phosphatidylserine (Apoptosenachweis) zu optimieren. Es folgte die Zugabe von 5 µl DAPI (DNS-Färbung) bzw. Annexin (DAPI 1:10, Annexin 1:20, in FACS-Puffer) und die Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT. Dann wurden weitere 400 µl 1 x Bindepuffer hinzugefügt. Die Proben wurden innerhalb von 60 – 90 min mit dem FACS Canto II mittels FACS Canto DIVA Software analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels FlowJo Software. Die *Gating*-Strategie ist den Ergebnissen zu entnehmen.

2.2.7.2. Präparation der Lunge mit anschließender Immunmarkierung und FACS-Analyse

Die Lungen wurden nach Entnahme in PBS gefüllten Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen aufbewahrt. Das PBS wurde nach Entnahme aller Lungen abgesaugt und 2 – 3 ml Verdauopuffer hinzugegeben. Die Lungen wurden in etwa 1 – 2 mm große Stücke zerschnitten und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde mit 2 – 3 ml STOP-Puffer beendet. Die Proben wurden sorgfältig resuspendiert und die Suspension über ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon überführt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1200 UpM (347 G) und RT wurde der ÜS verworfen und das Pellet in 5 ml 40 prozentigem Percoll (verdünnt in RPMI-Medium) aufgenommen. Die Lösung wurde vorsichtig mit 2,5 ml 70 prozentigem Percoll (verdünnt in RPMI-Medium) unterschichtet. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 2000 UpM (896 G) bei RT *ohne* Bremse. Nach Trennung der Zellpopulationen durch das Percoll-basierte Dichtentrennverfahren, wurde der zellarme Überstand verworfen. Die in der Interphase befindliche Mischpopulation der Zellen, wurde sorgfältig von den pelletierten Erythrozyten separiert und in ein neues Röhrchen überführt. Die Suspension wurde mit FACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 1200 UpM (323 G), 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen, die gesamte Zellsuspension über ein Siebgewebe in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1200 UpM (323 G) und 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl FCS-haltiger Blocklösung, welcher zusätzlich spezifische anti Fc-Rezeptor-Antikörper zugefügt wurden (anti CD16/32 = Isotypen-Kontrolle, 1:100 in FACS-Puffer), um unspezifisches Binden an Fc-Rezeptoren zu vermeiden. Daraufhin erfolgte die Inkubation in spezifischen, direkt markierten Antikörpern (anti CD3ε, anti CD4, anti CD8α, anti CD19, anti Gr1, anti B220, anti CD11c, anti CD11b je 1:100 in FACS-Puffer, 10 min im Dunkeln bei 4 °C) bzw. in biotinylierten Antikörpern (anti NK1.1bio). Die Proben wurden dann mit 2 – 3 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1200 UpM (323 G), 4 °C). Danach folgte die Inkubation mit Streptavidin (10 min, 4 °C, im Dunkeln). Nach einem weiteren Waschschriff mit 2 – 3 ml FACS-Puffer und einer Zentrifugation (5 min, 1200 UpM (323 G), 4 °C), wurde das Pellet in DAPI enthaltendem FACS-Puffer aufgenommen (1:2000 in FACS-Puffer) und die Zellen mittels FACS Canto II und der FACS DIVA Software analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo Software. Die *Gating*-Strategie ist den Ergebnissen zu entnehmen.

2.2.8. Histologische Analysen

2.2.8.1. Anfertigung von Gefrierschnitten der Leber

Mit der Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung können morphologische bzw. strukturelle Veränderungen von Organen visualisiert werden. Bei dieser Färbung werden basophile Strukturen wie Zellkerne durch Hämatoxylin blau gefärbt. Kollagenreiche, zytoplasmatische Strukturen hingegen werden mit Hilfe von Eosin rötlich gefärbt.

Ein Lebersegment mit einer Oberfläche von etwa 2 cm² wurde in eine mit Einbettmedium gefüllte Plastischale überführt, komplett mit Einbettmedium überschichtet und sofort auf Trockeneis schockgefroren. Nach kompletter Gefrierung wurden die eingebetteten Leber-

Präparate bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte an einem Kryotom (Objekt-Temperatur: -15 °C, Mikrotom-Temperatur: -13 °C) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Bis zur Färbung (siehe Kapitel 2.2.8.3.) wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten der Lunge

Da die Lunge bei der Präparation der Experimentaltiere umgehend zusammenfällt und in dieser Form für histologische Untersuchungen nicht verwendbar ist, muss für die Anfertigung von Lungen-Schnitten eine behutsame und präzise Wiederherstellung des ursprünglichen Lungenvolumens gewährleistet werden. Dafür mussten die kollabierten Lungen der Tiere vorsichtig mit Einbettmedium gefüllt werden. Die Präparation verlief folgendermaßen: Der Thorax des Tieres wurde sachgemäß geöffnet, zudem wurde die Trachea vorsichtig freigelegt. Unter der Trachea hindurch wurde ein Bindfaden geführt und dieser zunächst zu einem lockeren Knoten zusammengebunden. Unterhalb dieses Knotens wurde ein etwa 1 mm großer Schnitt in die Trachea gesetzt. In diese Öffnung wurde ein flexibler Plastikschauch eingeführt, der an eine mit Einbettmedium (1:2 mit PBS) gefüllte Spritze gekoppelt war. Mit gleichmäßigem Druck und unter Vermeidung der Entstehung von Luftblasen, wurden etwa 2 – 3 ml des Einbettmediums in die Lunge injiziert. Der lockere Knoten oberhalb des Trachea-Einschnittes wurde mit dem gleichzeitigen Herausziehen des Plastikschauchs festgezogen, um das Herausfließen des Einbettmediums zu verhindern. Die so wieder entfaltete Lunge wurde daraufhin sorgfältig aus dem Thorax präpariert und in eine Plastikschaale überführt. Dort wurde sie mit Einbettmedium überschichtet und sofort auf Trockeneis schockgefroren. Nach vollständiger Gefrierung der Lunge, wurde diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die Schnitte wurden an einem Kryotom (Objekt-Temperatur: -15 °C, Mikrotom-Temperatur: -13 °C) in einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Bis zur Färbung (siehe Kapitel 2.2.8.3.) wurden diese bei -20 °C gelagert.

2.2.8.3. Prozedur der H&E-Färbung

Die Färbeprozedur erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 10 min Entwässern und Fixieren in eiskaltem Aceton
- 2 sek Waschen in dH₂O
- 10 min Färben in Hämatoxylin
- 2 sek Differenzieren in 70% Ethanol mit 1% HCl
- 10 min unter fließendem Leitungswasser bläuen
- 15 min Färben in Eosin-Lösung
- 2 sek Differenzieren in dH₂O
- 2 x 2 min Entwässern in 70% Ethanol
- 1 x 2 min Entwässern in 96% Ethanol
- 2 x 2 min Entwässern in 100% Ethanol
- 5 min in Xylol
- Sofortiges Eindeckeln mit Entellan
- Abdampfen über Nacht

Die photographischen Aufnahmen wurden an dem Mikroskop Axioskop 40 mit der Kamera Axiocam 105 erstellt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der ZEN Software.

3. Ergebnisse

Eine Infektion mit Tachyzoiten des Parasiten *Toxoplasma gondii* führt zu einer Entzündungsantwort im humanen und murinen System. Es wird eine Immunantwort ausgelöst, die den Parasiten bekämpfen bzw. seine Vermehrung kontrollieren soll. Der Tryptophan-auxotrophe Parasit *T. gondii* befällt in der frühen Phase der Infektion unterschiedlichste Gewebe, bis sich letztendlich –unter der Kontrolle des Immunsystems– Gewebezysten ausbilden. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelte Regulation der Tryptophan-Konzentration in den befallenen Geweben könnte hier antiparasitäre Effekte auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit wird anhand eines Mausmodells getestet, ob eine infektionsbedingte Regulation des Enzyms in Wildtyp (WT, C57BL/6) Tieren stattfindet. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden WT und IDO defiziente Tiere (mit C57BL/6 Hintergrund) mit dem moderat virulenten Typ 2 Toxoplasmen Stamm ME49 infiziert und der Verlauf der Infektion durch Überlebensanalysen in beiden Genotypen untersucht. In den einzelnen Kapiteln des ersten Ergebnisteils liegt das Augenmerk dabei primär auf Serum-, Milz-, Leber-, und Lungen-Analysen.

Der zweite Teil der Ergebnisse beschäftigt sich mit der Analyse der Relevanz der IDO, während einer Typ 1 Toxoplasmeninfektion, die sich für gewöhnlich durch eine 100 prozentige Mortalität infizierter Tiere auszeichnet. Mit Hilfe von Immunisierungs-Studien, wurde untersucht, ob die IDO für die Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses von Bedeutung ist

3.1. Infektionsbedingte Veränderungen des Zytokin-Spiegels im Serum von WT und IDO^{-/-} Mäusen

Um erste Hinweise auf mögliche Unterschiede zwischen WT und IDO^{-/-} Mäusen während einer Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten (ME49) zu ermitteln, wurden Untersuchungen des Serums bei infizierten bzw. bei uninfizierten Mäusen durchgeführt. Veränderungen von Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Chemokine sowie Akute-Phase-Proteine konnten mittels eines Dot Blot Arrays sichtbar gemacht werden. Dabei werden Serum-Proteine durch Bindung an spezifischen membrangebundenen Antikörpern fixiert und letztendlich über eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht.

Für diese Analyse wurde das Blut der Tiere an Tag 7, 9 und 11 *p.i.* aus dem Herzen entnommen und das Serum daraus gewonnen. Als Kontrolle dienten uninfizierte Mäuse (= vor Infektion). Um die Dot Blot Membranen möglichst effizient nutzen zu können, wurden die Serum-Proben von mehreren WT bzw. IDO defizienten Tieren je Versuchstag vereinigt. Die Präsenz bzw. Absenz schwarzer Dots auf den Membranen kennzeichnet eine semiquantitative Regulation der Entzündungsmediatoren im Vergleich mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle. In Abbildung 3.1 ist der Lageplan der jeweils paarig angelegten Dots dargestellt: Beispielsweise befinden sich im Bereich B8 paarige Dots für die Erkennung von IFN γ .

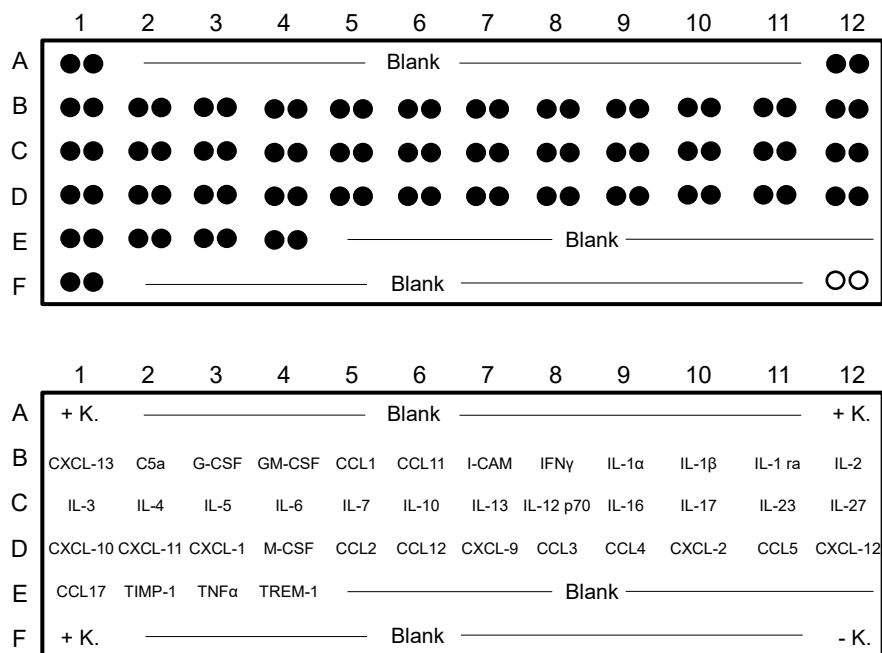


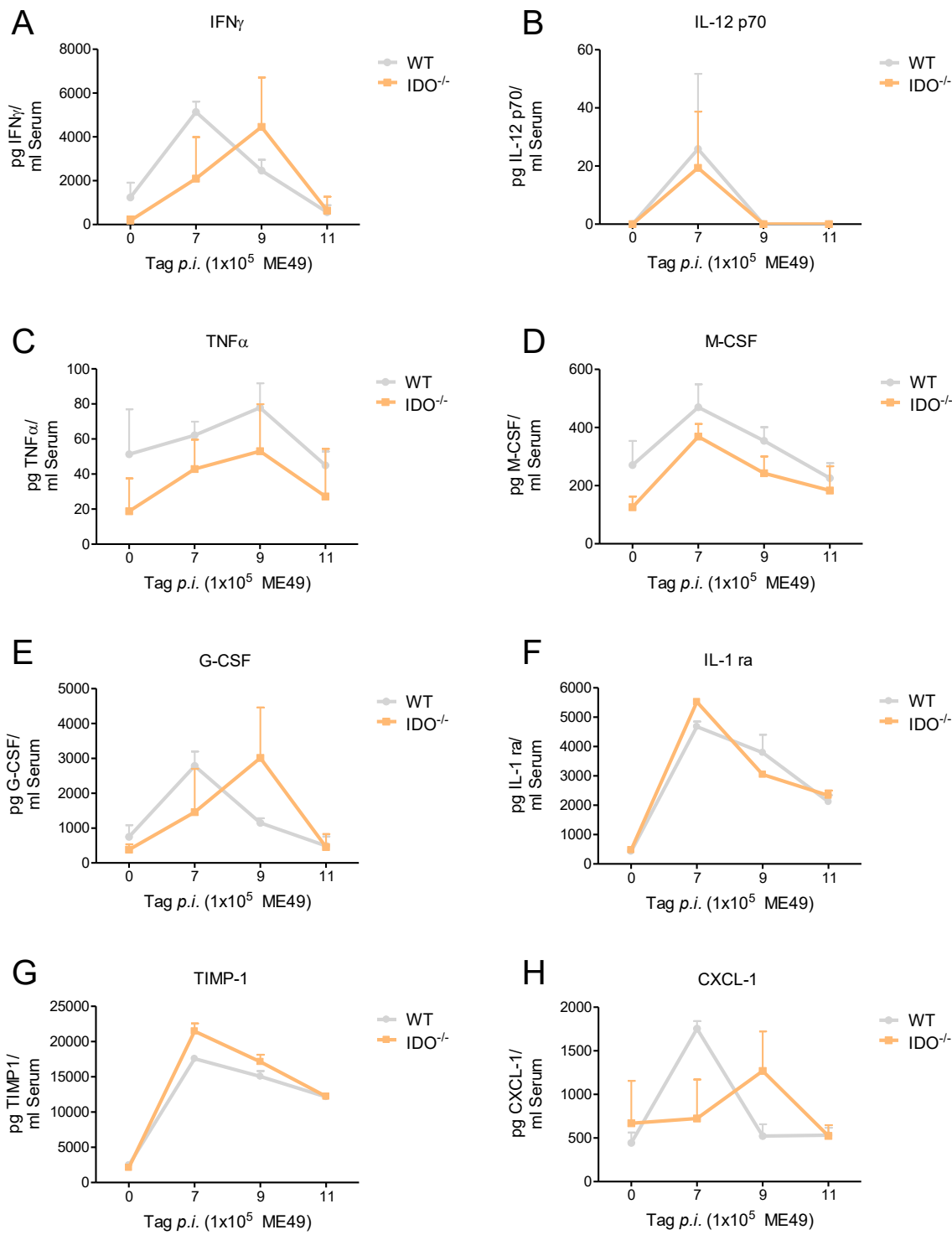
Abbildung 3.1: Lageplan der anti Zytokin Antikörper des Dot Blot Arrays. Es sind die im Folgenden analysierten Zytokine aufgelistet, die im Rahmen des Dot Blot Arrays als anti Zytokin Antikörper an der Membran vorfixiert waren. Jeder schwarze Dot steht für einen Bereich mit spezifischen anti Zytokin Antikörpern, die paarig angelegt sind. Es gibt drei Positivkontrollen (+K.) und eine Negativkontrolle (-K.), die sich an den äußeren Bereichen der Membran befinden. Einige Bereiche (Blank) sind nicht besetzt.

Abbildung 3.2 zeigt das Expressionsmuster der Serum-Analyse von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7, 9 und 11 Tage *p.i.* Die jeweils äußeren, paarigen Dots stellen Funktionskontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) für das verwendete Verfahren dar. Bei einer Infektion mit *T. gondii* verändert sich die Präsenz einiger Dots, was eine Veränderung der An- bzw. Abwesenheit einiger Serum-Zytokine bedeutet: Vor der Infektion sind nur wenige Dots erkennbar, jedoch ändert sich das Muster bereits an Tag 7 *p.i.* enorm. Das gleiche gilt in geringerem Umfang auch für die anderen beiden analysierten Tage *p.i.*



Abbildung 3.2: Dot Blot Zytokin Array aus Serumproben von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach intraperitonealer Infektion mit 10⁵ Tachyzoiten des Typ 2 Toxoplasmen Stammes ME49. Die grau hinterlegten Blots zeigen Ergebnisse mit Seren von Wildtyp-Mäusen, die apricot hinterlegten Blots wurden mit Seren von IDO^{-/-} Mäusen inkubiert und entwickelt. Die gewonnenen Seren von unterschiedlichen Mäusen wurden je Zeitpunkt für diese Analyse vereinigt, sodass die Dots eine durchschnittliche Expression angeben (WT: n = 9 für uninfizierte Mäuse, n = 7 für Tag 7 und 9 *p.i.*, n = 6 für Tag 11 *p.i.*; IDO^{-/-}: n = 8 für uninfizierte Mäuse, n = 7 für Tag 7 und 9 *p.i.*, n = 6 für Tag 11 *p.i.*).

Da sich anhand der Analyse der Entzündungsmediatoren mittels Dot Blot Array jedoch keine exakte quantitative Aussage treffen lässt, wurde eine Auswahl der am stärksten regulierten Zytokine, Chemokine bzw. Akute-Phase-Proteine getroffen und deren Konzentration mittels Multi-Plex Analyse (IFN γ , IL-12, M-CSF, TNF α , G-CSF, CXCL-1, CXCL-9, CXCL-10, CCL2) oder *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA, für IL-1 ra und TIMP-1) quantitativ bestimmt. Wie Abbildung 3.3 zeigt, sind die ausgewählten inflammatorischen Zytokine an Tag 7 und 9 *p.i.* sowohl im WT als auch in der IDO^{-/-} Maus hochreguliert. An Tag 11 *p.i.* liegt die Proteinkonzentration wieder im Normbereich von nicht infizierten Tieren. Tendenziell lässt sich bei einigen Zytokin-Analysen erkennen, dass das Maximum der Zytokin-Sekretion in WT Tieren an Tag 7 *p.i.* zu messen ist, während bei IDO^{-/-} Mäusen eine zwei tägige Verzögerung dieser maximalen Sekretion zu erkennen ist (Abbildung 3.3 A, E, H, J, K). IFN γ (Abbildung 3.3 A) steigt z. B. an Tag 7 *p.i.* bis zu 5138 ± 814 pg pro ml Serum in WT Mäusen an, wohingegen in Seren von IDO^{-/-} Mäusen die höchste Konzentration von IFN γ mit 4455 ± 3906 pg/ml erst an Tag 9 *p.i.* messbar ist. IL-12 p70 zeigt bei beiden Genotypen nur an Tag 7 *p.i.* eine erhöhte Konzentration von 25 ± 45 bzw. 19 ± 34 pg/ml (Abbildung 3.3 B). Für TNF α (Abbildung 3.3 C), M-CSF (Abbildung 3.3 D), G-CSF (Abbildung 3.3 E), CXCL-1 (Abbildung 3.3 H), CXCL-9 (Abbildung 3.3 I), CXCL-10 (Abbildung 3.3 J) und CCL2 (Abbildung 3.3 K) ergibt sich ebenfalls eine infektionsbedingte Erhöhung der Konzentrationen im Serum, die jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen aufweisen. Zytokine, bei denen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ermittelt werden konnten, sind IL-1 ra sowie TIMP-1 (Abbildung 3.3 F und G). Bei beiden konnte an Tag 7 *p.i.* in Seren von IDO^{-/-} Mäusen verglichen mit dem Serum von WT Mäusen eine höhere Konzentration ermittelt werden. An den anderen Messtagen ergaben sich hingegen keine signifikanten Unterschiede.



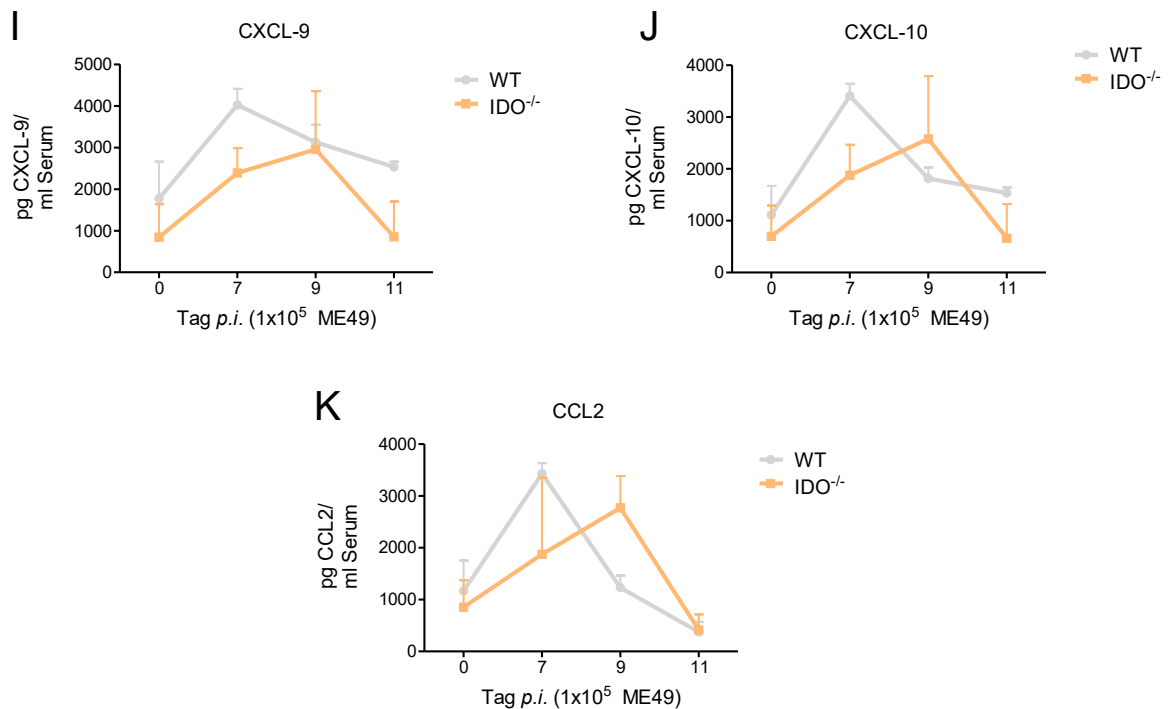


Abbildung 3.3: Multi-Plex Assay/ELISA differentiell regulierter Zytokine im Serum von Mäusen vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten. Die Grafiken zeigen den jeweiligen Mittelwert $\pm$ SEM der Konzentration des jeweils angegebenen Zytokins im Serum von WT (graue Linien) und IDO^{-/-} Mäusen (apricot) an. Grafik (A) zeigt die Konzentration des Zytokins IFN γ an. (B) IL-12 p70. (C) TNF α . (D) M-CSF. (E) G-CSF. (F) IL-1 ra. (G) TIMP-1. (H) CXCL-1. (I) CXCL-9. (J) CXCL-10. (K) CCL2. WT: n = 8 für uninfizierte Mäuse, n = 6 für Tag 7 und 11 p.i., n = 7 für Tag 9 p.i.; IDO^{-/-}: n = 7 für uninfizierte Mäuse und Tag 7 p.i., n = 6 für Tag 9 und 11 p.i.

3.2. Folgen einer IDO-Aktivität auf den Tryptophan- bzw. Kynurenin-Spiegel im Serum

Um zu ermitteln, ob die Infektion und die damit verbundene Regulation der zuvor analysierten Zytokine (z. B. IFN γ oder IL-12) in WT Mäusen zu einer systemisch wirksamen Expression der IDO führen kann, wurde die Konzentration von Tryptophan als Edukt sowie die Konzentration von Kynurenin als Produkt der enzymatischen Aktivität im Serum dieser Tiere mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ermittelt. Die Messung wurde mit Seren von Mäusen beider Genotypen durchgeführt. Es wurden uninfizierte Kontrolltiere (Tag 0 p.i.) sowie Tiere 7, 9, 11 und 60 Tage nach erfolgter *T. gondii* Infektion für die Analyse verwendet.

Abbildung 3.4 zeigt ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung im Serum einer WT Maus vor der Infektion (schwarze Linie) sowie an Tag 7 p.i. (hellblaue Linie). Anhand eines Standardvergleichs konnte der Elutionszeitpunkt von Tryptophan in Vorversuchen bei 4,5 Minuten festgelegt werden. Zu erkennen ist, dass der Tryptophan-Peak des uninfizierten WT höher ist, als der des infizierten WT. Somit konnte im Serum einer infizierten WT Maus eine verringerte Tryptophan-Konzentration ermittelt werden.

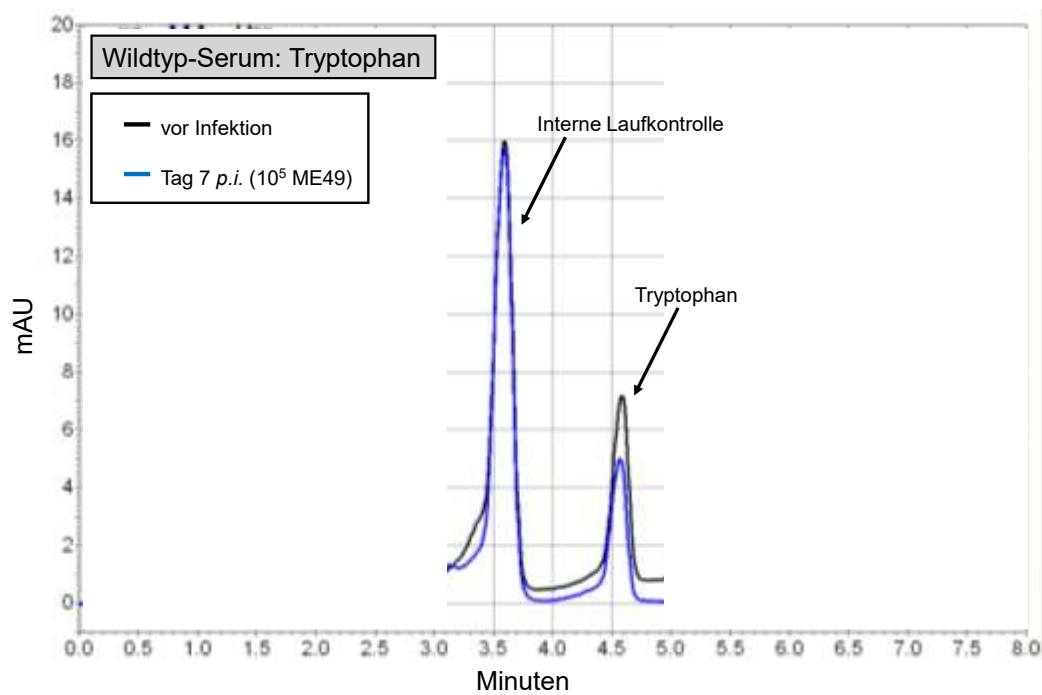


Abbildung 3.4: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung im Serum einer WT Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 Tachyzoiten (hellblaue Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Tryptophan-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 4,5 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

Um zu überprüfen, ob auch Kynurenin entstanden ist, was hinweisend für eine infektionsbedingte, systemisch wirksame IDO Aktivität in WT Mäusen wäre, wurde das Serum zusätzlich auf die Präsenz von Kynurenin untersucht. Dabei zeigt Abbildung 3.5 ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm von Kynurenin aus dem Serum einer WT Maus vor der Infektion (schwarze Linie) sowie an Tag 7 p.i. (hellgrüne Linie). Auch hier konnte anhand eines Standardvergleichs der Elutionszeitpunkt von Kynurenin in Vorversuchen bei etwa 2,3 Minuten festgelegt werden. Zu erkennen ist, dass der Kynurenin-Peak der uninfizierten Kontrolle niedriger ist, als der der infizierten WT Maus.

Somit ist im Serum von WT Mäusen nach Infektion nicht nur eine Verringerung der Tryptophan-Konzentration (Abbildung 3.4), sondern auch ein Anstieg von Kynurenin (Abbildung 3.5) mittels HPLC zu detektieren.

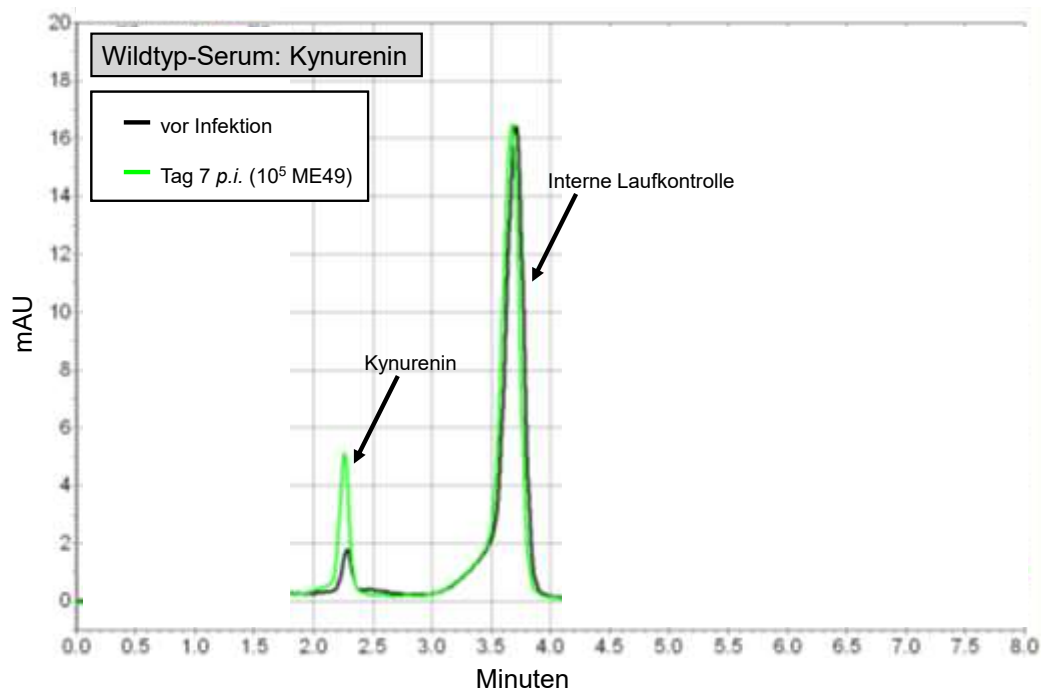


Abbildung 3.5: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung im Serum einer WT Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten (hellgrüne Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Kynurenin-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 2,3 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 360 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

Zur Kontrolle wurde das Serum von IDO^{-/-} Mäusen ebenfalls auf die Tryptophan- und Kynurenin-Konzentration untersucht. Abbildung 3.6 zeigt die Tryptophan-Konzentration im Serum einer IDO^{-/-} Maus vor der Infektion (schwarze Linie) sowie im Serum einer IDO^{-/-} Maus an Tag 7 p.i. (hellblaue Linie). Zu erkennen ist, dass die Höhe des Tryptophan-Peaks nicht variiert. Auch die Konzentration von Kynurenin im Serum dieser IDO^{-/-} Maus ist nicht durch die Infektion beeinflusst, wie man in Abbildung 3.7 erkennen kann.

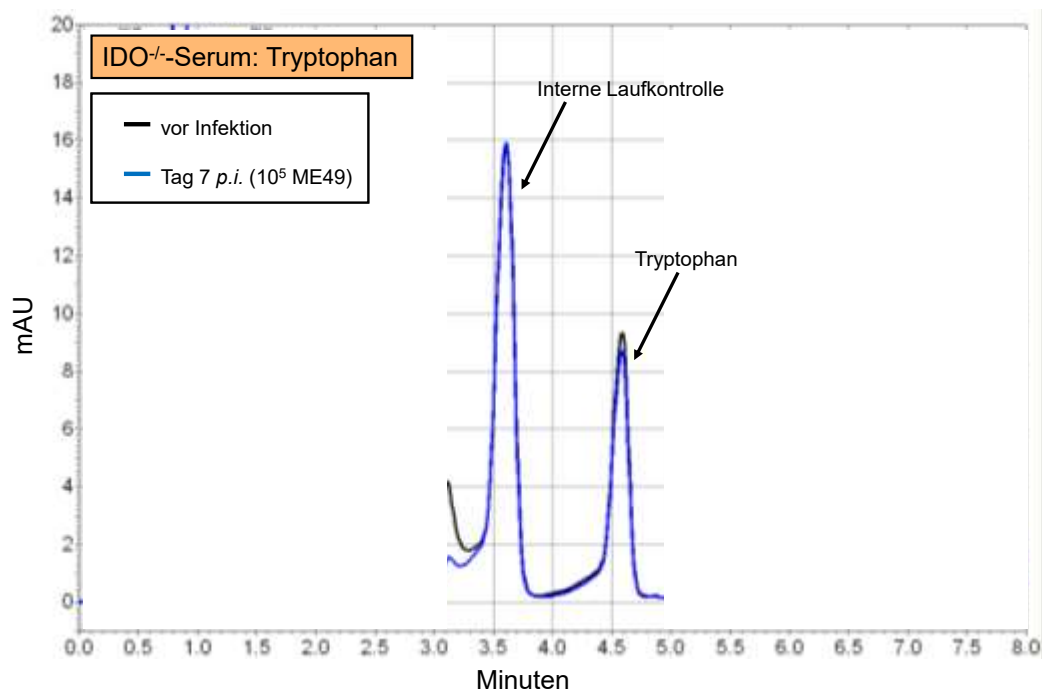


Abbildung 3.6: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung im Serum einer IDO^{-/-} Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten (hellblaue Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Tryptophan-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 4,5 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

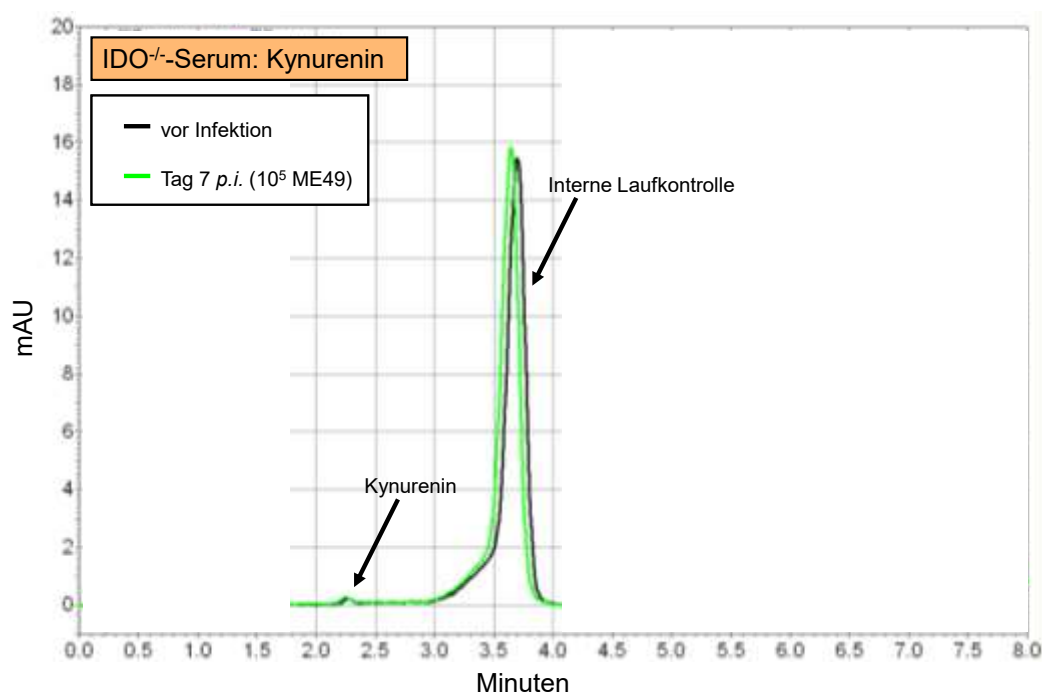


Abbildung 3.7: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung im Serum einer IDO^{-/-} Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten (hellgrüne Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Kynurenin-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 2,3 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 360 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

Um die durchschnittlichen Konzentrationen von Tryptophan und Kynurenin im Serum von mehreren uninfizierten sowie mehreren infizierten WT und IDO defizienten Tieren zu mitteln, wurden erneut Tiere mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert und deren Serum mittels HPLC analysiert. Die Daten sind in Abbildung 3.8 zusammengefasst:

Es lässt sich eine Tryptophan-Konzentration von $13,2 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ im Serum nicht infizierter WT Tiere bzw. $13,0 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ im Serum nicht infizierter IDO defizienter Tiere errechnen. Die Kynurenin-Konzentration hingegen liegt bei unbehandelten WT Tieren mit $0,1 \pm 0,2$ nahe dem Detektionslimit von $0,09 \mu\text{g/ml}$, bei IDO^{-/-} Tieren war keine detektierbare Menge (n.d.) von Kynurenin zu messen (Abbildung 3.8 A und B, Tag 0).

Im Verlauf der Infektion konnte eine, an Tag 7 *p.i.* beginnende, signifikante Verringerung der Tryptophan-Konzentration im Serum von WT Mäusen ermittelt werden. Gleichzeitig ist auch die Kynurenin-Konzentration signifikant gesteigert. Dieser infektionsbedingte Effekt auf die Tryptophan- sowie Kynurenin-Konzentration im Serum von WT Mäusen ist ebenfalls an Tag 9 und 11 *p.i.* messbar. An Tag 60 *p.i.* befindet sich die Tryptophan-Konzentration wieder auf einem Level, das dem der Kontrolle an Tag 0 entspricht. Ebenso verhält es sich mit der Kynurenin-Konzentration (Abbildung 3.8 A). In IDO^{-/-} Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung des Serum-Tryptophan- bzw. des –Kynurenin-Spiegels bei infizierten Tieren ermittelt werden (Abbildung 3.8 B).

Um die Stärke der Tryptophanabnahme sowie die Stärke der Kynureninzunahme näher beschreiben zu können, ist es gebräuchlich, diese beiden Werte in Relation zu setzen. Somit kann man die Aktivität Tryptophan metabolisierender Enzyme errechnen. Dabei ergibt sich die Grafik in Abbildung 3.8 C, die zeigt, dass WT Mäuse vor der Infektion nur sehr geringe Zeichen eines Tryptophan metabolisierenden Effektes im Serum aufweisen, wohingegen dieser im Laufe der Infektion signifikant zunimmt. Der stärkste Effekt kann für Tag 9 *p.i.* ermittelt werden: Im Vergleich zu Tag 0, ist hier ein um den Faktor 17 erhöhter Tryptophan-Umsatz messbar. Abbildung 3.8 D zeigt, dass der infektionsbedingte Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin im Serum IDO defizienter Mäuse ausbleibt.

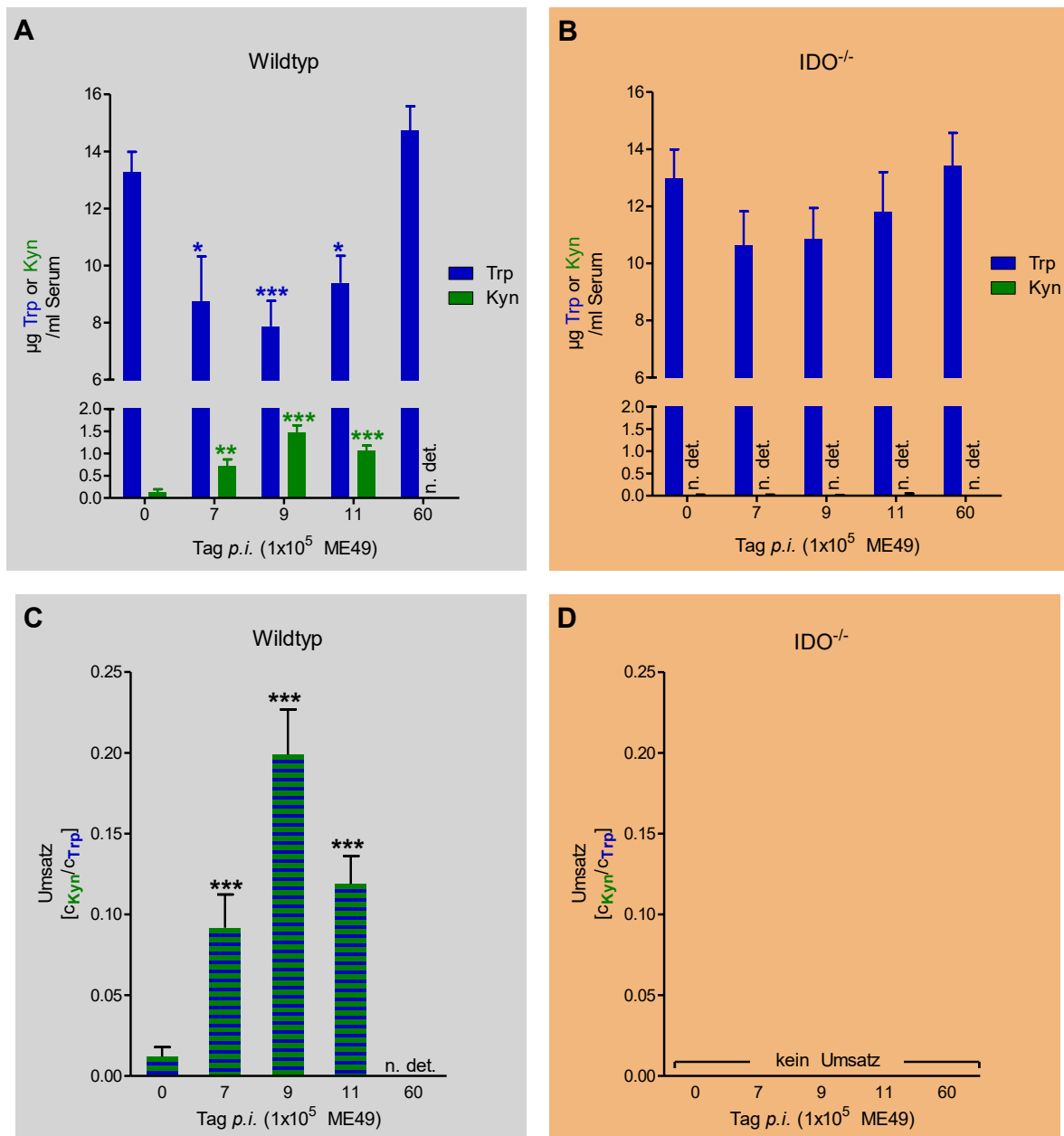


Abbildung 3.8: Konzentration von Tryptophan und Kynurenin im Serum von WT (A) und IDO^{-/-} (B) Mäusen vor sowie 7, 9, 11 und 60 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten. Zur Detektion der Tryptophan- (blaue Balken) bzw. Kynurenin-Konzentration (grüne Balken) wurde das Serum mittels HPLC analysiert. (C) und (D) zeigen den infektionsbedingten Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin in der Lunge von WT Mäusen (C) bzw. IDO defizienten Mäusen (D) an. In der Grafik sind Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige Tag 0 Kontrolle (schwarze oder farbige Asterisks). Für p ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

Insgesamt zeigen die bisherigen Analysen, dass eine Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten sowohl im WT als auch in IDO^{-/-} Mäusen zu einer systemischen Regulation von Entzündungsmediatoren führt, die bei IDO defizienten Tieren tendenziell verzögert stattfindet (Abbildung 3.3). Des Weiteren führt die Infektion im WT zu einem signifikanten systemischen Abbau der Aminosäure Tryptophan bei gleichzeitiger signifikant erhöhter Produktion von Kynurenin an Tag 7, 9 und 11 p.i. Dieser Effekt bleibt bei IDO^{-/-} Tieren aus (Abbildung 3.8).

3.3. Organspezifische Veränderungen im Verlauf einer Toxoplasmeninfektion

Die bisher beschriebenen Daten belegen, dass es im Rahmen der murinen Toxoplasmose zu einem Tryptophanabbau kommt, der wahrscheinlich durch eine IDO-Induktion verursacht wird. Um den Verlauf der Toxoplasmose in den beiden Mausstämmen genauer zu erfassen, wurden im Folgenden organspezifische Veränderungen analysiert. Dabei wurden besonders diejenigen Organe untersucht, die im Verlauf der Infektion auffällige makroskopische Veränderungen aufwiesen.

3.3.1. Veränderungen in der Milz

Im Rahmen einer Toxoplasmose kommt es zu einer makroskopisch erkennbaren Splenomegalie. Um diesen Befund quantitativ zu erfassen, wurden WT sowie IDO^{-/-} Mäuse mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert. An Tag 7, 9, 11 und 60 *p.i.* wurden die Milzen entnommen, ihre Morphologie photographisch festgehalten und ihr Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Als Kontrolle dienten Milzen nicht infizierter Tiere. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.9 zu sehen.

Abbildung 3.9 A zeigt in exemplarischen photographischen Aufnahmen die anfängliche Zunahme der Milzgröße in beiden Genotypen im Verlauf der Infektion, was eine Splenomegalie kennzeichnet. Außerdem zeigt Abbildung 3.9 A auch die spätere Abnahme der Milzgröße, die an Tag 60 *p.i.* wieder vergleichbar mit der Kontrolle an Tag 0 ist.

In Abbildung 3.9 B erkennt man die Zunahme des Gewichtes der Milzen im Verlauf der Infektion: Es zeigt sich ein vergleichbarer Anstieg des Milzgewichtes bei beiden Genotypen. Für das Milzgewicht von unbehandelten WT bzw. IDO^{-/-} Tieren ergibt sich ein Wert von 93 ± 26 mg bzw. 97 ± 20 mg. Im Verlauf der Infektion erhöht sich das Milzgewicht beider Genotypen signifikant. In beiden Fällen sind dabei an Tag 11 *p.i.* die höchsten Milzgewichte innerhalb des Beobachtungszeitraums messbar. Wie Abbildung 3.9 B zeigt, kommt es an Tag 11 zu einer Vervierfachung des Milzgewichtes (396 ± 50 mg bzw. 380 ± 97). Auch 60 Tage *p.i.* ist das Milzgewicht noch signifikant erhöht, jedoch nur noch um den Faktor 1,6 beim WT (150 ± 40 mg) bzw. 1,7 bei der IDO^{-/-} Maus (165 ± 27 mg).

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen ist nur an Tag 7 *p.i.* zu erkennen. Das Milzgewicht erreicht hierbei beim WT einen Wert von 231 ± 36 mg, während das Milzgewicht bei der IDO^{-/-} Maus 285 ± 46 mg beträgt, was einen Unterschied von 54 mg ausmacht.

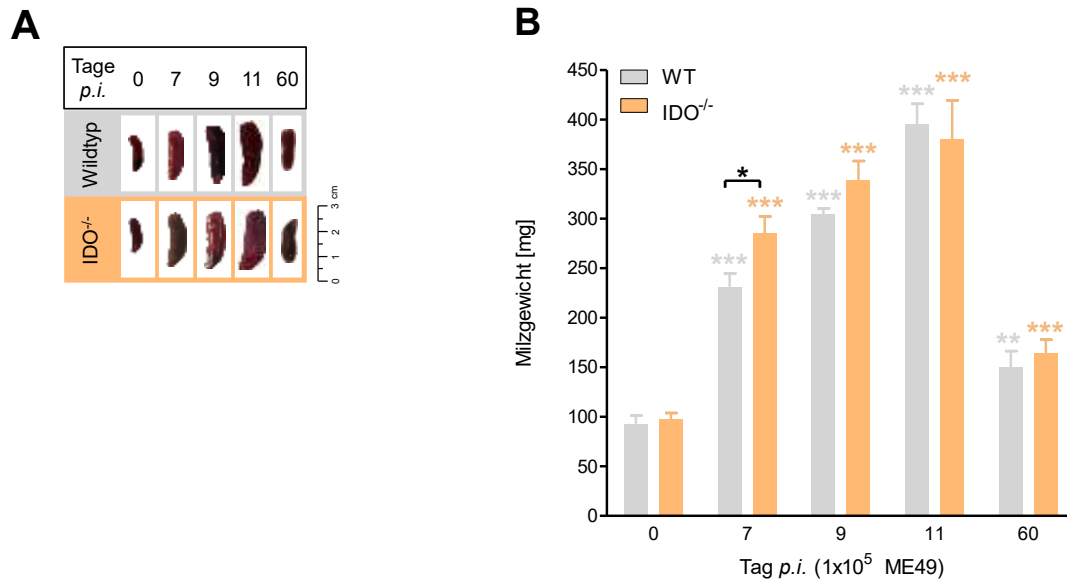


Abbildung 3.9: Splenomegalie im Verlauf einer *T. gondii* Infektion bei WT und IDO^{-/-} Mäusen. Tiere wurden i.p. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Nach Entnahme wurde die Milz vor sowie 7, 9, 11 und 60 Tage p.i. durch photographische Aufnahmen festgehalten (A) und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Ergebnisse der photographischen Aufnahmen bzw. der Gewichts-Analysen von WT Mäusen sind in grau, die von IDO^{-/-} Mäusen in apricot dargestellt ($n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks) oder die Genotypen untereinander (schwarzer Asterisks). Für p ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob die Zunahme des Milzgewichtes das Resultat einer starken zellulären Infiltration ist. Dafür wurde die Gesamtanzahl lebender, kernhaltiger Zellen in der Milz an Tag 0 sowie 7, 9 und 11 Tage nach erfolgter Infektion mit der Trypanblau-Methode ermittelt (Abbildung 3.10).

Dabei konnte für beide Genotypen in der Kontrollgruppe eine vergleichbare Anzahl an lebenden Milzzellen von $8,5 \pm 3,2$ sowie $8,5 \pm 3,3 \times 10^8$ Zellen pro Milz analysiert werden. An Tag 7 und an Tag 9 p.i. lassen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl lebender Milzzellen im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennen. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren ergab sich nur für die Anzahl lebender Milzzellen an Tag 11 p.i.: Hier wird überraschender Weise eine jeweils etwa 50 prozentige Abnahme der lebenden Zellen in der Milz beider Genotypen deutlich.

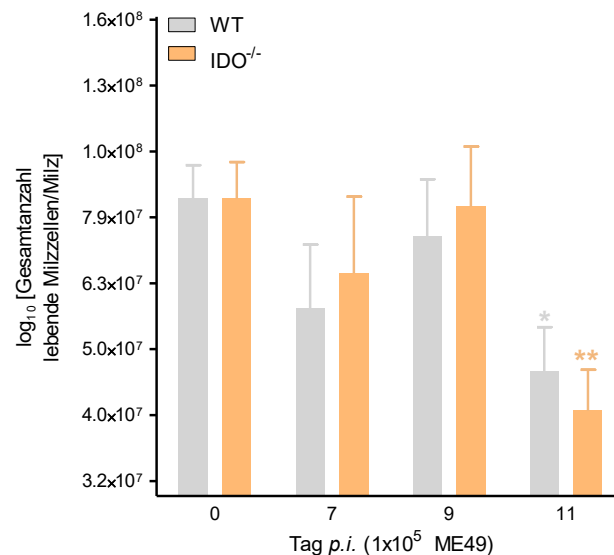


Abbildung 3.10: Anzahl lebender Zellen in der Milz im Verlauf der *T. gondii* Infektion in WT und IDO^{-/-} Mäusen. Mäuse wurden i.p. mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben uninfiziert. Nach Entnahme der Milz und Erythrozyten-Lyse, wurden die vitalen Milzzellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau-positive Zellen wurden als tote Zellen ausgeschlossen. Ergebnisse der Zellzählungen von WT Mäusen sind in grau und die der IDO^{-/-} Mäuse in apricot dargestellt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte ± SEM an (n ≥ 6; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks). Für p ergibt sich: * ≤ 0,05; ** ≤ 0,005).

Die Trypanblau-Methode ist nur für orientierende Untersuchungen zur Vitalität von Gewebszellen geeignet. Um genauer zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können, wurden 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Annexin Färbungen verwendet. Mit Hilfe dieser beiden Marker, kann zwischen lebenden, früh apoptotischen und toten Zellen unterschieden werden. Annexin⁻/DAPI⁻ Zellen entsprechen lebenden Zellen. Eine Differenzierung zwischen früh apoptotischen (Annexin⁺/DAPI⁻), sowie toten Zellen (Annexin⁺/DAPI⁺) erfolgt über die individuelle Bindung dieser beiden Marker: Die Bindung von Annexin wird ermöglicht, sobald apoptotische Zellen in der frühen Phase des programmierten Zelltodes Phosphatidylserin, ein Phospholipid der inneren Zellmembran, an die Außenseite der Zellmembran translozieren. Tote Zellen (nekrotische sowie spät apoptotische) sind zusätzlich DAPI⁺, da ihre Zellmembran allmählich durch Permeabilitätsstörungen durchlässig für diesen Marker wird und die im Zellkern befindliche DNS angefärbt werden kann.

Nach Entnahme der Milzen von Kontrolltieren beider Genotypen an Tag 0 p.i. sowie 7, 9 und 11 Tage p.i. wurden die Milzzellen aufgereinigt und ihre Vitalität nach der DAPI/Annexin Färbung mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt.

In Abbildung 3.11 A ist die verwendete *Gating*-Strategie zur Analyse der Milzzellen abgebildet. Als erstes wurden Zellen, die auf Grund ihrer geringen Größe oder Granularität als Zelldebris angesehen werden können, ausgeschlossen (SSC-A vs. FSC-A). Des Weiteren wurden ausschließlich T- und B-Zellen analysiert, da diese Zelltypen im Rahmen der Immunantwort besonders interessant sind. Daher wurden alle anderen Zelltypen diskriminiert

(FSC-A vs. CD19/CD3). Um nun lebende, früh apoptotische und tote B- und T-Zellen differenzieren zu können, wurden die beiden Marker DAPI und Annexin einander gegenübergestellt (Abbildung 3.11 B).

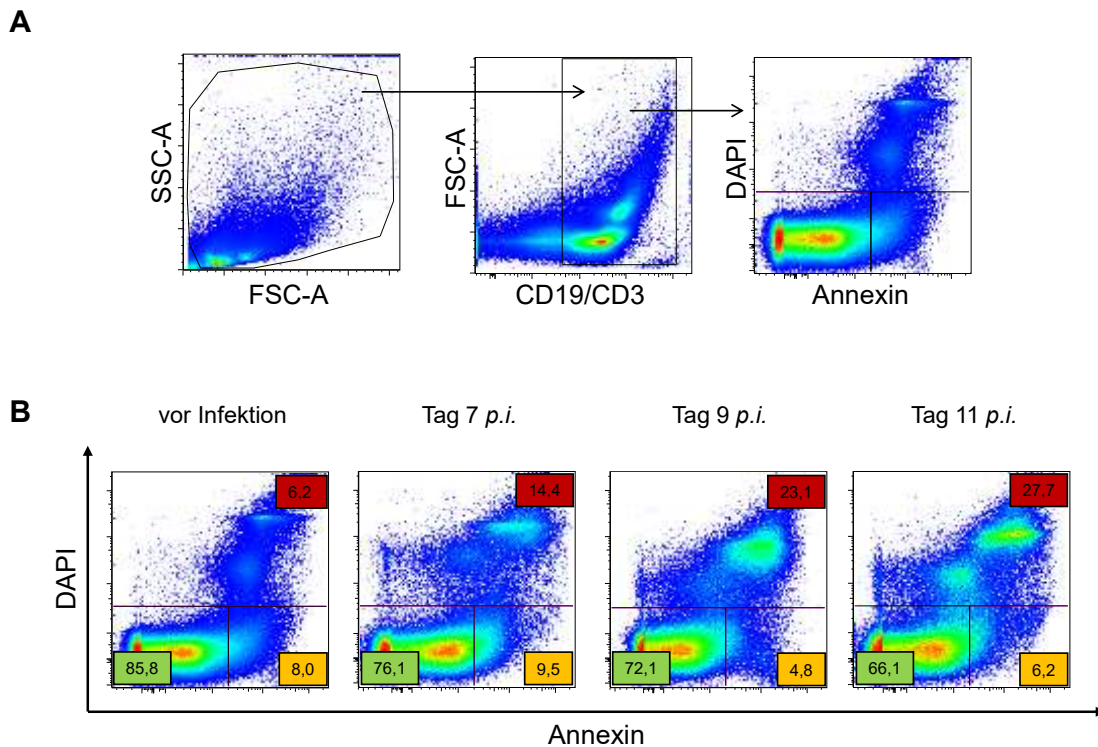


Abbildung 3.11: Gating-Strategie und exemplarische Falschfarben-Blots zur Bestimmung der Zellvitalität in der Milz. WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden i.p. mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert. Milzen wurden vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach der Infektion entnommen. Die aufgereinigten Zellen wurden daraufhin mit DAPI und Annexin gefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Falschfarben-Blots zeigen die verwendete Gating-Strategie (A) sowie eine exemplarische Darstellung der Vitalität der Milzzellen im Verlauf der Infektion am Beispiel einer WT Maus (B).

In Abbildung 3.11 B ist exemplarisch die Verteilung DAPI und Annexin positiver oder negativer Zellen im Verlauf der Infektion in der Milz einer WT Maus zu sehen. Zu erkennen ist, dass der Anteil lebender B- und T-Zellen vor der Infektion am größten ist. Zu diesem Zeitpunkt sind nur wenige apoptotische Zellen vorhanden. An Tag 7 p.i. ist eine Erhöhung der Anzahl früh apoptotischer Zellen zu sehen. Zusätzlich erhöht sich der Anteil spät apoptotischer bzw. toter Zellen. Dieser Effekt verstärkt sich an Tag 9 und an Tag 11 p.i. An den Tagen 9 und 11 p.i. ist überdies die Präsenz einer deutlich doppelt positiven Population (tote Zellen) zu erkennen.

Abbildung 3.12 fasst alle FACS-Analysen bezüglich der Vitalitäts-Bestimmung der Milzzellen quantitativ zusammen. Dabei zeigt die grau hinterlegte Grafik die Ergebnisse für WT und die apricotfarben hinterlegte Grafik die Ergebnisse für IDO^{-/-} Mäuse an.

Es ist zu erkennen, dass sich der Anteil lebender Zellen in beiden Genotypen im Verlauf der Infektion reduziert, während der Anteil apoptotischer bzw. toter Zellen stetig ansteigt.

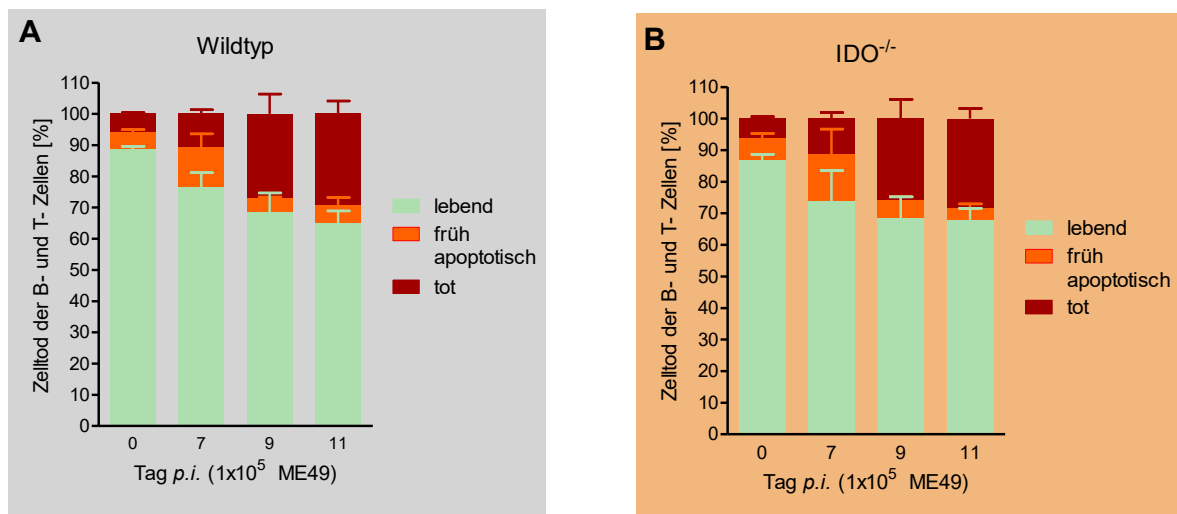


Abbildung 3.12: FACS-Analyse der Vitalität von Milzzellen im Infektionsverlauf. WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden i.p. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Milzen wurden vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach der Infektion entnommen und deren Zellen aufgereingt. Die Quantifizierung des Zelltodes von B- und T-Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte $\pm$ SEM von lebenden (mintgrün), früh apoptotischen (orange) und toten (dunkelrot) B- und T-Zellen im Verlauf der Infektion von WT (A) und IDO^{-/-} (B) Mäusen an (für Tag 0 p.i. ergibt sich $n = 2$ für beide Genotypen, für alle weiteren Versuchstage ergibt sich $n = 3$ für beide Genotypen).

In Abbildung 3.12 A und B ist die durchschnittliche infektionsbedingte prozentuale Verringerung von lebenden Zellen sowie der Anstieg toter Zellen in der Milz von WT und IDO^{-/-} Mäusen dargestellt. Um signifikante Unterschiede deutlicher hervorzuheben, ist in Abbildung 3.13 eine differenzierte Darstellung der Vitalität der Zellen gewählt. Dabei zeigt sich deutlich eine signifikante Abnahme der lebenden B- und T-Zellen in der Milz im Verlauf der ME49 Infektion. Vor der Infektion liegt der Anteil lebender B- und T-Zellen bei $89 \pm 2\%$ beim WT bzw. bei $87 \pm 5\%$ bei der IDO^{-/-} Maus. Die Verringerung ist bei beiden Genotypen an Tag 11 p.i. am stärksten. An diesem analysierten Infektionstag beträgt der Prozentsatz lebender Zellen nur noch 65 ± 7 bzw. $68 \pm 7\%$ (Abbildung 3.13 A).

Parallel dazu zeigt sich in Abbildung 3.13 B in beiden Genotypen an Tag 7 p.i. ein Anstieg früh apoptotischer Zellen in der Milz. Der höchste Anteil früh apoptotischer Zellen wurde an Tag 7 p.i. ermittelt. Dabei erhöhte sich der prozentuale Anteil bei WT Mäusen von 5 ± 2 auf $13 \pm 8\%$ und bei IDO^{-/-} Mäusen von 7 ± 1 auf $15 \pm 16\%$ (Abbildung 3.13 B).

Der prozentuale Anteil toter Zellen wird in Abbildung 3.13 C deutlich. Dieser ist an Tag 9 und 11 p.i. am höchsten. Dabei zeigen Kontrolltiere der WT Gruppe an Tag 0 einen Anteil von $4 \pm 1\%$ toter Zellen, die IDO^{-/-} Mäuse weisen einen Wert von $5 \pm 2\%$ auf. Diese Werte steigen bspw. an Tag 9 p.i. signifikant auf 18 ± 10 bzw. $17 \pm 10\%$ an (Abbildung 3.13 C).

In den hier durchgeführten Analysen, die sich mit der Vitalität der Milzzellen befassen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ermittelt werden.

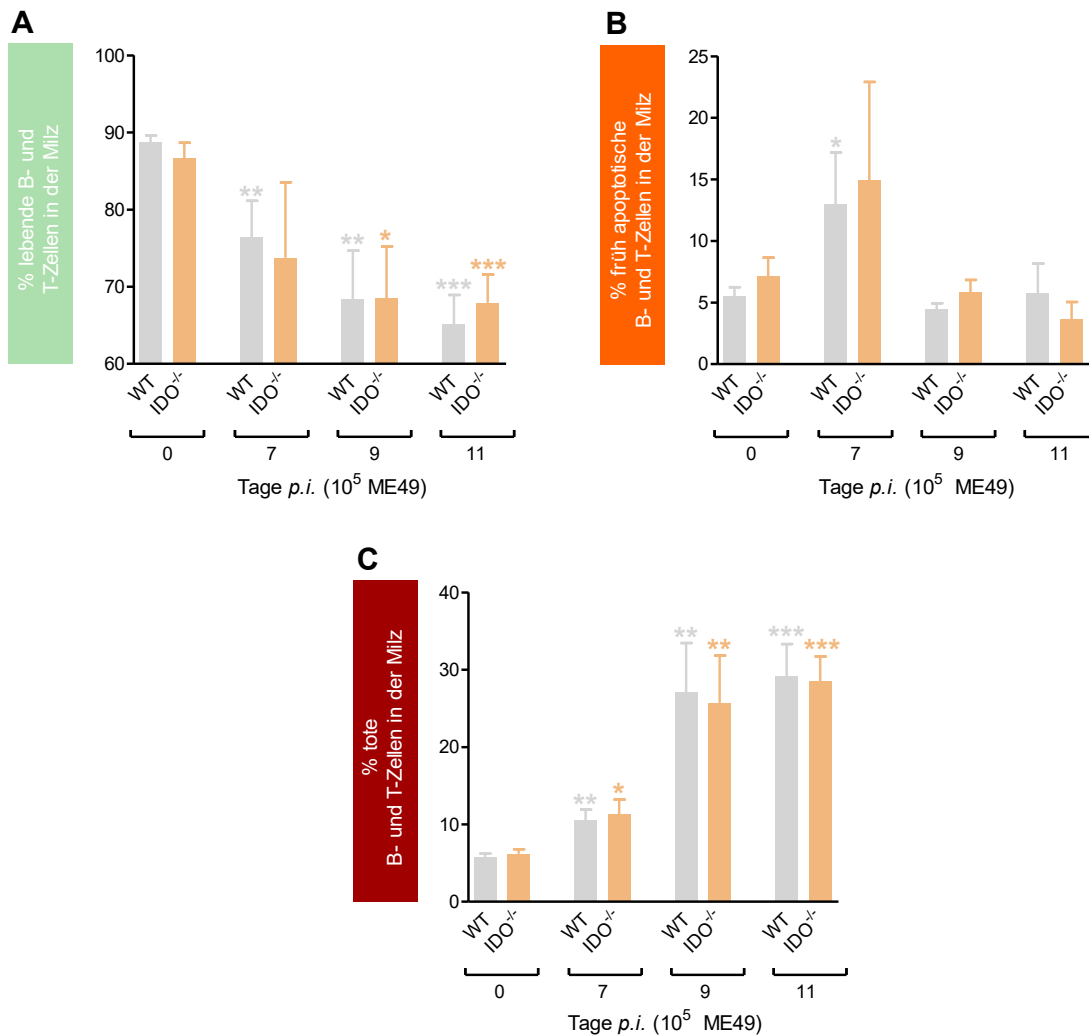


Abbildung 3.13: Differenzierte Darstellung der Vitalität von Milzzellen im Verlauf der Infektion.

WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden i.p. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Milzen wurden vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach der Infektion entnommen und deren Zellen aufgereinigt. Die Quantifizierung des Zelltodes von B- und T-Zellen wurde mittels FACS-Analyse vorgenommen. Die Balken zeigen die Mittelwerte $\pm$ SEM der Ergebnisse von WT (grau) und IDO^{-/-} Mäusen (apricot). Grafik (A) zeigt den Prozentsatz lebender Zellen an. In Grafik (B) sind die Ergebnisse früh apoptotischer Zellen dargestellt. Grafik (C) gibt den Prozentsatz toter Zellen wider (für Tag 0 p.i. ergibt sich $n = 2$ für beide Genotypen, für alle weiteren Versuchstage ergibt sich $n = 3$ für beide Genotypen; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninferzierte Kontrolle (farbige Asterisks). Für p ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum einen, dass sich das Gewicht der Milz bei beiden Genotypen im Verlauf der ME49 Infektion signifikant erhöht. Zusätzlich ist das Milzgewicht von IDO^{-/-} Tieren an Tag 7 p.i. signifikant höher als das bei WT Tieren (Abbildung 3.9 B). Zum anderen zeigt sich eine signifikante Steigerung toter B- und T-Zellen in der Milz, die jedoch keine Differenz zwischen den Genotypen aufweist (Abbildung 3.12 und 3.13). Da sich die Vitalität der Zellen in der Milz sowohl im WT als auch in der IDO^{-/-} Maus gleichermaßen verändert, kann dieser Effekt nicht als Resultat einer erhöhten systemisch wirksamem Kynurenin-Konzentration bzw. der Verringerung der Tryptophan-Konzentration interpretiert werden.

3.3.2. Veränderungen in der Leber

Da nicht nur die Milz, sondern auch das Leber-Gewebe bereits makroskopische infektionsbedingte Größen-Veränderungen aufwies, geht der nachfolgende Ergebnisteil auf eben diese leberspezifischen Unterschiede ein.

Das gesamte Leber-Gewebe wurde nach erfolgter *i.p.* Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten entnommen und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Uninfizierte Kontrollen beider Genotypen wurden gleichermaßen mitgeführt. Das Resultat der Gewichts-Bestimmung ist in Abbildung 3.14 zu sehen. Dabei zeigt sich bei beiden Genotypen eine leichte Erhöhung des Lebergewichtes im Verlauf der Infektion; jedoch ist diese nur beim WT signifikant. An Tag 7 *p.i.* kann ein signifikanter Unterschied des Lebergewichtes zwischen den beiden Genotypen gemessen werden: Das Gewicht der Leber erreicht bei WT Tieren einen Wert von 1130 ± 76 mg, wohingegen das Lebergewicht der IDO^{-/-} Mäuse einen Wert von 1232 ± 70 mg erreicht.

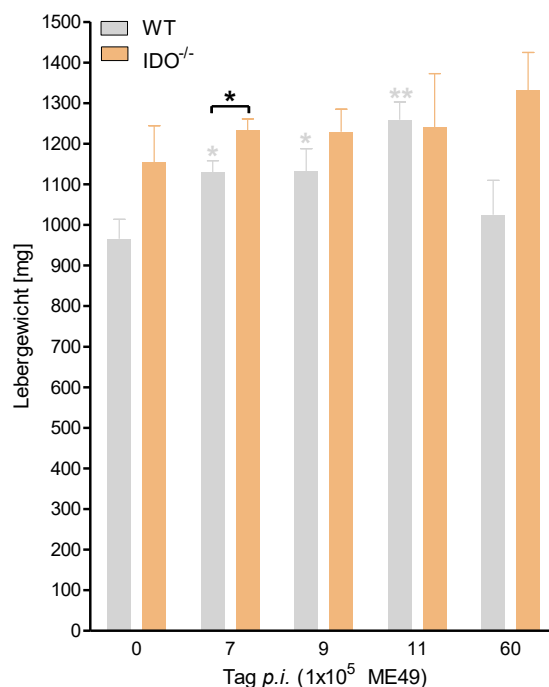


Abbildung 3.14: Veränderung des Lebergewichtes im Verlauf der Infektion. WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden *i.p.* mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Das Gewicht der Leber wurde nach Entnahme mittels Feinwaage bestimmt. Ergebnisse mit Lebergewebe von WT Tieren sind in grau, von IDO^{-/-} Mäusen in apricot dargestellt. Zu sehen sind Mittelwerte $\pm$ SEM ($n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's *t*-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks) oder die Genotypen untereinander (schwarzer Asterisks). Für *p* ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$).

Diese leichte Erhöhung des Gewichtes des Lebergewebes, könnte auf eine Infiltration von Immunzellen zurückzuführen sein, die auf Grund einer parasitären Invasion stattgefunden haben könnte. Daher sollte im Weiteren eine infektionsbedingte Schädigung der Leber analysieren werden. Dazu wurden histologische Schnitte angefertigt. Durch diese Analyse kann die Struktur des Leberparenchyms mit Hilfe der sogenannten Hämatoxylin & Eosin Färbung (H&E Färbung) dargestellt werden. Eosinophile Strukturen wie Zytoplasma oder kollagenhaltige Bereiche werden rötlich und basophile (nukleinsäurereiche) Strukturen wie

Zellkerne bläulich angefärbt. Die Ergebnisse dieser histologischen Färbung sind in Abbildung 3.15 mit repräsentativen photographischen Aufnahmen dargestellt.

In der Kontrolle (Lebergewebe von nicht infizierten Tieren beider Genotypen) ist in der ersten Spalte von Abbildung 3.15 die Struktur eines gesunden Leberparenchyms mit gleichmäßiger dicht wirkenden Verteilung der Hepatozyten zu erkennen. An Tag 7 *p.i.* (Abbildung 3.15, zweite Spalte) ist die Struktur des Leberparenchyms leicht gestört. Es sind einzelne Gewebelücken entstanden, in denen sich basophile Strukturen befinden, die auf infiltrierende Zellen zurückzuführen sind. Im weiteren Verlauf der Infektion intensivieren sich diese Schädigungen der Feinstruktur der Leber sowohl bei den WT Tieren als auch bei den IDO^{-/-} Mäusen. Vor allem an Tag 9 und 11 *p.i.* weist das Leberparenchym starke strukturelle Veränderungen auf, die sich durch verminderte Zell-Zell-Kontakte und Zellinfiltrationen auszeichnen (Abbildung 3.15, dritte und vierte Spalte).

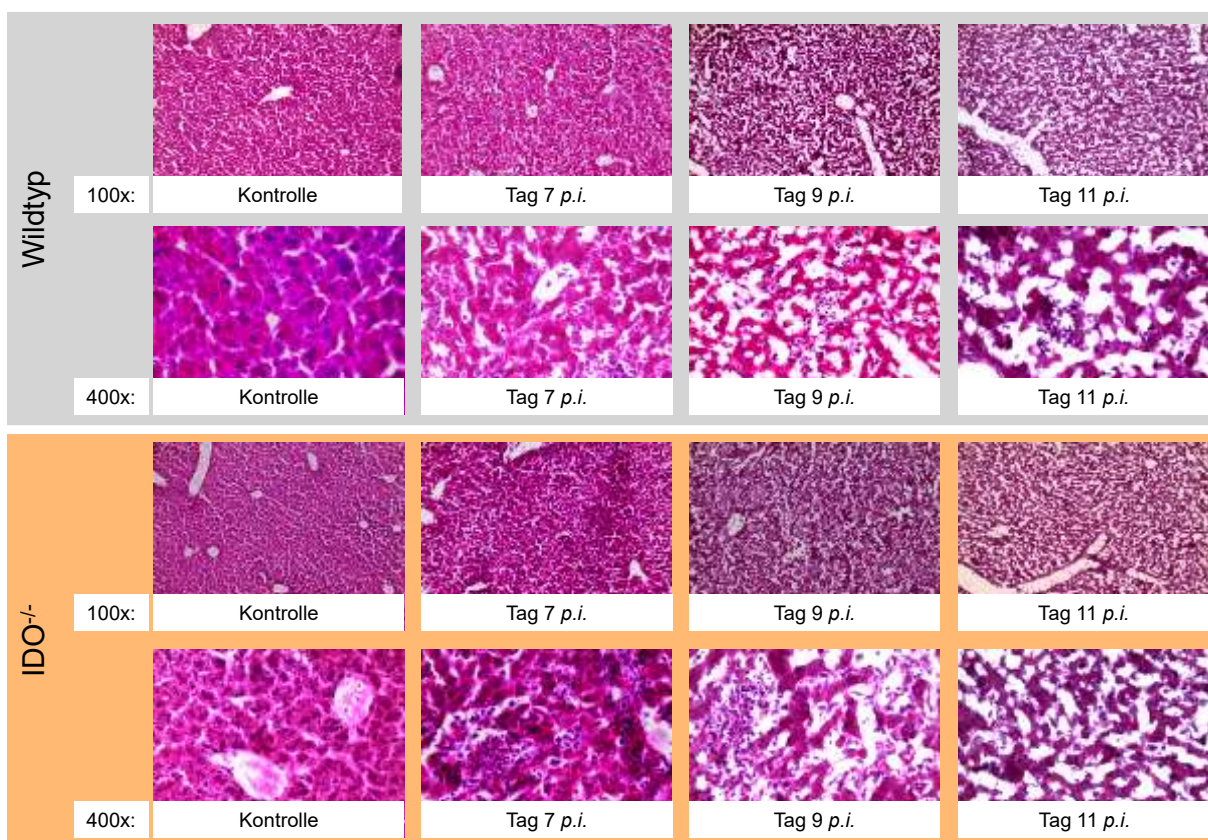


Abbildung 3.15: H&E Färbung von Gefrierschnitten der Leber vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten. Aufnahmen der H&E gefärbten Gefrierschnitte der Leber von WT Tieren sind grau, die von IDO^{-/-} Tieren apricot hinterlegt (Vergrößerungen wie angegeben).

Eine infektionsbedingte Schädigung der Leber ist sowohl in WT als auch in IDO^{-/-} Mäusen zu beobachten. Die mikroskopische Beurteilung erlaubt jedoch keine Quantifizierung der Schädigung. Um das Ausmaß der Leberschädigung zu quantifizieren, kann die Konzentration leberspezifischer Transaminasen im Serum der Tiere mittels diagnostischer Teststreifen analysiert werden. Dabei handelt es sich um die Aspartat-Amino-Transferase (AST) und die Alanin-Amino-Transferase (ALT). ALT kommt im Zytosol von Leberzellen vor, wird schon bei

leichteren Schäden der Zellmembran freigesetzt und kann daraufhin ins Blut übertreten. Eine Erhöhung der ALT im Serum ist ein eindeutiges Zeichen für eine Leberzellschädigung. AST hingegen ist überwiegend in Mitochondrien von Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Leberzellen lokalisiert und gelangt nur bei umfangreicher Zellschädigung ins Blut. Eine simultane Erhöhung der Serum-Konzentration beider Transaminasen dient als deutliches Zeichen einer Zellschädigung des Lebergewebes.

Abbildung 3.16 zeigt die Konzentration der AST (A) bzw. der ALT (B) im Serum uninfizierter Mäuse sowie 7, 9, 11 und 60 Tage *p.i.* an. Die Konzentration der AST liegt bei den uninfizierten Kontrollgruppen für WT Tiere bei 561 ± 220 IU/L. Ähnliche Werte von 600 ± 264 IU/L sind auch bei den IDO^{-/-} Mäusen zu erkennen. An Tag 7 *p.i.* steigt die Konzentration der AST im Serum von WT Mäusen bereits signifikant an und erreicht 878 ± 201 IU/L. Auch an Tag 9 und Tag 11 *p.i.* sind beim WT signifikante Steigerungen um den Faktor 3,3 bzw. 2,6 zu sehen. Am letzten Tag der Analyse, Tag 60 *p.i.*, ist die AST-Konzentration wieder im Normbereich der Werte von Tag 0. Auch bei den IDO^{-/-} Mäusen zeigt sich im Verlauf der Infektion eine Erhöhung dieser Transaminase, die an Tag 60 *p.i.* wieder vergleichbar mit den Werten unbehandelter Tiere ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen konnten nicht ermittelt werden (Abbildung 3.16 A).

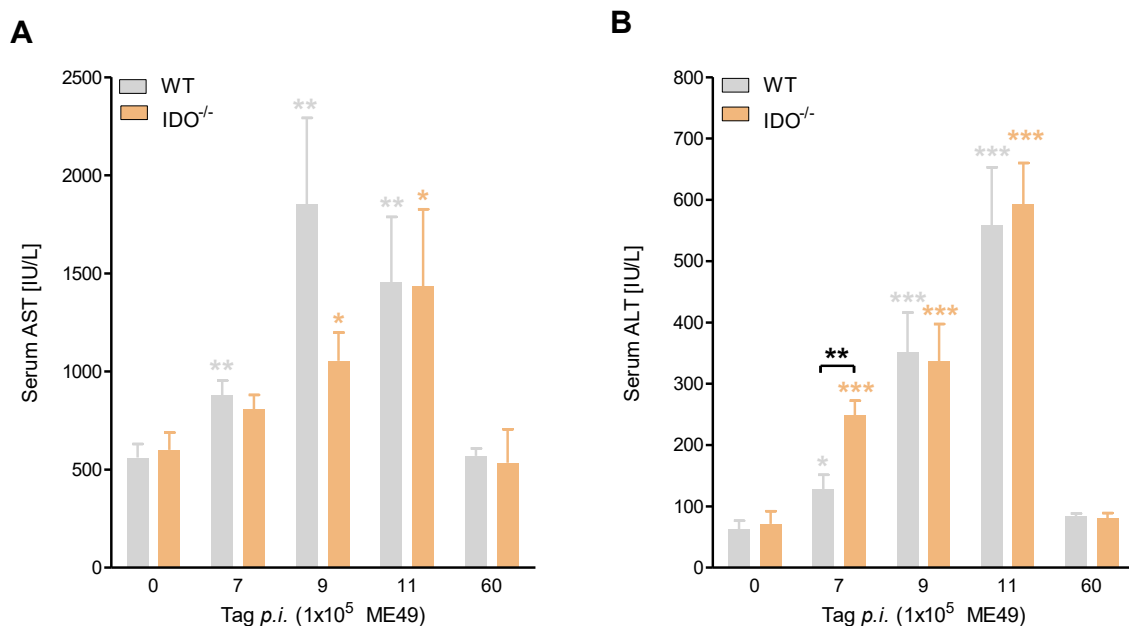


Abbildung 3.16: Quantifizierung infektionsbedingter Leberschädigung durch Analyse der Transaminasen AST (A) und ALT (B) in WT (grau) und IDO^{-/-} (apricot) Tieren. Die Tiere wurden i.p. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben als Kontrolle unbehandelt (Tag 0). Die Messung der Transaminasen erfolgte aus dem Serum. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM ($n \geq 6$; Ausnahme: $n \geq 4$ für 60 Tage *p.i.*; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks) oder die Genotypen untereinander (schwarze Asterisks). Für *p* ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

Die Konzentration der zweiten hier analysierten Transaminase ALT zeigt ebenfalls eine deutliche infektionsbedingte Steigerung (Abbildung 3.16 B). Während der Normbereich für WT und IDO^{-/-} Tiere bei 62 ± 45 IU/L bzw. 71 ± 62 IU/L liegt, erhöht sich dieser Wert im Verlauf der Infektion enorm: An Tag 11 *p.i.* konnte beim WT eine neunfache Erhöhung gemessen werden; IDO^{-/-} Tiere zeigten eine ähnliche Steigerung um den Faktor 8,4. Besonders auffällig ist jedoch der signifikante Unterschied der Werte zwischen den beiden Genotypen an Tag 7 *p.i.* Während die Leberzellschädigung gemessen an ALT beim WT nur einen Wert von 128 ± 61 IU/L erreicht, weist die IDO^{-/-} Maus mit 249 ± 62 IU/L einen etwa doppelt so hohen Wert auf (Abbildung 3.16 B).

Es zeigt sich also, dass durch die Infektion mit ME49 Tachyzoiten eine starke Leberzellschädigung hervorgerufen wird (Abbildung 3.15 und 3.16), die an Tag 7 *p.i.* einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, gemessen an der ALT-Konzentration im Serum, aufweist. Die Infektion mit Toxoplasmen scheint also in IDO defizienten Tieren eine stärkere Entzündung in der Leber hervorzurufen, was mit einer erhöhten Invasion des Parasiten einhergehen könnte.

Um zu analysieren, ob die Leberzellschädigungen auf die Intensität der Parasitenvermehrung in der Leber zurückzuführen ist, wurde die Toxoplasmen-Last unbehandelter Tiere sowie die von Tieren 7, 9 und 11 Tage *p.i.* (mit 10^5 ME49 Tachyzoiten) analysiert. Es wurde die Methodik der Echtzeit-PCR gewählt, da dies im Gegensatz zu immunhistologischen Gewebeschnitten einen optimalen quantitativen Vergleich der jeweiligen Toxoplasmen-Last beider Genotypen ermöglicht.

In Abbildung 3.17 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Der Nachweis von Toxoplasmen-DNS mittels quantitativer Echtzeit-PCR konnte im Lebergewebe der infizierten Tiere beider Genotypen erbracht werden. An Tag 7 *p.i.* wurde überdies die höchste Parasiten-Last ermittelt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Während in WT Tieren eine parasitäre Last von etwa $1,6 \times 10^4$ pro mg Lebergewebe detektiert wurde, war die Toxoplasmen-Last in der Leber von IDO^{-/-} Mäusen etwa dreimal so hoch. Die signifikant höhere Toxoplasmen-Last in der Leber von IDO^{-/-} Mäusen korreliert dabei mit der höheren Konzentration der ALT im Serum dieser Tiere (Abbildung 3.17 und 3.16 B), sodass die höhere Leberschädigung auf die Invasion der Parasiten zurück zu führen sein könnte.

Im weiteren Verlauf der Infektion verringerte sich die nachweisbare Parasiten-Last im Lebergewebe beider Genotypen stark, wie man an den Werten an Tag 9 *p.i.* und besonders an den Werten an Tag 11 *p.i.* erkennen kann (Abbildung 3.17).

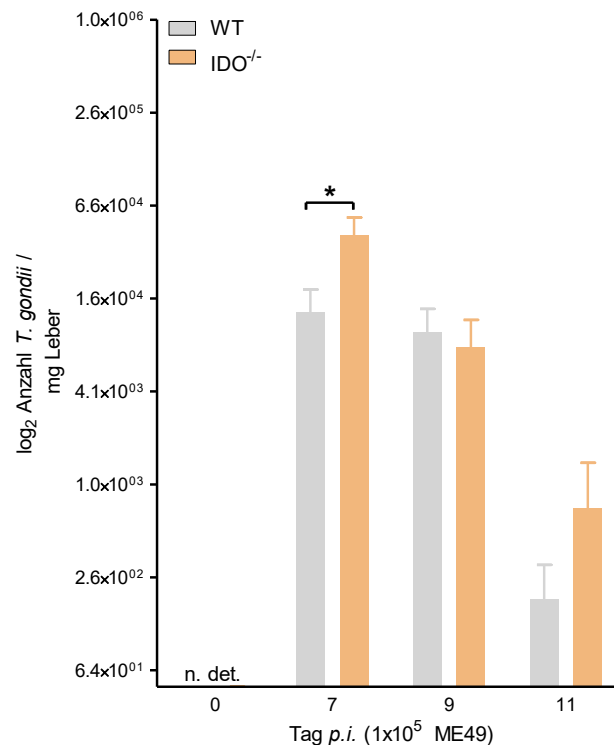


Abbildung 3.17: Bestimmung der Toxoplasmen-Last in der Leber mittels quantitativer Echtzeit-PCR nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Als Kontrolltiere dienten uninfizierte WT bzw. IDO^{-/-} Tiere. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Toxoplasmen-DNS in der Leber von WT Mäusen sind in grau, die der IDO^{-/-} Mäuse in apricot dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM ($n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die Genotypen untereinander (schwarzer Asterisks). Für p ergibt sich: * $\leq 0,05$).

Insgesamt ist zu erkennen, dass IDO^{-/-} Mäuse an Tag 7 p.i. eine signifikant höhere Toxoplasmen-Last aufweisen als WT Tiere. Daher lag die Vermutung nahe, dass die IDO antiparasitäre Effekte in der Leber der WT Tiere ausübt und durch ihre Tryptophan abbauende Wirkung das Wachstum der Toxoplasmen hemmt. Ebenso ist die Möglichkeit gegeben, dass das dabei entstehende Kynurenin hemmend auf die Vermehrung der Toxoplasmen wirkt. Daher wurde im folgenden Experiment überprüft, ob sich die Konzentration von Tryptophan und Kynurenin in der Leber im Verlauf der Infektion verändert. Dazu wurden die Konzentrationen von Tryptophan und Kynurenin in Homogenisaten der Leber beider Genotypen an Tag 7, 9 und 11 p.i. mittels HPLC-Analyse ermittelt. Als Kontrollen wurden uninfizierte Mäuse beider Genotypen mitgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

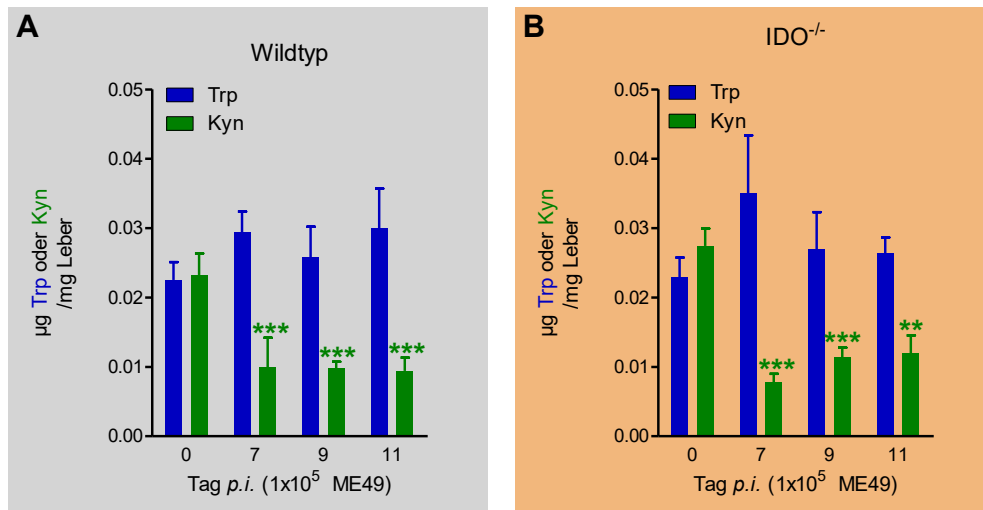


Abbildung 3.18: Tryptophan- und Kynurenin-Konzentrationen in der Leber im Verlauf einer i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten. Lebern von WT und IDO^{-/-} Mäusen wurden vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach der Infektion entnommen. Tryptophan- (blaue Balken) bzw. Kynurenin-Konzentrationen (grüne Balken) wurden nach Homogenisation des Organs mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse der Leber-Homogenisate von WT Tieren sind grau (A), die von IDO^{-/-} Tieren apricotfarben (B) hinterlegt (Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (grüne Asterisks). Für p ergibt sich: ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

Die grau hinterlegte Grafik zeigt die Ergebnisse der Tryptophan- sowie Kynurenin-Messungen in der Leber von WT Mäusen vor und während einer Infektion mit ME49 Tachyzoiten an (Abbildung 3.18 A). Erkennbar ist hier, dass die Konzentration von Tryptophan in der Leber im Verlauf der Toxoplasmeninfektion nicht signifikant verändert ist. Ferner ist auffällig, dass im Lebergewebe auch bei uninfizierten Tieren eine deutliche Kynurenin-Konzentration detektierbar ist, die im Verlauf der Toxoplasmeninfektion signifikant absinkt. In den IDO^{-/-} Tieren ist ein vergleichbares Bild zu beobachten (Abbildung 3.18 B).

Da in Kapitel 3.2. (Abbildung 3.8 A und C) belegt wurde, dass ein systemisch messbarer Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin durch die Toxoplasmeninfektion im WT ausgelöst wird, wurde überprüft, in welchen Organen das IDO-Protein exprimiert wird. Dazu wurden Western Blot Analysen durchgeführt und das Vorhandensein des IDO-Proteins in Leber, Milz und auch in der Lunge überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.19 zu sehen:

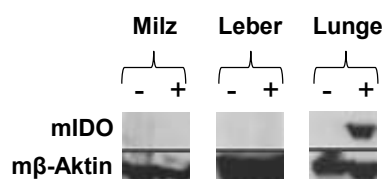


Abbildung 3.19: Western Blot Analyse des IDO-Proteins in Milz, Leber und Lungengewebe von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor (-) sowie an Tag 7 nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten (+). Je ein Individuum wurde pro Zeitpunkt und Genotyp exemplarisch ausgewählt. Die jeweiligen Organ-Homogenisate wurden auf die An- oder Abwesenheit des Proteins IDO (mIDO) getestet. Es wurde jeweils 20 μg Protein pro Spur aufgetragen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin (m β -Aktin).

Im Vergleich mit anderen Organen konnte gezeigt werden, dass die infektionsbedingte Expression des IDO-Proteins nicht in der Leber oder Milz, sondern ausschließlich in der Lunge stattfindet.

Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass an Tag 7 nach einer i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten nicht nur ein signifikant erhöhtes Lebergewicht in den IDO^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT, sondern gleichermaßen eine signifikant erhöhte Konzentration der Lebertransaminase ALT im Serum von IDO^{-/-} Mäusen sichtbar wird (Abbildung 3.14 bzw. Abbildung 3.16 B). Ebenso zeigt sich an diesem Tag p.i. auch eine signifikant höhere Parasiten-Last in IDO defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Tieren (Abbildung 3.17). Diese Unterschiede können aufgrund der Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abbildung 3.19) und der Messung der Tryptophan- bzw. der Kynurenin-Konzentration mittels HPLC (Abbildung 3.18) nicht auf eine IDO-Aktivität zurückgeführt werden.

3.3.3. Veränderungen in der Lunge

Während Milz und Leber schon makroskopisch erkennbare Veränderungen im Verlauf einer Toxoplasmeninfektion aufwiesen, erschien das Lungengewebe primär unverändert. Wie die Western Blot Analyse in Abbildung 3.19 zeigt, kommt es jedoch in der Lunge, im Gegensatz zu Milz und Leber, nach der Infektion zu einer starken Expression des IDO-Enzyms. Daher wurde im Folgenden das Lungengewebe genauer untersucht.

Für diese Analysen wurden Mäuse beider Genotypen mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Eine Kontrollgruppe blieb uninfiziert. Die Lungenflügel wurden vor bzw. 7, 9, 11 und 60 Tage nach erfolgter Infektion entnommen und analysiert.

Zunächst wurde das Gewicht der Lunge mittels Feinwaage bestimmt (Abbildung 3.20). Dabei zeigt sich ein Normwert des Lungengewichtes von 150 ± 22 mg für den WT bzw. 160 ± 23 mg für IDO^{-/-} Mäuse und im weiteren Verlauf eine infektionsbedingte Erhöhung des Lungengewichtes. Beginnend an den Tagen 9 bis 11 p.i. konnte eine signifikante Zunahme des Lungengewichtes ermittelt werden. Dabei ist die größte Gewichtsveränderung an Tag 11 p.i. zu beobachten. Das Lungengewicht bei WT Mäusen beträgt hier 216 ± 10 mg und bei IDO^{-/-} Mäusen 219 ± 28 mg. Somit hat sich das Gewicht der Lunge bei WT Mäusen um etwa 45%, das der IDO^{-/-} Mäuse um 37% erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen konnten jedoch nicht ermittelt werden.

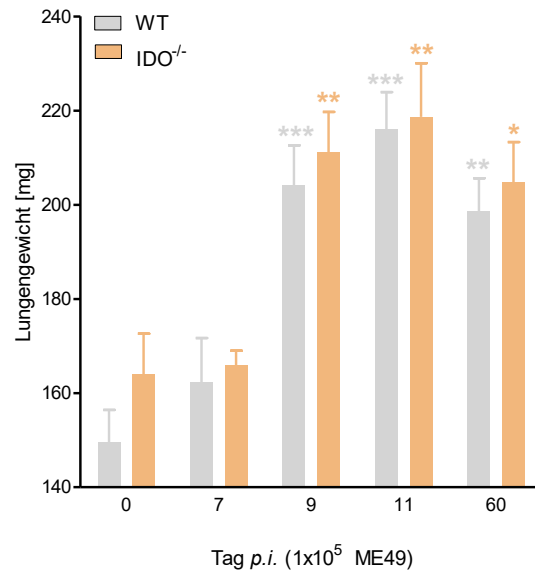


Abbildung 3.20: Infektionsbedingte Zunahme des Lungengewichtes von WT und IDO^{-/-} Mäusen im Verlauf der Infektion. Mäuse wurden i.p. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten infiziert. Als Kontrollgruppe dienten uninfizierte Mäuse. Nach Entnahme der Lunge, wurde das Lungengewicht mittels Feinwaage bestimmt (Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 6$; Ausnahme: $n \geq 4$ für beide Genotypen an Tag 60 p.i.; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks). Für p ergibt sich: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

3.3.3.1. IDO-Induktion durch Toxoplasmeninfektion

Um zu analysieren, ob die in Abbildung 3.19 gezeigte Expression des IDO-Proteins mit einer gesteigerten Enzymaktivität *in vivo* einhergeht, wurde das Lungengewebe beider Genotypen mittels HPLC auf mögliche Veränderungen der Tryptophan- und Kynurenin-Konzentration untersucht.

Dabei zeigen die folgenden vier Abbildungen (Abbildung 3.21 – 3.24) exemplarische HPLC-Chromatogramme von Tryptophan- und Kynurenin-Messungen aus Lungen-Homogenisaten von WT und IDO^{-/-} Mäusen.

Abbildung 3.21 zeigt ein HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung eines Lungen-Homogenisats einer WT Maus vor der Infektion (schwarze Linie) sowie an Tag 7 p.i. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten (hellblaue Linie). Zu erkennen ist, dass der Tryptophan-Peak im Lungen-Homogenisat des infizierten WT niedriger ist, als der des uninfizierten WT. Somit kann in der Lunge einer WT Maus im Verlauf der Toxoplasmose eine Verringerung der Tryptophan-Konzentration ermittelt werden.

Um zu analysieren, ob ebenfalls Kynurenin entstanden ist, was auf eine infektionsbedingte IDO Aktivität in der Lunge von WT Mäusen hinweisen würde, wurden zusätzlich die Kynurenin-Konzentrationen in Lungen-Homogenisaten ermittelt. Dabei zeigt Abbildung 3.22 ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung aus einem Lungen-Homogenisat eines WT Tieres vor der Infektion (schwarze Linie) sowie an Tag 7 p.i. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten (hellgrüne Linie). Es ist zu erkennen, dass der Kynurenin-Peak des Lungen-Homogenisats der infizierten Maus deutlich höher ist (hellgrüne Linie), als der der uninfizierten Maus (schwarze Linie). Somit ist in der Lunge von WT Mäusen nicht nur eine

Abnahme der Tryptophan-Konzentration (Abbildung 3.21), sondern auch ein Anstieg des Kynurenin-Peaks (Abbildung 3.22) anhand der Chromatogramme zu erkennen.

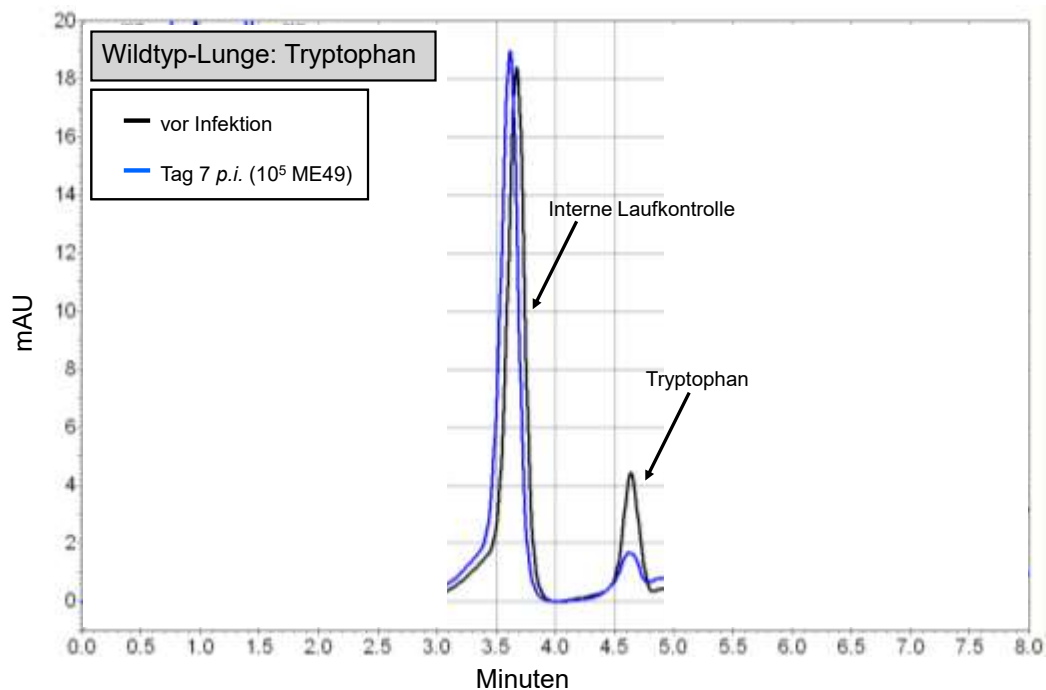


Abbildung 3.21: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung in der Lunge einer WT Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ Tachyzoiten (hellblaue Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Tryptophan-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 4,5 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

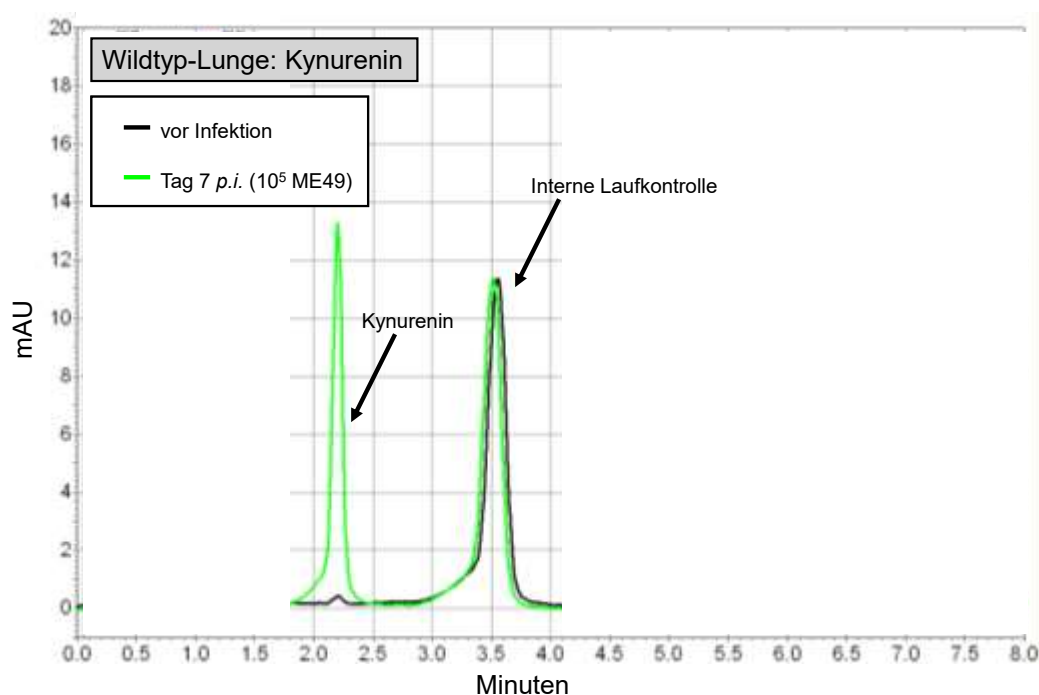


Abbildung 3.22: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung in der Lunge einer WT Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten (hellgrüne Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Kynurenin-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 2,3 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 360 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

Zur Kontrolle wurden ebenfalls Lungen-Homogenisate von IDO^{-/-} Mäusen auf die Anwesenheit von Tryptophan und Kynurenin untersucht. Dabei zeigt Abbildung 3.23 bzw. Abbildung 3.24, dass sich die Tryptophan- bzw. Kynurenin-Konzentration in dem Lungen-Homogenisat einer IDO^{-/-} Maus im Verlauf der Toxoplasmose nicht verändert.

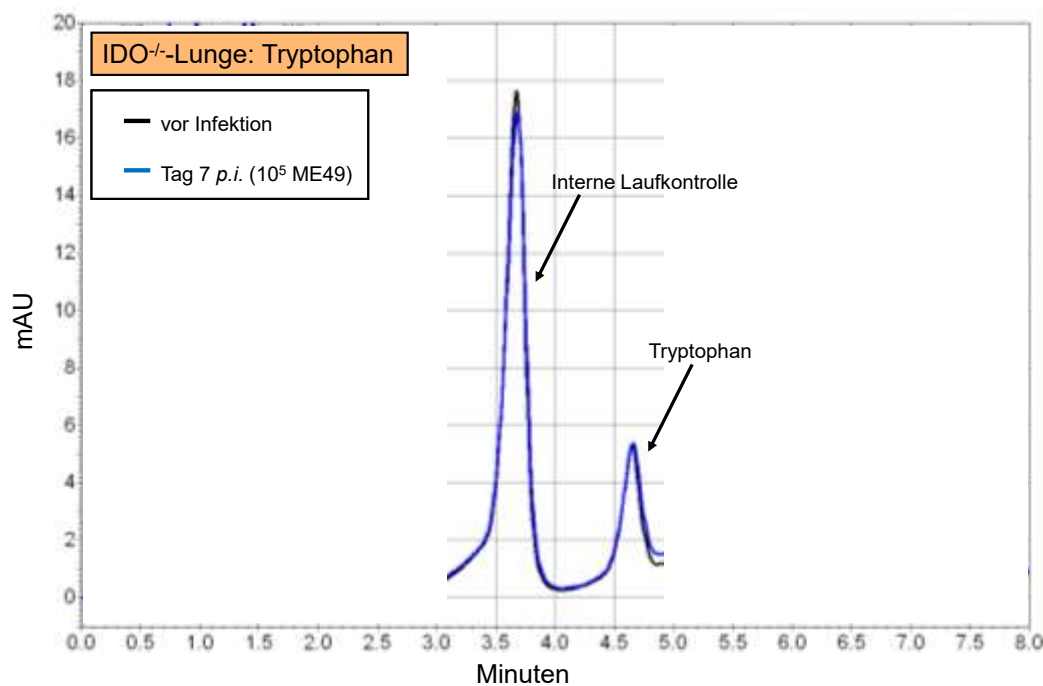


Abbildung 3.23: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Tryptophan-Messung in der Lunge einer IDO^{-/-} Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ Tachyzoiten (hellblaue Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Tryptophan-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 4,5 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

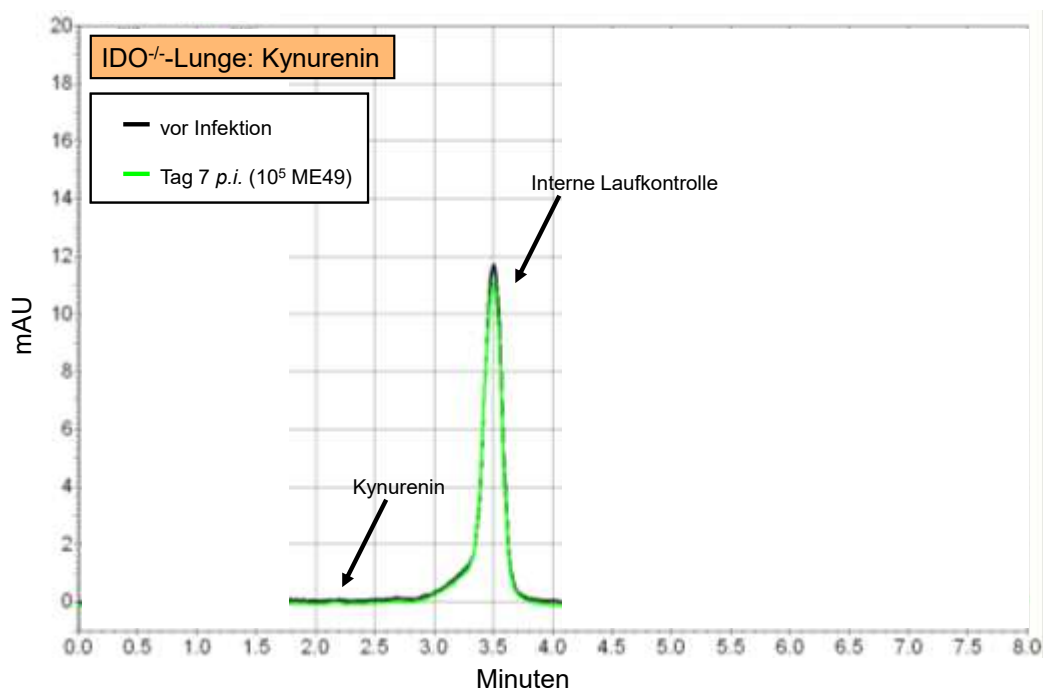


Abbildung 3.24: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kynurenin-Messung in der Lunge einer IDO^{-/-} Maus vor (schwarze Linie) und 7 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten (hellgrüne Linie). 3-Nitro-Tyrosin wurde als interne Laufkontrolle zu jeder einzelnen Probe hinzugefügt. Die Kynurenin-Konzentration konnte bei einem Elutionszeitpunkt von 2,3 Minuten mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 360 nm ermittelt und quantitativ erfasst werden.

In Abbildung 3.25 sind die jeweiligen durchschnittlichen Tryptophan- und Kynurenin-Konzentrationen in Lungen mehrerer WT (Abbildung 3.25 A) und mehrerer IDO^{-/-} (Abbildung 3.25 B) Mäuse zu sehen. In Abbildung 3.25 C bzw. D ist der Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin für WT bzw. für IDO defiziente Mäuse dargestellt.

Zu erkennen ist zunächst, dass sich in der uninfizierten Kontrollgruppe beider Genotypen an Tag 0 eine ähnliche Tryptophan-Konzentration ermitteln lässt. Dabei beträgt die Konzentration in den Lungen der WT Mäuse $0,14 \pm 0,05 \mu\text{g}$ pro mg Gesamt-Lunge und in IDO^{-/-} Mäusen $0,11 \pm 0,03 \mu\text{g}$ pro mg Gesamt-Lunge. Kynurenin ist unter Kontrollbedingungen an Tag 0 bei beiden Genotypen nicht zu detektieren (Abbildung 3.25 A und B, jeweils Tag 0 *p.i.*). Bereits an Tag 7 *p.i.* ist ein signifikanter Rückgang des Tryptophan-Spiegels in der Lunge der WT Tiere um 62% zu erkennen. An Tag 9 und 11 *p.i.* befinden sich nur noch ca. 20% des ursprünglichen Tryptophan-Gehaltes in der Lunge der WT Mäuse. An Tag 60 *p.i.* ähnelt die Tryptophan-Konzentration wieder der der Kontrollgruppe an Tag 0.

Die Verringerung der Tryptophan-Konzentration in der akuten Phase der Infektion, korreliert mit einer Steigerung der Kynurenin-Konzentration: An allen analysierten Zeitpunkten während der Infektion, kann eine beachtliche Menge an Kynurenin in der Lunge von WT Mäusen nachgewiesen werden, die sogar noch an Tag 60 *p.i.* in der chronischen Phase der Infektion detektierbar bleibt. Die Menge an Kynurenin übersteigt an Tag 7, 9 und 11 *p.i.* sogar die Menge an Tryptophan: Während beispielsweise an Tag 9 *p.i.* nur noch $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g}$ Tryptophan pro mg Lunge zu messen sind, steigt die Konzentration von Kynurenin auf $0,07 \pm 0,02$ an (Abbildung 3.25 A und B). Somit ergibt sich in der Lunge von WT Mäusen eine dimensionslose Umsatzrate von Tryptophan zu Kynurenin, die in Abbildung 3.25 C dargestellt ist. Hier zeigt sich eine klare infektionsbedingte Steigerung der Aktivität eines Tryptophan-metabolisierenden Enzyms, welche an Tag 9 *p.i.* am höchsten ist.

Auch in IDO^{-/-} Mäusen wurde gleichzeitig die Tryptophan- und Kynurenin-Konzentration in der Lunge analysiert (Abbildung 3.25 B). Dabei zeigt sich, dass die Tryptophan-Konzentration an Tag 7 und 9 *p.i.* nicht signifikant verringert ist. Lediglich an Tag 11 *p.i.* sieht man eine signifikante Verringerung der Tryptophan-Konzentration auf etwa 72% des Kontrollwerts an Tag 0. Dies kann jedoch nicht durch einen Abbau von Tryptophan durch den Kynurenin-Stoffwechsel erklärt werden, da keine Produktion von Kynurenin nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.25 B). Somit bleibt auch ein messbarer Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin in Lungen infizierter IDO defizienter Tiere aus, wie in Abbildung 3.25 D zu erkennen ist.

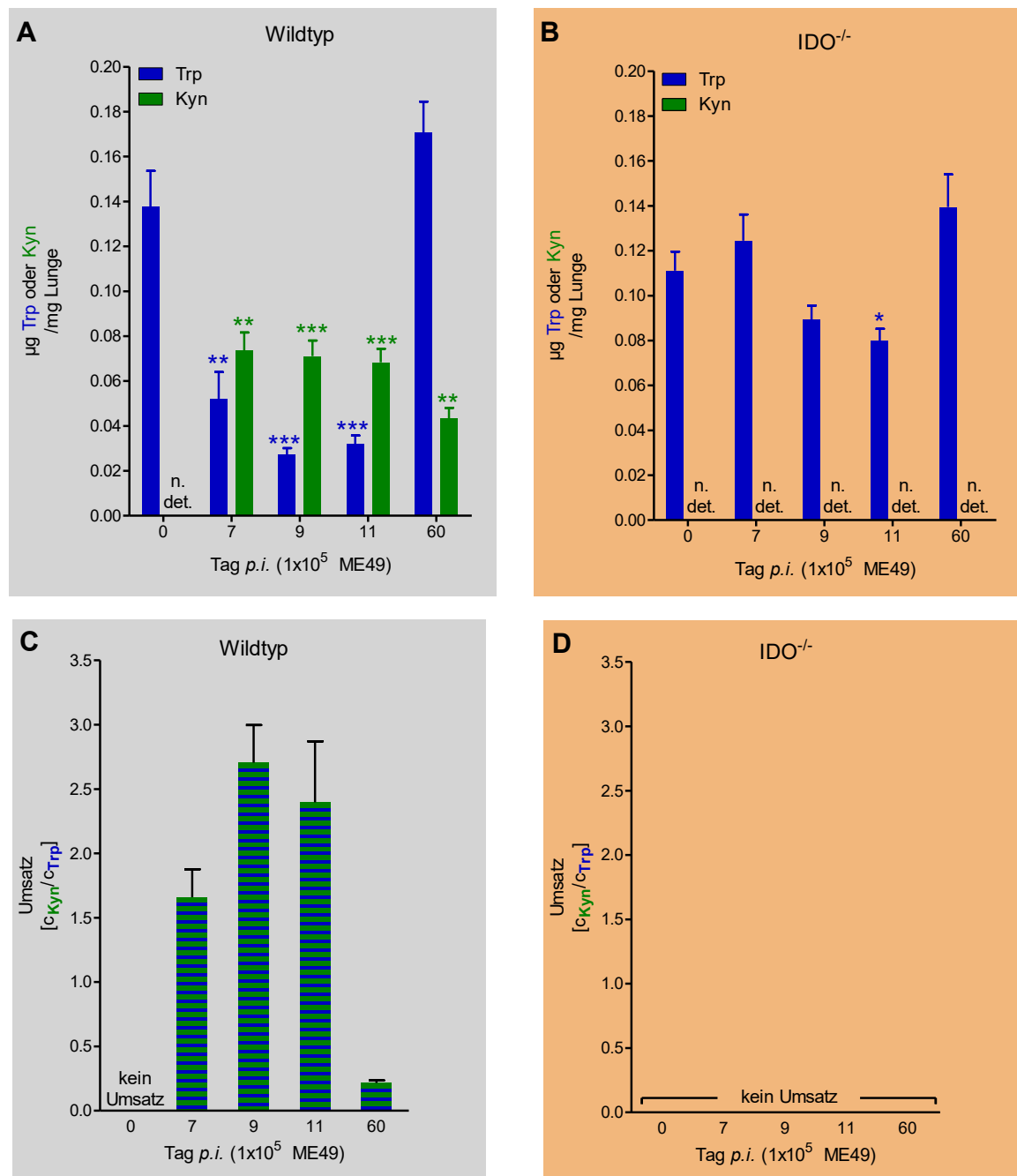


Abbildung 3.25: Konzentration von Tryptophan und Kynurenin in der Lunge von WT (A) und IDO^{-/-} (B) Mäusen vor sowie 7, 9, 11 und 60 Tage nach i.p. Infektion mit 10^5 ME49 Tachyzoiten. Zur Detektion der Tryptophan- (blaue Balken) bzw. Kynurenin-Konzentration (grüne Balken) wurde das Lungen-Homogenisat mittels HPLC analysiert. (C) und (D) zeigen die infektionsbedingte IDO-Aktivität in der Lunge von WT (C) bzw. IDO defizienten Mäusen (D) an, die anhand des Kynurenin/Tryptophan-Verhältnisses berechnet wurde. In allen Grafiken sind jeweils Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n \geq 6$; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninfizierte Kontrolle (farbige Asterisks). Für p ergibt sich: ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$).

Im direkten Vergleich der HPLC-Daten aus Lungen-Homogenisaten von WT und IDO^{-/-} Mäusen, scheint demnach das IDO-Enzym Verursacher des enormen Tryptophanabbaus sowie der Steigerung der Kynurenin-Konzentration zu sein. Um einen direkten Beweis für das Vorhandensein des IDO-Enzyms zu erbringen, wurde im nächsten Experiment eine Protein-Analyse mittels Gelelektrophorese und nachfolgender Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Lungen von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7, 9, 11 und 60 Tage *p.i.* nach Entnahme homogenisiert und auf das Vorhandensein des IDO-Proteins bzw. auf das Vorhandensein des Kontroll-Proteins β -Aktin mit spezifischen Antikörpern untersucht. Das Ergebnis dieser Western Blot Analyse ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Der grau hinterlegte Bereich zeigt dabei eine klare und ausschließlich infektionsbedingte Expression des IDO-Proteins in Lungen von WT Mäusen. Die Stärke der Proteinexpression erhöht sich dabei im Laufe der Infektion in der akuten Phase (Tag 7 – Tag 11 *p.i.*), an Tag 60 *p.i.* ist die Stärke der IDO-Proteinbande wieder deutlich niedriger. Im Gegensatz dazu ist in IDO^{-/-} Mäusen kein IDO-Protein zu detektieren, was in der Darstellung, die apricotfarben hinterlegt ist, sichtbar wird (Abbildung 3.26).

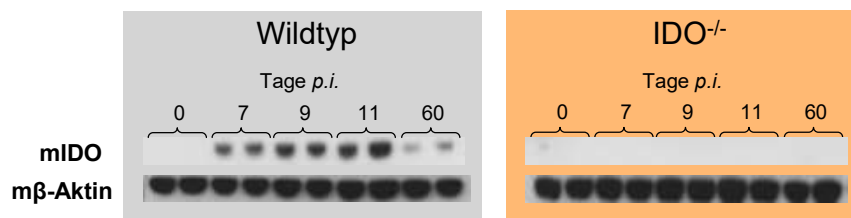


Abbildung 3.26: Western Blot Analyse zum Nachweis des IDO-Proteins in der Lunge von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7, 9, 11 und 60 Tage nach *i.p.* Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Je Zwei Individuen wurden pro Zeitpunkt und Genotyp ausgewählt und deren Lungen-Homogenisate auf An- oder Abwesenheit des Proteins IDO (*mIDO*) getestet. Es wurden 20 μ g Protein je Spur aufgetragen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin (*m β -Aktin*).

3.3.3.2 Toxoplasmen-Last im Verlauf der Infektion

Ob die, mit der IDO-Aktivität einhergehende, Verringerung der Tryptophan-Konzentration in der Lunge von WT Mäusen einen Effekt auf das Wachstum des Tryptophan-auxotrophen Parasiten *T. gondii* ausübt, sollte mit Hilfe der Quantifizierung der pulmonalen Parasiten-Last beantwortet werden. Dazu wurde die Parasiten-Last in den Lungen von uninfizierten Kontrolltieren sowie von Tieren an Tag 7, 9, 11 und 60 *p.i.* mit Hilfe spezifischer Primer durch quantitative Echtzeit-PCR untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.27 zu sehen.

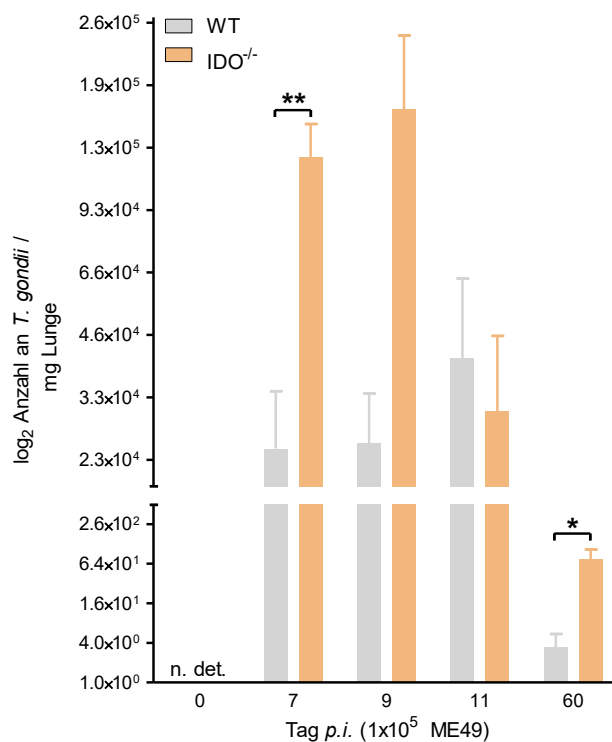


Abbildung 3.27: Parasiten-Last in der Lunge von WT und IDO^{-/-} Mäusen. Tiere wurden *i.p.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert. Als Kontrolle dienen uninfizierte Mäuse des jeweiligen Genotyps. Die Parasiten-Last in der Lunge wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Toxoplasmen-DNS in Lungen von WT Mäusen sind in grau, der von IDO^{-/-} Mäusen in apricot dargestellt (Mittelwerte ± SEM, n ≥ 6; signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die Genotypen untereinander (schwarze Asterisks). Für p ergibt sich: * ≤ 0,05; ** ≤ 0,005).

Dabei ist zu erkennen, dass in den Lungen beider Genotypen an Tag 7 *p.i.* bereits Toxoplasmen-DNS nachweisbar ist. Des Weiteren zeigt Abbildung 3.27 sehr deutlich, dass in der Lunge der IDO defizienten Tiere eine signifikant höhere Parasiten-Last zu finden ist: An Tag 7 *p.i.* konnte in der Lunge der IDO^{-/-} Tiere im Vergleich zum WT eine 5,1 Mal höhere Parasiten-Last ermittelt werden. Auch an Tag 9 *p.i.* ist eine um den Faktor 6,4 höhere Parasiten-Last in den Lungen IDO defizienter Tiere zu erkennen. An Tag 11 *p.i.* ist kein Unterschied in der Toxoplasmen-Last zwischen den Genotypen zu sehen. Bis Tag 60 *p.i.* konnten die Parasiten in der Lunge beider Genotypen nahezu vollständig eliminiert werden.

3.3.3.3 Infektionsbedingte Erhöhung der Zytokin-Konzentration

Da die Parasiten-Last in der Lunge von IDO^{-/-} Mäusen an Tag 7 und 9 *p.i.* um den Faktor 5,1 bzw. 6,4 höher ist als beim WT, sollte im Folgenden analysiert werden, ob diese höhere Parasiten-Last auch mit einer veränderten Immunantwort in den Lungen der IDO^{-/-} Tiere einhergeht. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden die Zytokin-Spiegel in den Lungen der infizierten Tiere (7, 9 und 11 Tage *p.i.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten) mit Hilfe der Multi-Plex Methode untersucht. Als Kontrolle dienten jeweils uninfizierte Tiere beider Genotypen. Das Ergebnis für ausgewählte Zytokine ist in Abbildung 3.28 dargestellt: Es ergibt sich für alle hier analysierten Zytokine, dass diese ausschließlich nach erfolgter Toxoplasmeninfektion in der Lunge zu finden sind. Zusätzlich ist die Zytokin-Konzentration in der Lunge von IDO^{-/-} Mäusen an Tag 7 und 9 *p.i.* tendenziell höher als in der Lunge von WT Tieren. Die beiden signifikanten Unterschiede wurden für die höheren Zytokin-Konzentrationen an Tag 7 und 9 *p.i.* in den Lungen von IDO^{-/-} Mäusen berechnet. Vor allem für IFN γ sind signifikante Unterschiede detektierbar (Abbildung 3.28 A). Während in der Lunge des WT an Tag 7 *p.i.* eine Konzentration von 210 ± 126 pg IFN γ zu finden ist, ist die Menge von IFN γ in der Lunge der IDO^{-/-} Mäuse mit einem Wert von 433 ± 116 pg um den Faktor 2,1 höher. Auch an Tag 9 *p.i.* ist eine höhere Konzentration an IFN γ in der Lunge IDO defizienter Tieren zu finden. Die, im Vergleich zum WT, erhöhte Konzentration von IFN γ in der Lunge der IDO^{-/-} Mäuse an Tag 7 und 9 *p.i.*, lässt sich auch bei CCL2, einem Chemoattraktant für Monozyten, messen (Abbildung 3.28 B). Dabei ergibt sich für WT Mäuse an Tag 7 *p.i.* ein Wert von 594 ± 344 pg CCL2, wohingegen dieser Wert bei IDO^{-/-} Mäusen signifikant auf 1057 ± 236 pg ansteigt.

Auch an Tag 9 *p.i.* findet sich in der Lunge von IDO^{-/-} Mäusen (874 ± 304 pg) ein durchschnittlich höherer CCL2-Wert als in der Lunge der WT Maus (524 ± 97 pg). Gleichermäßen konnte auch für TNF α , M-CSF, CXCL-10 und CXCL-9 an Tag 7 und 9 *p.i.* stets eine im Vergleich zum WT höhere Konzentration in der Lunge der IDO defizienten Tiere analysiert werden (Abbildung 3.28 C, D, E und F). An Tag 11 *p.i.* ist für keines der Zytokine ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu ermitteln.

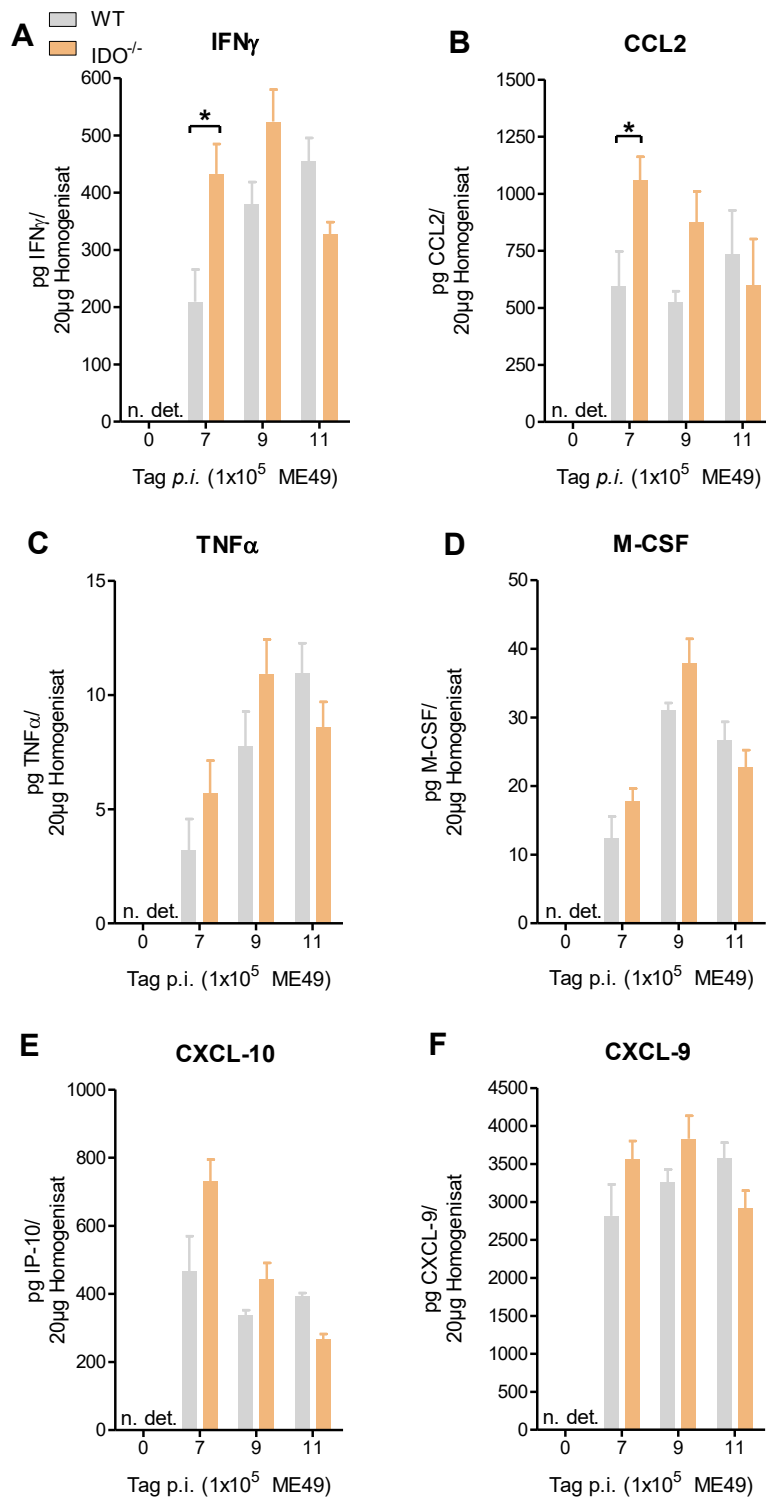


Abbildung 3.28: Multi-Plex Assay zum Nachweis proinflammatorischer Mediatoren im Lungengewebe von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7, 9 und 11 Tage nach i.p. Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Für die Analyse wurde jeweils 20 µg Gesamtprotein des jeweiligen Lungen-Homogenisats verwendet. Grafik (A) zeigt den jeweiligen Mittelwert $\pm$ SEM der Konzentration des Zytokins IFN γ im Homogenisat der Lunge von WT und IDO^{-/-} Mäusen im Verlauf der Infektion. (B) CCL2. (C) TNF α . (D) M-CSF. (E) CXCL-10. (F) CXCL-9. Ergebnisse von WT Mäusen sind in grau, die von IDO^{-/-} Mäusen in apricot dargestellt (WT: n = 6 für uninfizierte Mäuse, n = 5 für Tag 7 und 11 p.i., n = 4 für Tag 9 p.i.; IDO^{-/-}: n = 6 für uninfizierte Mäuse (Tag 0), n = 5 für Tag 7, 9 und 11 p.i.; signifikante Steigerungen wurden mit dem Student's t-Test im Vergleich der Genotypen untereinander berechnet. Für p ergibt sich: * $\leq$ 0,05).

3.3.3.4. Zelluläre Infiltrate in der Lunge durch eine Toxoplasmeninfektion

Da die Toxoplasmeninfektion in der Lunge viele, deutlich messbare Veränderungen hervorruft, wurden im Folgenden vergleichende histologische Untersuchungen an *T. gondii* infizierten Tieren durchgeführt. Dazu blieben WT und IDO^{-/-} Mäuse als Kontrolle uninfiziert oder wurden mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert und die Lunge für histologische Untersuchungen vorbereitet. Nach erfolgter Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung konnte die histologische Befundung erfolgen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3.29 photographisch festgehalten. Dabei sind die Aufnahmen der Ergebnisse der histologischen Aufnahmen von WT Tieren grau (Abbildung 3.29 A) und die von IDO^{-/-} Tieren apricotfarben hinterlegt (Abbildung 3.29 B). Sowohl die Lungen uninfizierter WT als auch uninfizierter IDO^{-/-} Mäuse zeigen eine normale, charakteristische Struktur des Lungengewebes, wie sich anhand der Kontroll-Aufnahmen zeigt (Abbildung 3.29 A und 3.29 B, jeweils linke Spalte, alle Vergrößerungen). Die alveoläre Struktur der Lunge ist in beiden Genotypen deutlich zu erkennen. Des Weiteren finden sich in den Kontroll-Schnitten nur vereinzelt Zellen in unmittelbarer Nähe der Pneumozyten, bei denen es sich vermutlich um Alveolar-Makrophagen handelt. Der Typus dieser Zellen kann durch diese Färbung jedoch nicht weiter charakterisiert werden. Dennoch genügt diese Art der Histologie, um infektionsbedingte Veränderungen in der Lunge beider Genotypen zu erkennen: Sowohl in den histologischen Schnitten der Lungen von WT Tieren als auch in denen von IDO^{-/-} Tieren ist an Tag 9 *p.i.* zu erkennen, dass sich die Anzahl zellulärer Bestandteile an der alveolären Wand erhöht. Zusätzlich wirken die Pneumozyten bzw. alveolären Epithelzellen in beiden Fällen verdickt (Abbildung 3.29 A und 3.29 B, jeweils rechte Spalte).

Im direkten Vergleich der histologischen Befunde ergab sich jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen WT und IDO defizienten Tieren.

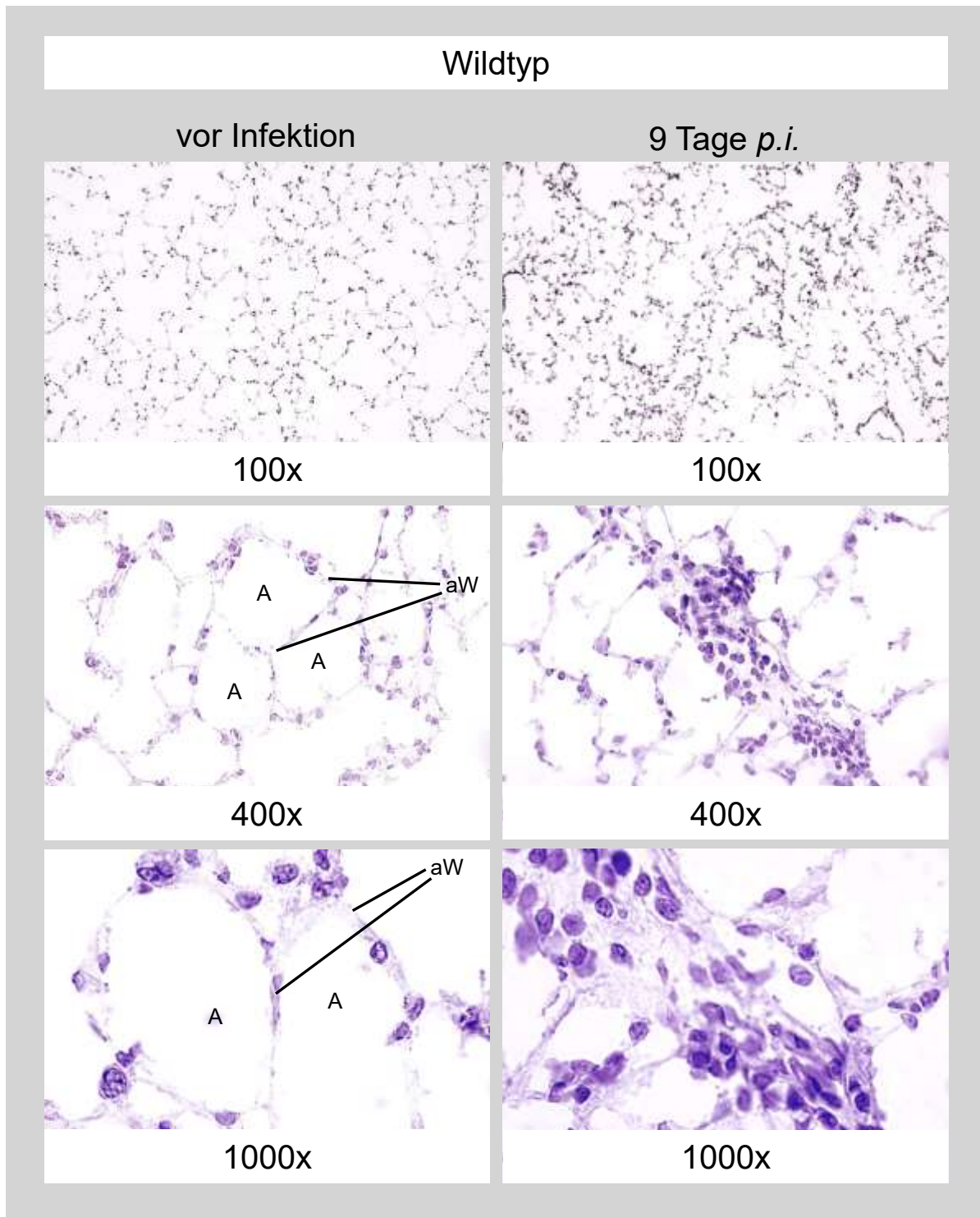


Abbildung 3.29 A: H&E Färbung von Gefrierschnitten der WT Lunge. Die histologische Analyse der Lunge von WT Mäusen wurde vor sowie an Tag 9 p.i. mit 10^5 ME49 Tachyzoiten durchgeführt (Vergrößerungen wie angegeben; A: Alveolen, aW: alveoläre Wand).

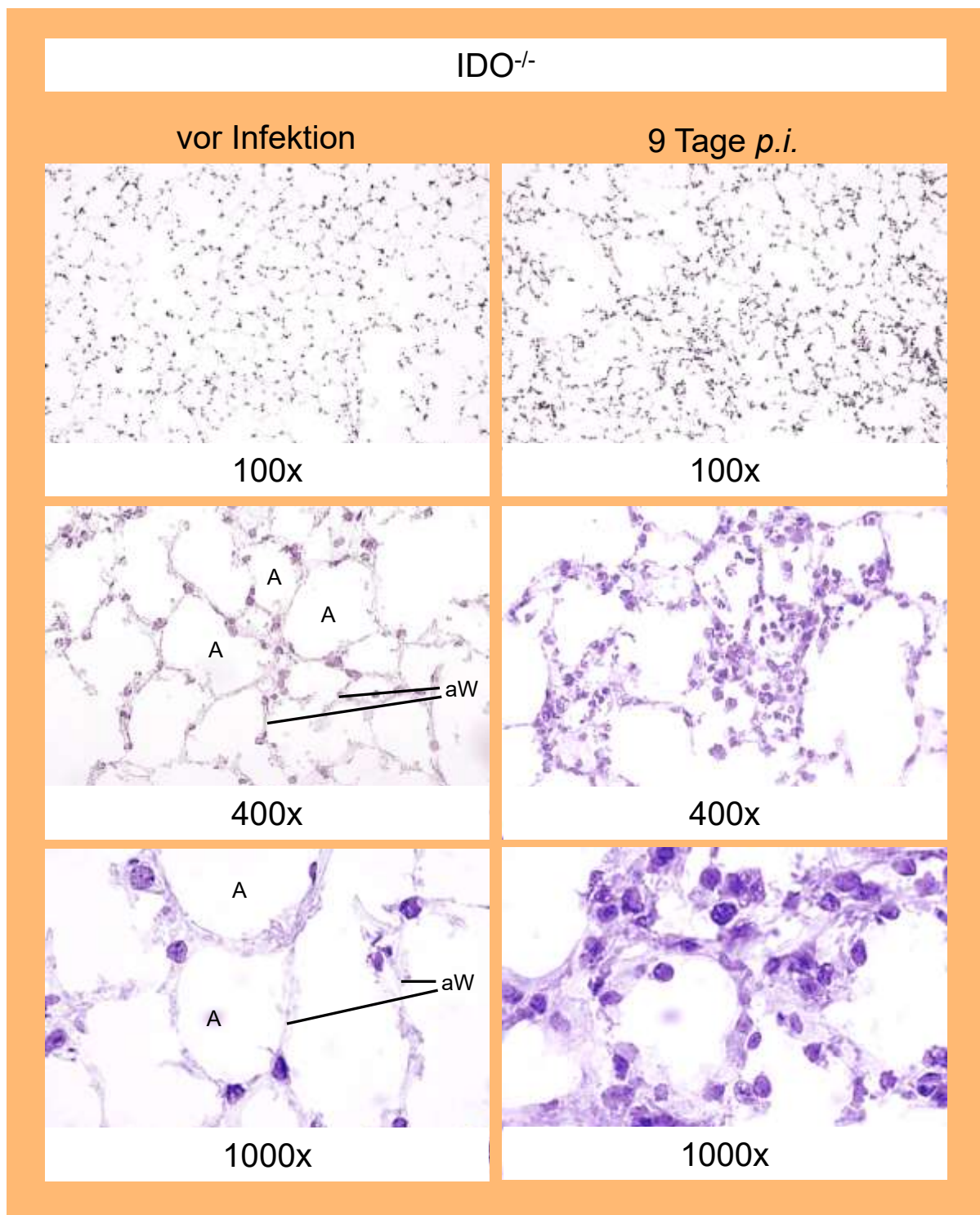


Abbildung 3.29 B: H&E Färbung von Gefrierschnitten der IDO^{-/-} Lunge. Die histologische Analyse der Lunge von IDO^{-/-} Mäusen wurde vor sowie an Tag 9 p.i. mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten durchgeführt (Vergrößerungen wie angegeben; A: Alveolen, aW: alveoläre Wand).

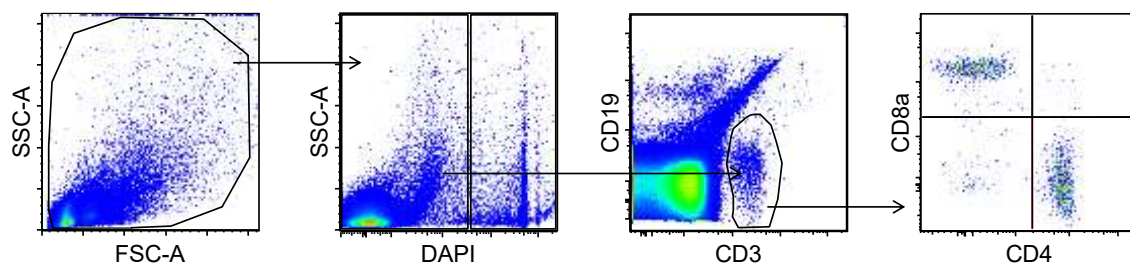
Exakte quantitative Befunde sind mit histologischen Untersuchungen kaum zu erreichen, daher wurde zusätzlich eine Quantifizierung mit gleichzeitiger Typisierung der infiltrierenden Zellen in der Lunge mittels Durchflusszytometrie vorgenommen.

Erneut wurden Mäuse beider Genotypen mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert. Zur Kontrolle blieb eine Gruppe je Genotyp uninfiziert. Nach Entnahme der Lunge vor bzw. 7 und 9 Tage

p.i. und Präparation der Zellen über Percoll, wurden NK-Zellen, dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen mittels spezifischer Antikörperfärbungen im Fluoreszenz aktivierten Zell Scanner (FACS) analysiert. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von T-Zellen gezeigt, da ausschließlich dieser Zelltyp eine signifikante Veränderung im Verlauf der Toxoplasmeninfektion aufwies.

Abbildung 3.30 A zeigt exemplarisch die verwendete *Gating*-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse einer uninfizierten WT Maus. Zellen mit ungewöhnlich hohem Volumen oder starker Granularität wurden mittels FSC-A vs. SSC-A basiertem Ausschluss diskriminiert. Im Weiteren wurden tote Zellen (DAPI⁺) von der Analyse ausgeschlossen. Auch B-Zellen (CD19⁺) wurden in dieser *Gating*-Strategie ausgeschlossen. Von Interesse waren ausnahmslos T-Zellen (CD3⁺). Darüber hinaus konnten die CD3⁺ T-Zellen mit Hilfe von weiteren spezifischen Markern in vier Subtypen, die eine bedeutsame Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen einnehmen, unterteilt werden. Diese sind einfach positive CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen, CD4⁺/CD8⁺ doppelt positive und doppelt negative T-Zellen.

A



B

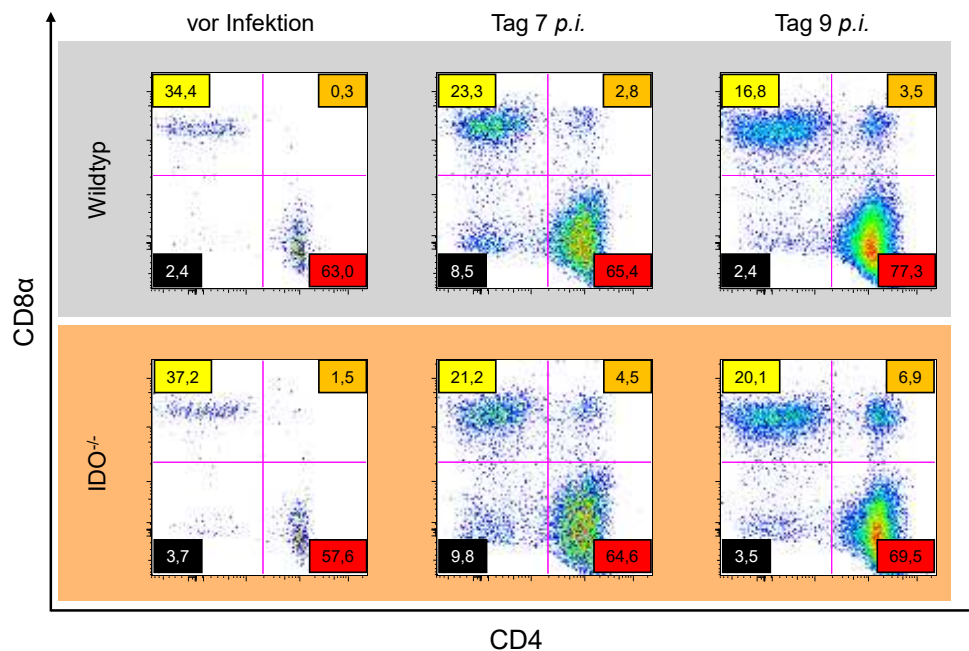


Abbildung 3.30: Gating-Strategie und exemplarische Falschfarben-Blots der FACS Analyse CD4 und CD8 positiver T-Zellen in der Lunge von WT und IDO^{-/-} Mäusen vor sowie 7 und 9 Tage nach *i.p.* Infektion mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Es wurden ausschließlich DAPI negative, CD3 positive Zellen analysiert (A). (B) zeigt die exemplarische Verteilung von CD4 bzw. CD8 positiven/negativen T-Zellen vor und an Tag 7 und 9 *p.i.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Ergebnisse für WT Mäuse sind grau, die für IDO^{-/-} Mäuse apricotfarben hinterlegt.

Abbildung 3.30 B zeigt exemplarische Falschfarben-Blots der FACS-Analyse CD3 positiver T-Zellen in der Lunge einer WT und einer IDO^{-/-} Maus im Verlauf der Infektion. Dabei ist zu erkennen, dass die Verteilung der T-Zell-Subtypen in der Lunge einer WT Maus (grau hinterlegt) vor der Infektion vergleichbar mit der in der Lunge einer IDO^{-/-} Maus ist (apricotfarben hinterlegt). Den größten Anteil nehmen hier CD4 und CD8 einfach positive T-Zellen ein. Im Verlauf der Infektion verändert sich das Verhältnis dieser Zellen. Besonders deutlich ist die Zunahme der CD4⁺ Zellen sowie das Auftreten doppelt positiver Zellen bei beiden Genotypen (Abbildung 3.30 B).

Alle vergleichend durchgeführten Analysen von WT Tieren und IDO^{-/-} Tieren zur T-Zellsubtypisierung sind in Abbildung 3.31 zusammengefasst.

Insgesamt finden sich in der gesamten Lunge des WT vor Infektion etwa $1,2 \times 10^5$ CD3⁺ Zellen. Nicht infizierte IDO^{-/-} Mäuse erreichen einen geringeren Wert von etwa $0,6 \times 10^4$ CD3⁺ Zellen pro Lunge (Abbildung 3.31 A). An Tag 7 *p.i.* ist keine infektionsbedingte Steigerung CD3 positiver Zellen in der Lunge zu ermitteln. Erst am nächsten Analysezeitpunkt (Tag 9 *p.i.*) ist eine enorme Steigerung der Anzahl CD3 positiver Zellen in den Lungen zu verzeichnen. In der Lunge des WT befinden sich dabei mehr Zellen als in der Lunge der IDO defizienten Maus (Abbildung 3.31 A).

Die vier analysierten Subtypen CD3 positiver Zellen (CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻) sind zur aussagekräftigeren Darstellung in Abbildung 3.31 B bis E separat abgebildet. Dabei ist anhand Abbildung 3.31 B eindeutig zu erkennen, dass besonders die Anzahl CD4 positiver Zellen in der Lunge beider Genotypen an Tag 9 *p.i.* signifikant erhöht ist: Während die Menge CD4 positiver T-Zellen in der Lunge des WT vor der Infektion bei $6,8 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^3$ liegt, erhöht sie sich an Tag 9 *p.i.* auf $5,4 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ Zellen pro Lunge, was einer Steigerung um den Faktor 8 entspricht. In der Lunge von IDO^{-/-} Mäusen kann vor der Infektion ein Wert von $3,1 \times 10^4 \pm 7,6 \times 10^2$ an CD4 positiven T-Zellen ermittelt werden. Dieser Wert steigt an Tag 9 *p.i.* auf $3,5 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^4$ Zellen an, was einer signifikanten Erhöhung um den Faktor 11 entspricht. Insgesamt ist die Anzahl CD4 positiver Zellen in der Lunge der WT Tiere im Vergleich zur Lunge der IDO defizienten Tieren signifikant höher.

Auch die Anzahl CD8 positiver Zellen in der Lunge nimmt infektionsbedingt zu. Während die Anzahl CD8 positiver Zellen in WT-Lungen vor der Infektion bei $5 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^3$ liegt, steigt sie an Tag 9 *p.i.* auf $1,4 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$ Zellen an, was einer dreifachen Steigerung entspricht. Eine solche Zunahme ist ebenso in der Lunge der IDO defizienten Tiere zu erkennen: Die Anzahl der CD8⁺ Zellen liegt dabei vor der Infektion bei $2,1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^3$ und erhöht sich um den Faktor 4,4 auf $9,4 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$ Zellen in der Lunge (Abbildung 3.31 C). Die Anzahl der CD8 positiven Zellen ist zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Tag 9 *p.i.*, Student's t-Test).

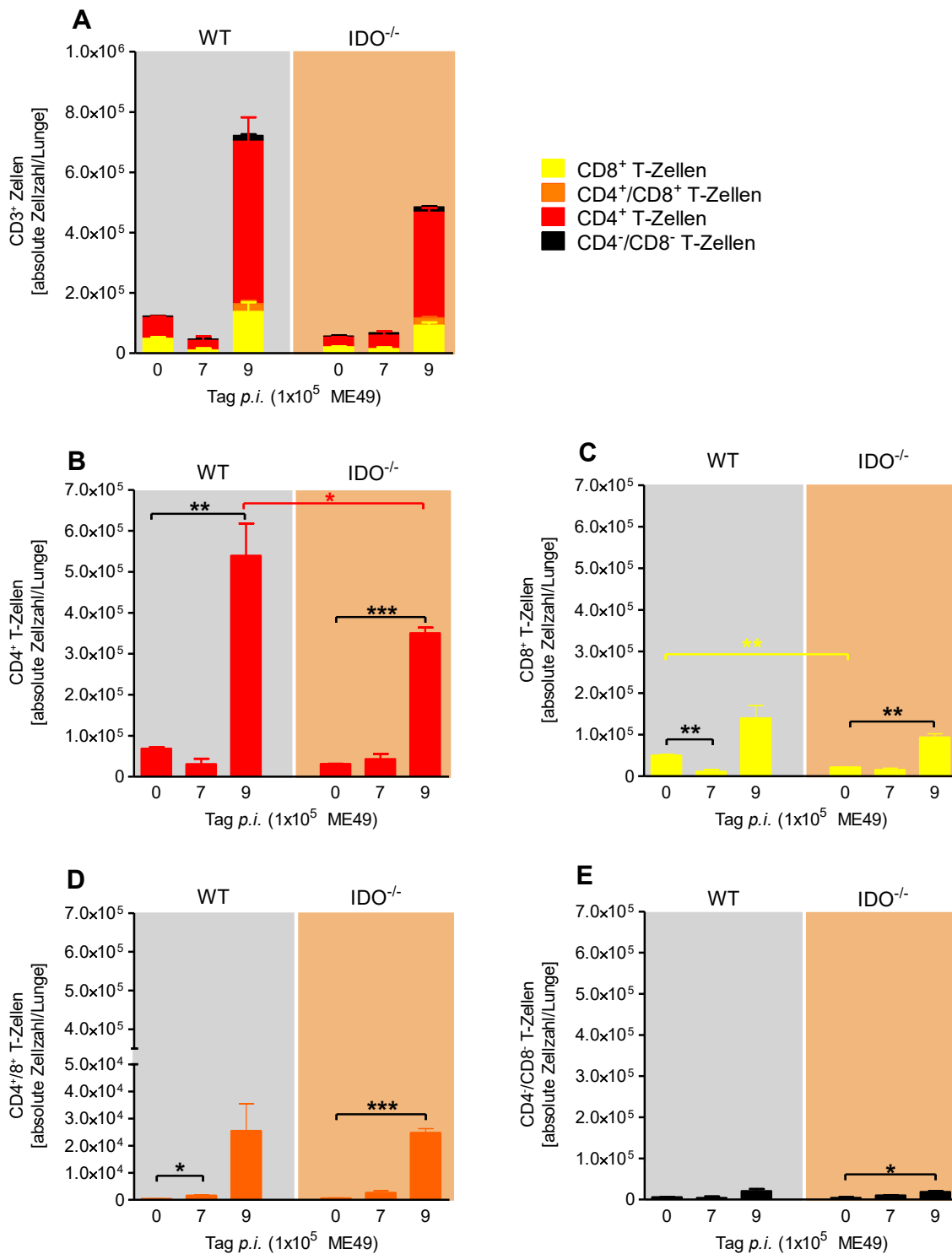


Abbildung 3.31: Quantifizierung der Subtypen CD3 positiver Zellen in der Lunge von WT und IDO defizienten Mäusen vor sowie 7 und 9 Tage p.i. mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten. Die Analyse wurde mittels FACS durchgeführt. Die Anzahl der Zellen wurde zur Normalisierung auf die Gesamtanzahl gezählter Lungenzellen hochgerechnet. DAPI⁺ Zellen wurden ausgeschlossen. (A) zeigt das Verhältnis der differenziell regulierten Subtypen CD3⁺ Zellen im Verlauf der Infektion. In den Grafiken (B) – (E) wurde das Verhältnis der CD3⁺ Subtypen im Einzelnen aufgetragen. (B) CD4⁺ T-Zellen, (C) CD8⁺ T-Zellen, (D) CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, (E) CD4⁻ und CD8⁻ Zellen. Ergebnisse von WT Mäusen sind grau, die von IDO^{-/-} Mäusen apricot hinterlegt (Mittelwerte ± SEM, n = 3, Ausnahme: n = 2 für Tag 0 p.i., beide Genotypen, gemittelt aus einem Versuchsansatz, signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet und beziehen sich auf die jeweilige uninferzierte Kontrolle (schwarze Asterisks) oder auf die Genotypen untereinander (farbige Asterisks). Für p ergibt sich: * ≤ 0,05; ** ≤ 0,005; *** ≤ 0,0005).

Zusätzlich erhöht sich der Anteil CD4/CD8 doppelt positiver Zellen in der Lunge beider infizierter Genotypen. Während die Kontroll-Tiere des wildtypischen Genotyps (Tag 0) lediglich 336 ± 95 CD4⁺/CD8⁺ Zellen pro Lunge aufweisen, erhöhen sich die Werte an Tag 9 p.i. um den Faktor 76 auf $2,5 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ Zellen. IDO defiziente, nicht infizierte Tiere erreichen mit 566 ± 240 doppelt positiven Zellen einen ähnlichen Normwert wie die WT Tiere. An Tag 9 p.i. erhöht sich der Prozentsatz hierbei um den Faktor 43 auf ebenfalls $2,5 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^3$ Zellen (Abbildung 3.31 D).

Auch CD4/CD8 doppelt negative Zellen werden während der Infektion in der Lunge beider Genotypen hochreguliert (Abbildung 3.31 E). WT Tiere erreichen hierbei einen Normwert von $5,6 \times 10^3 \pm 8,6 \times 10^2$ CD4⁻/CD8⁻ Zellen, IDO defiziente Tiere erreichen mit durchschnittlich $4 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^3$ einen vergleichbaren Wert. An Tag 9 p.i. erhöht sich der Anteil doppelt negativer T-Zellen in der Lunge der WT Tiere auf durchschnittlich $2,1 \times 10^4 \pm 7,4 \times 10^3$ bzw. bei IDO defizienten Tieren auf $1,8 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^3$ Zellen pro Lunge, was einer Steigerung um den Faktor 4 bzw. 5 entspricht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lungen von WT und IDO^{-/-} Mäusen ein erhöhtes infektionsbedingtes Gewicht aufweisen (Abbildung 3.20). Des Weiteren konnte die Expression des IDO-Proteins in der Lunge infizierter WT Mäuse detektiert werden (Abbildung 3.26). Zusätzlich konnte eine infektionsbedingte IDO-Aktivität in der Lunge von WT Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Es zeigte sich, dass sich die Tryptophan-auxotrophen Parasiten in der Lunge der IDO defizienten Mäuse stärker vermehren können (Abbildung 3.27), als in der Lunge von WT Tieren. Überdies ist eine stärkere Entzündungsantwort, gemessen an proinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. IFN γ und CCL2, in der Lunge von IDO^{-/-} Tieren zu finden (Abbildung 3.28). Die zytometrischen Analysen belegen, dass sowohl in der Lunge der WT Tiere als auch in der Lunge IDO defizienter Tiere eine starke Infiltration von CD4⁺, CD8⁺ sowie CD4 und CD8 doppelt positiven und doppelt negativen Zellen stattfindet. Besonders auffällig ist dabei die signifikant höhere Anzahl CD4 positiver Zellen in der Lunge von WT Tieren verglichen mit IDO^{-/-} Tieren (Abbildung 3.31).

3.4. Vergleichende Infektionsstudien an WT und IDO defizienten Tieren

IDO^{-/-} Mäuse weisen nach der Toxoplasmeninfektion einen eindeutigen Phänotyp auf, wobei sich Unterschiede zu WT Mäusen insbesondere im Lungengewebe manifestieren: In IDO defizienten Mäusen ist nach einer Infektion mit *T. gondii* eine höhere Parasiten-Last, eine signifikant erhöhte IFN γ -Konzentration sowie eine geringere Anzahl CD4 positiver T-Zellen in der Lunge nachweisbar. Ob diese Veränderungen Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der Toxoplasmose haben, wurde im Folgenden in Überlebensstudien analysiert.

3.4.1. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 2 *T. gondii* Infektion

WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden *i.p.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert und ihr Überleben bis zu Tag 60 *p.i.* beobachtet. Sobald sich der Zustand der Tiere, definiert durch Abbruchkriterien wie Apathie, Sträuben des Fells, Ausbildung eines Buckels oder drastischem Gewichtsverlust enorm verschlechterte, wurden die Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

Abbildung 3.32 zeigt die infektionsbedingte Sterblichkeit von WT und IDO^{-/-} Mäusen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. In der akuten Phase der Infektion, die zwischen Tag 0 und Tag 21 *p.i.* liegt, beträgt die Überlebensrate von WT Mäusen etwa 63%. IDO^{-/-} Mäuse weisen mit 58% einen vergleichbaren Wert auf. Auch in der chronischen Phase der Infektion (> Tag 21 *p.i.*), kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ermittelt werden. Das Ende der Beobachtungsphase erreichten 37% der WT Tiere, während die Überlebensrate bei IDO^{-/-} Mäusen bei knapp 30% lag und somit nicht signifikant unterschiedlich war.

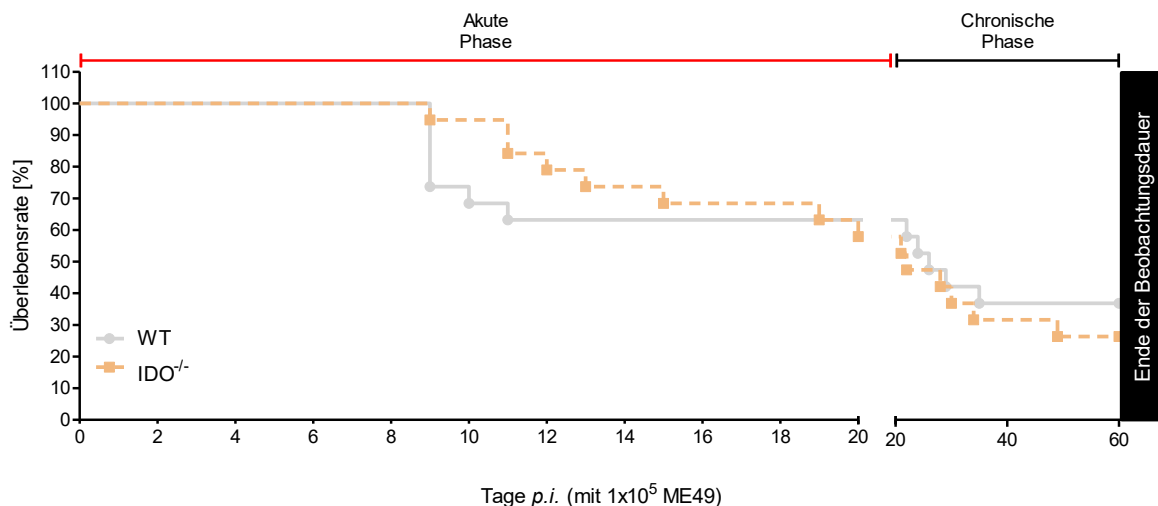


Abbildung 3.32: Überlebensanalyse von WT und IDO defizienten Mäusen im Verlauf einer *T. gondii* Infektion. WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden *i.p.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben uninfiziert (Daten nicht gezeigt). Die Grafik zeigt den ermittelten Zeitpunkt des infektionsbedingten Versterbens der Mäuse bei einer Beobachtungsdauer von 60 Tagen unter Berücksichtigung definierter Abbruchkriterien. WT Mäuse sind in grau, IDO^{-/-} Mäuse in apricot dargestellt. Werte sind aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 5 - 7 Mäusen/Gruppe zusammengefasst (insgesamt: n = 19).

3.4.2. Gewichtsveränderungen im Verlauf einer Typ 2 *T. gondii* Infektion

Parallel zu der Analyse der Überlebensrate wurden Veränderungen im Gewicht ermittelt. Diese Art der Analyse wurde durchgeführt, um kleinere Unterschiede in der Schwere der Infektion zu erkennen. In Abbildung 3.33 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass sowohl WT als auch IDO^{-/-} Mäuse gleichermaßen eine infektionsbedingte Abnahme ihres Gewichtes erleiden. Ab Tag 8 *p.i.* ist das ermittelte Gewicht der Tiere beider Genotypen im Vergleich zur jeweiligen uninfizierten Kontrolle (Tag 0) signifikant verringert: Die Abnahme beträgt bei WT Mäusen etwa 6% ± 4% bzw. 4% ± 4% des Ausgangsgewichtes bei den IDO^{-/-} Tieren. An Tag 9 *p.i.* beträgt die Abnahme bereits 10% ± 6% bzw. 8% ± 5%. Am Analysetag 11 *p.i.* ist die Abnahme weiter auf 12% ± 7% beim WT bzw. auf 8% ± 8% bei den IDO defizienten Tieren gestiegen. Im weiteren Verlauf ist diese stetige infektionsbedingte Abnahme weiterhin bei beiden Genotypen zu erkennen. Die maximale Abnahme liegt hier an Tag 27 *p.i.* beim WT bei 21% ± 11%, sowie bei IDO defizienten Tieren bei 25% ± 12%. Die Tiere, die eine Gewichtsreduktion von mehr als 20% aufzeigten, fielen zwar grundsätzlich unter die definierten Abbruchkriterien, konnten jedoch wegen ihres ansonsten guten Allgemeinzustandes meist im Versuch belassen werden.

Des Weiteren ist bei beiden Genotypen etwa ab Tag 21 *p.i.* zu erkennen, dass die Abnahmen stagnieren. Das Körpergewicht der infizierten Tiere steigt zudem ab Tag 30 *p.i.* wieder stetig an, sodass die Tiere, die die akute Phase der Infektion überlebt hatten, am Ende der Beobachtungsphase wieder nahezu ihr Anfangsgewicht erreichten. WT Tiere erreichten dabei an Tag 60 *p.i.* ein Wert von 96% ± 5% ihres Ausgangsgewichts, IDO defiziente Mäuse erreichten zu diesem finalen Zeitpunkt einen Prozentsatz von 98% ± 11%.

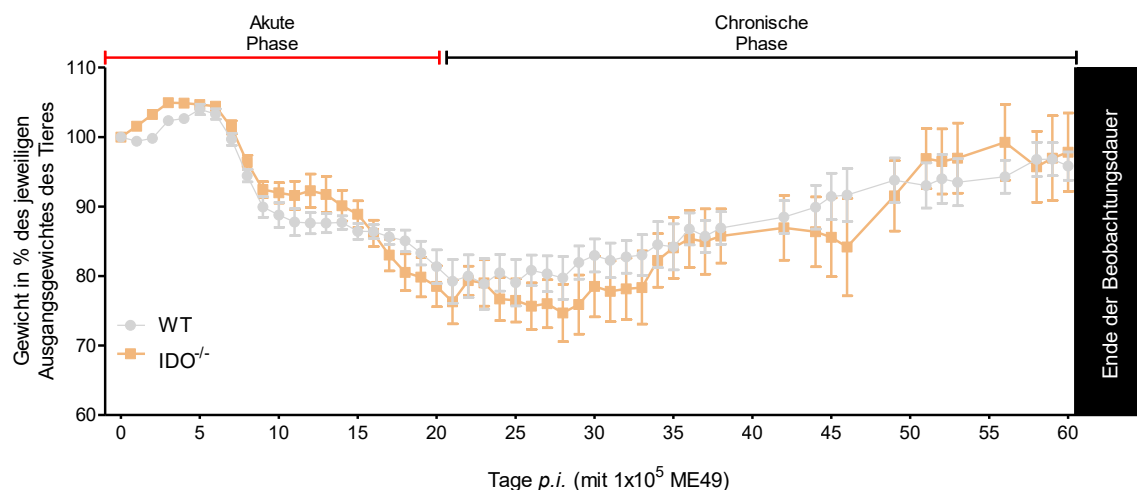


Abbildung 3.33: Infektionsbedingte Gewichtsabnahme bei WT und IDO defizienten Mäusen.

Mäuse beider Genotypen wurden *i.p.* mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben uninfiziert (Daten nicht gezeigt). Um den prozentualen Gewichtsverlust angeben zu können, wurde das Gewicht vor der Infektion ermittelt und als 100% definiert. In der Grafik dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 – 7 Mäusen/Gruppe (insgesamt: n = 19).

Da in der Lunge IDO defizienter Tiere zwar eine erhöhte Parasiten-Last nachgewiesen wurde, das Fehlen des Enzyms in IDO^{-/-} Tieren jedoch keine messbare Auswirkung auf die Überlebensrate oder den Schweregrad der Infektion hat, sollte mit dem folgenden Experiment geklärt werden, ob weitere Effektormechanismen innerhalb der Lunge aktiviert sind, die während einer Toxoplasmeninfektion antiparasitär wirken können. Da insbesondere Guanosintriphosphatasen (GTPasen) bekannt dafür sind gegen Toxoplasmeninfektionen zu wirken (Degrandi et al., 2013), wurden die Homogenisate der Lungen von WT und IDO^{-/-} Tieren vor sowie an Tag 7, 9 und 11 *p.i.* auf das Vorhandensein zweier ausgewählter GTPasen mittels Western Blot Analyse untersucht. Dabei wurden die 65 kDa große GTPase mGBP2 (murines Guanylat-bindendes Protein 2) und die 47 kDa große GTPase mIRGa6 (murine *immunity related* GTPase a6) als Zielproteine ausgewählt, da beide Proteine direkte antiparasitäre Funktionen vermitteln (Degrandi et al., 2013; Liesenfeld et al., 2011). Als Kontrollen wurden ebenfalls Antikörper gegen die IDO und gegen β -Aktin (Ladekontrolle) verwendet. Das Ergebnis dieser Western Blot Analyse ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Pro Analyse-Zeitpunkt und Genotyp wurden Lungen-Homogenisate von je zwei Versuchstieren analysiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass vor der Infektion weder die GTPasen mGBP2 oder mIRGa6, noch das Protein IDO zu detektieren sind. Während das IDO-Protein an Tag 7, 9 und 11 *p.i.* erwartungsgemäß ausschließlich im WT zu finden ist, ist die Hochregulation beider analysierten GTPasen sowohl in der Lunge des WT als auch in der der IDO^{-/-} Mäuse zu erkennen (Abbildung 3.34 A).

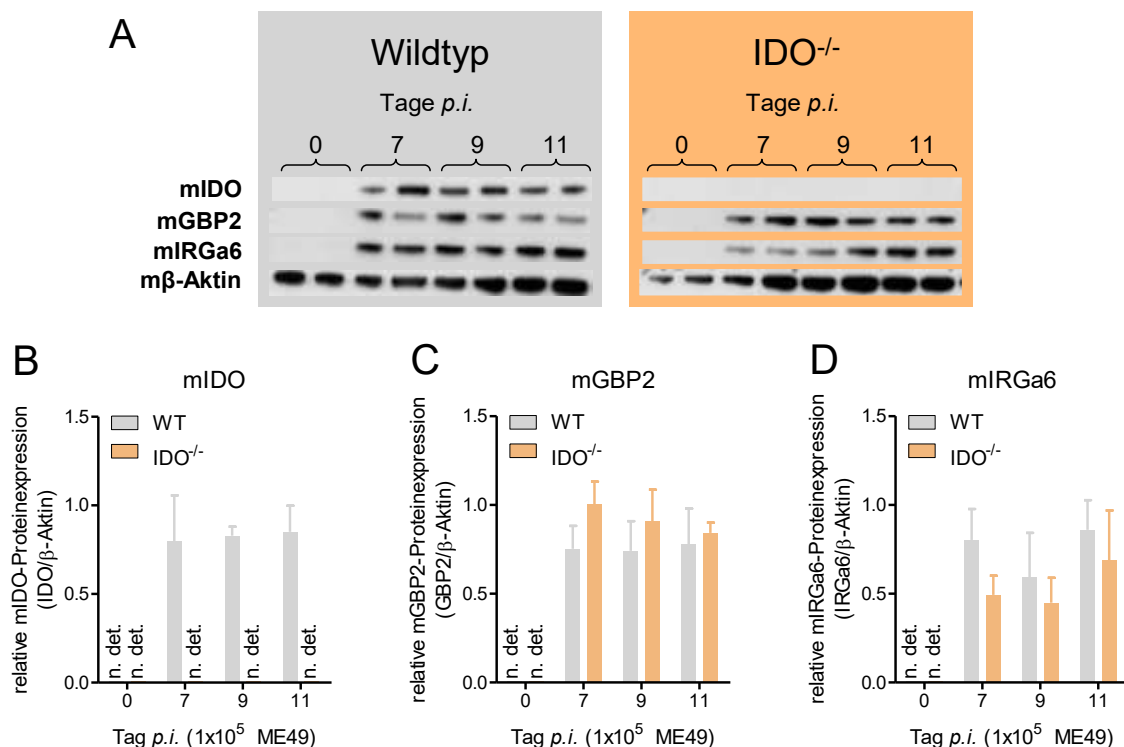


Abbildung 3.34: Exemplarische Western Blot Analyse zum Nachweis der IDO und GTPasen in der Lunge von WT und IDO^{-/-} Mäusen im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* (A) sowie die densitometrische Auswertung der Bandenintensität von IDO (B), GBP2 (C) und IRGa6 (D) jeweils normiert auf β -Aktin. Die Tiere wurden i.p. mit 10⁵ ME49 Tachyzoiten infiziert oder blieben uninfiziert. Die Abbildung zeigt die An- bzw. Abwesenheit der jeweiligen Proteine vor sowie 7, 9 und 11 Tage *p.i.* Es wurden exemplarisch zwei Individuen pro Genotyp gewählt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Für die densitometrische Auswertung wurden die Ergebnisse von vier Tieren je Genotyp und je Zielprotein zusammengefasst.

Die zusätzliche densitometrische Quantifizierung der jeweiligen Bandenintensitäten zeigt, dass die Expression der IDO ausschließlich in der Lunge von WT Tieren detektierbar ist (Abbildung 3.34 B). Überdies konnte ermittelt werden, dass WT und IDO defiziente Tiere keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Proteinexpression von GBP2 (Abbildung 3.34 C) oder IRGa6 (Abbildung 3.34 D) aufweisen.

Zusammenfassend konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sterblichkeit oder in der Gewichtsabnahme zwischen Toxoplasmen-infizierten WT und IDO^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abbildung 3.32 und 3.33). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur die IDO in der Lunge der WT Mäuse infektionsbedingt hochreguliert wird, sondern auch GBP2 und IRGa6, die beide, IDO-unabhängig, protektive Effekte im Rahmen einer Toxoplasmose vermitteln können (Abbildung 3.34).

3.4.3. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 1 *T. gondii* Infektion

Die IDO ist für das Überleben der Experimentaltiere während einer Infektion mit einem Typ 2 Toxoplasmen Stamm nicht essentiell. Es ist aber bekannt, dass GTPasen ausschließlich bei einer Infektion mit Toxoplasmen des Typ 2 bzw. 3 effektiv sind (Degrandi et al., 2007; Zhao et al., 2009). Entsprechend stellte sich die Frage, ob das Überleben von Mäusen während einer Infektion mit einem hoch virulenten Typ 1 Stamm IDO-abhängig sein könnte. Daher wurden WT und IDO^{-/-} Mäuse mit 10³ Tachyzoiten des Typ 1 Stammes RH infiziert und ihre Überlebensrate analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.35 zu sehen. Zum Vergleich sind hier auch die Überlebensraten von WT und IDO^{-/-} Tieren nach einer Typ 2 Toxoplasmeninfektion abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl 100% der WT als auch 100% der IDO^{-/-} Tiere bereits 10 Tage nach der Typ 1 Infektion die definierten Abbruchkriterien erfüllen, sodass sie aus dem Versuch genommen werden mussten. Eine Relevanz des IDO^{-/-} Proteins für das Überleben der Tiere konnte daher auch in dieser Analyse nicht ermittelt werden.

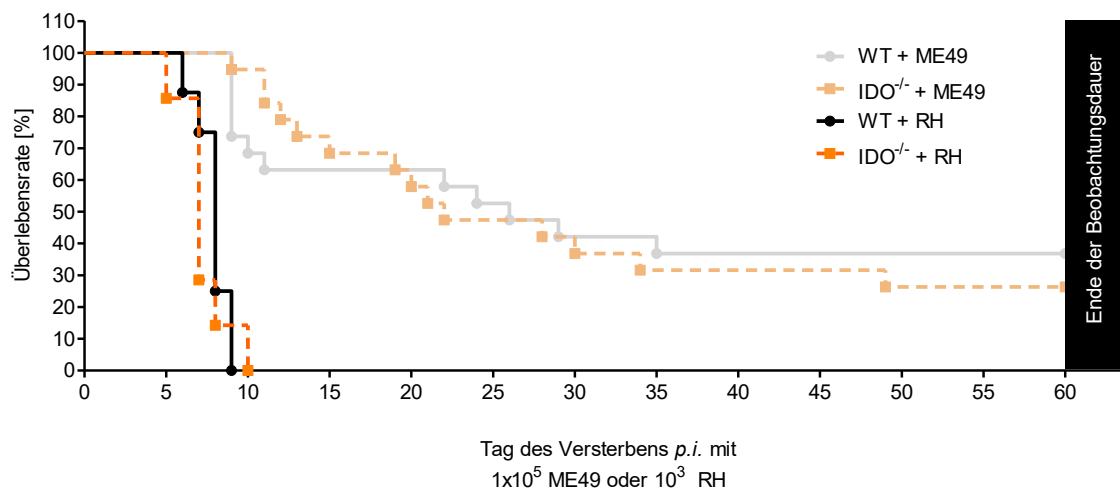


Abbildung 3.35: Überlebensanalyse nach Infektion mit einem Typ 1 *T. gondii* Stamm im Vergleich mit einem Typ 2 *T. gondii* Stamm. WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden i.p. mit 10³ Tachyzoiten eines Typ 1 *T. gondii* Stammes (RH) bzw. mit 10⁵ Tachyzoiten eines Typ 2 *T. gondii* Stammes (ME49) infiziert. Die Grafik zeigt den ermittelten Zeitpunkt des infektionsbedingten Versterbens der Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 60 Tagen an. WT Mäuse sind in schwarz (Typ 1) oder grau (Typ 2), IDO^{-/-} Mäuse in orange (Typ 1) oder apricot (Typ 2) dargestellt. Bei der Infektion mit Typ 2 Parasiten sind die Werte aus 3 unabhängigen Versuchen zusammengefasst (insgesamt: n = 19). Bei der Infektion mit Typ 1 Parasiten wurden ebenfalls drei unabhängige Versuche durchgeführt (insgesamt: n = 8 für WT, n = 7 für IDO^{-/-}).

3.4.4. Überlebens-Analysen im Verlauf einer Typ 1 *T. gondii* Infektion nach Immunisierung mit Typ 2 *T. gondii* Tachyzoiten

Um zu analysieren, ob das Enzym IDO eine Rolle für die Ausbildung einer protektiven Immunität spielt, wurden WT und IDO^{-/-} Mäuse zunächst mit 10⁴ ME49 Tachyzoiten infiziert. Diese Dosis löste eine apparente Toxoplasmose aus, erlaubt aber eine hohe Überlebensrate der Experimentaltiere. Das Ergebnis dieser Immunisierung ist in Abbildung 3.36 zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass 90% der WT Tiere eine Infektion mit 10⁴ ME49 Tachyzoiten überleben. IDO defiziente Tiere überleben diese Infektion zu 80%.

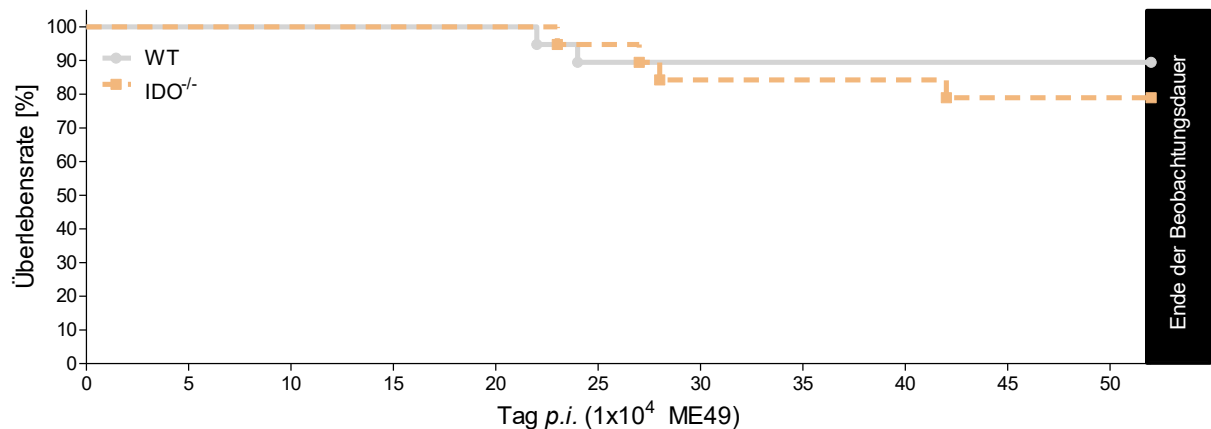


Abbildung 3.36: Überlebensanalyse von WT und IDO^{-/-} Mäusen bei Infektion mit 10⁴ Tachyzoiten des Typ 2 Toxoplasmen Stammes ME49. Tiere wurden i.p. infiziert. Die Grafik zeigt den ermittelten Zeitpunkt des infektionsbedingten Versterbens der Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 52 Tagen an. WT Mäuse sind in grau, IDO^{-/-} Mäuse in apricot dargestellt. Die Infektion wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (insgesamt: n = 19 für beide Genotypen).

Im nächsten Schritt wurde nun überprüft, ob die überstandene ME49 Infektion eine Immunisierung induziert hatte, die protektiv gegen eine üblicherweise letale Infektion mit Toxoplasmen des Typ 1 Stammes (RH) wirkt. Dafür wurden die ME49-geimpften Mäuse mit 10³ RH Tachyzoiten infiziert und ihre Überlebensrate über einen Zeitraum von 21 Tagen ermittelt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass WT und IDO^{-/-} Tiere, die zu Kontrollzwecken keine vorherige Immunisierung mit einem Typ 2 Toxoplasmen Stamm erfahren haben, erwartungsgemäß innerhalb von 10 Tagen (schwarze bzw. orangene Linie) zu 100% versterben. Betrachtet man Mäuse, die eine erste Dosis des Typ 2 Stammes ME49 überlebt hatten und eine zweite Infektionsdosis mit einem tödlichen Typ 1 Stamm erhielten, so sieht man, dass beide Genotypen eine deutlich höhere Überlebensrate aufweisen. Die Überlebensrate nach einer RH Infektion liegt bei immunisierten WT Tieren bei 93%. Im Vergleich dazu wurde eine Überlebensrate von 75% bei IDO defizienten Tieren ermittelt. Die statistische Analyse mittels log-rank-Test (Mantel-Cox) zeigt, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist.

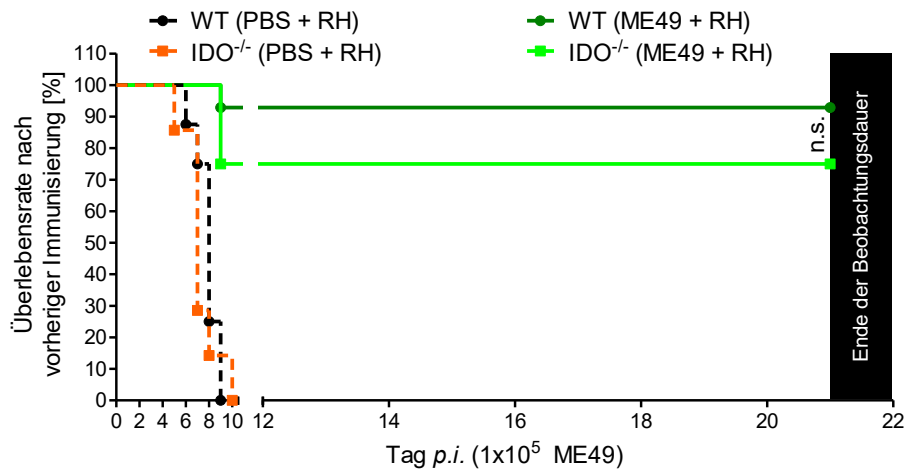


Abbildung 3.37: Analyse der Immunisierungs-Effektivität nach i.p. Infektion mit 10^4 Tachyzoiten des Typ 2 Toxoplasmen Stammes ME49 auf eine nachfolgende i.p. Infektion mit 10^3 Tachyzoiten des Typ 1 Stammes RH. Eine Gruppe blieb als Kontrolle unimmunisiert. Die Überlebensrate wurde über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen beobachtet. Die Grafik zeigt den ermittelten Zeitpunkt des infektionsbedingten Versterbens der Mäuse an. Bei einer erfolgten Immunisierung mit ME49 und folgender RH Infektion sind WT Mäuse in dunkelgrün, IDO^{-/-} Mäuse in hellgrün dargestellt (WT: $n = 14$, IDO^{-/-}: $n = 12$; gemittelt aus zwei unabhängigen Versuchen). Bei nicht erfolgter Immunisierung mit ME49 und nachfolgender RH Infektion sind WT Mäuse in schwarz, IDO^{-/-} Mäuse in orange dargestellt (WT: $n = 8$, IDO^{-/-}: $n = 7$; gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen, n.s.: nicht signifikant, log-rank-Test (Mantel-Cox)).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass WT sowie IDO^{-/-} Mäuse gleichermaßen eine Typ 1 Infektion überleben können, sofern sie zuvor eine Immunisierung mit einem Typ 2 Stamm überstanden haben (Abbildung 3.37). Das bedeutet, dass die Fähigkeit eine protektive Immunisierung auszubilden durch die Deletion der IDO nicht signifikant eingeschränkt ist.

4. Diskussion

In humanen Zellkultursystemen ist die antiparasitäre Funktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) gut belegt. Die IDO wird nach IFN γ -Stimulation in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und kann *in vitro* das Wachstum vieler Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten) inhibieren (Adams et al., 2004; Heseler et al., 2008; MacKenzie et al., 2003; Meisel et al., 2011; Müller et al., 2009; Oberdörfer et al., 2003). Diese IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte können durch Supplementation der Kulturmedien mit großen Mengen an Tryptophan aufgehoben werden (Heseler et al., 2008). Dazu passen auch Experimente von Sibley et al., die zeigen, dass Toxoplasmen, die das *trpB*-Gen von *Escherichia coli* tragen und somit Tryptophan synthetisieren können, durch IDO-positive Zellen nicht mehr am Wachstum gehindert werden (Sibley et al., 1994). Auch die Zugabe des IDO Inhibitors 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) führt zu einer Blockade des IDO-vermittelten antiparasitären Effekts (Heseler et al., 2008). Als weiterer Beweis für die Abwehrleistung der IDO können auch Experimente dienen, bei denen antisense RNS verwendet wurden, um die IDO-Expression zu inhibieren (Zimmermann et al., 2014). Der wichtigste Induktor der IDO in humanen Zellen ist IFN γ . Um auszuschließen, dass weitere IFN γ -induzierte Gene an der IDO-vermittelten Abwehrfunktion beteiligt sind, wurden Experimente mit humanen Zellen durchgeführt, die konstitutiv oder induzierbar das IDO-Protein exprimieren. Wie erwartet waren auch diese Zellen, bei denen die IDO ohne IFN γ -Zugabe stimuliert wurde, in der Lage antimikrobielle Effekte durch die Degradation von Tryptophan zu vermitteln (Dai et al., 1994). *In vivo* Beweise für eine antimikrobielle Funktion der IDO-vermittelten Effektorleistung gegen Pathogene gibt es im Humansystem bisher nicht. Jedoch wurde bei vielen Infektionskrankheiten des Menschen eine Verringerung des Tryptophan-Spiegels und eine Erhöhung des Kynurenin-Spiegels im Serum gemessen (Chen und Guillemin, 2009). Damit ist klar, dass die IDO im Menschen im Rahmen von (Infektions-) Krankheiten induziert wird.

In murinen Zellkultursystemen gibt es bisher keine eindeutigen Nachweise bezüglich der Expression der IDO und ihrer antiparasitären Funktion. Weder in murinen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) (Meisel et al., 2011), noch in murinen Epithelzellen (Nelson et al., 2005) oder in murinen Makrophagen sowie Fibroblasten (Roshick et al., 2006) konnte die Expression des IDO-Proteins nach IFN γ -Stimulation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde das IDO-Protein in murinen Zellen in *ex vivo* und *in vivo* Analysen häufig nachgewiesen: So fanden z. B. Hansen et al. eine starke IDO-Immunreaktivität in Endothelzellen von Mäusen, die mit Plasmodien infiziert waren (Hansen et al., 2004). Die Gruppe von Mackler et al. fand IDO-Immunreaktivität in Stromazellen der murinen Plazenta nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* (Mackler et al., 2003) und die Gruppe von Sage et al. konnte die IDO-Aktivität in der Lunge von Mäusen, die mit Influenzaviren infiziert waren, nachweisen (Sage et al., 2014). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu bestimmen, ob die IDO *in vivo* im Rahmen der murinen Toxoplasmose antiparasitäre Effekte auslösen kann. In der Literatur gibt es hierzu relevante Vorbefunde: Die Arbeitsgruppe um Silva et al. zeigte bereits, dass die Infektion mit *T. gondii* Zysten im Mausmodell zu einer Hochregulation des funktionellen IDO-

Proteins in der Lunge infizierter Mäuse führt (Silva et al., 2002). Außerdem konnten Divanovic et al. zeigen, dass die Administration des IDO-Inhibitors 1-MT während einer Toxoplasmeninfektion zu einer erhöhten Mortalität der infizierten Tiere in der chronischen Phase der Infektion führt (Divanovic et al., 2012). Dies sind wichtige Hinweise darauf, dass der IDO eine bedeutende Rolle während der Infektion mit *T. gondii* zukommen könnte. Divanovic et al. zeigten in ihren Infektionsstudien, dass sowohl die Verwendung des kompetitiven IDO-Inhibitors 1-Levo-MT (1-L-MT), als auch die Verwendung von 1-Dextro-MT (1-D-MT) eine erhöhte Mortalitätsrate Toxoplasmen-infizierter Mäuse verursacht. Biochemische Analysen zeigen jedoch, dass nur 1-L-MT ein kompetitiver Inhibitor der IDO-Aktivität ist (Löb et al., 2009b). 1-D-MT ist kein direkter IDO-Inhibitor, kann jedoch über die Interaktion mit dem *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) indirekt IDO-vermittelte Effekte antagonisieren (Metz et al., 2012). Daher ist es fraglich, ob die erhöhte Sterblichkeit durch die Inhibition des IDO-Enzyms verursacht wird oder ob die synthetisch hergestellten Tryptophan-Derivate 1-L-MT bzw. 1-D-MT weitere Eigenschaften besitzen, die das Versterben infizierter Tiere verursachen könnten. Eine, zum Zeitpunkt der Publikation von Divanovic et al. noch nicht bekannte, Eigenschaft des kommerziell erhältlichen 1-L-MT wurde in einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit ermittelt. Die eigens für die Untersuchungen in der Publikation von Schmidt et al. etablierten HPLC-Messungen zeigten, dass alle getesteten, kommerziell erhältlichen Chargen des 1-L-MT sowie 1-D-MT von unterschiedlichen Firmen mit Tryptophan kontaminiert sind (Schmidt et al., 2012). Das Ausmaß der Tryptophan-Kontamination variiert dabei abhängig von der getesteten Charge: So konnte gezeigt werden, dass pro mg 1-MT eine Tryptophan-Verunreinigung von etwa 1 - 7 µg vorhanden ist. Diese Menge an Tryptophan reicht aus, um die Vermehrung der Tryptophan-auxotrophen Parasiten *in vitro* zu verstärken, da das im 1-MT enthaltende Tryptophan als Substrat für den Tryptophan-auxotrophen Parasiten dient (Schmidt et al., 2012). Um die Inhibition der IDO *in vivo* zu gewährleisten, verabreichten Divanovic et al. ihren Experimentaltieren 2 mg 1-MT pro ml Trinkwasser. Diese Menge 1-MT beinhaltet eine Tryptophan-Konzentration von 2 - 14 µg/ml (abhängig von der verwendeten Charge), wie anhand der Angaben von Schmidt et al. berechnet werden konnte (Schmidt et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass durch die Administration des 1-L-MT die infektionsbedingte Tryptophan-Degradation sowie die Kynurenin-Produktion in der Lunge teilweise blockiert werden. Jedoch kommt es nach unseren Befunden durch die 1-L-MT-Gabe gleichzeitig zu einer erhöhten Aufnahme von Tryptophan, was zu einer Steigerung der Toxoplasmen-Proliferation führen könnte. Einen Hinweis auf die Richtigkeit dieser Vermutung kann den Daten von Divanovic et al. entnommen werden: Diese zeigen in der Tat eine vermehrte Anzahl an *T. gondii* Zysten im Hirn der infizierten, 1-L-MT behandelten Tiere verglichen mit infizierten, unbehandelten Kontrolltieren. Der von Divanovic et al. beobachtete Anstieg der Mortalitätsrate in Toxoplasmen-infizierten und 1-L-MT behandelten Mäusen, könnte daher neben der IDO Inhibition mittels 1-MT-Gabe gleichzeitig auf die unbeabsichtigte, additive Tryptophan-Administration zurückzuführen sein. Es bleibt daher weiterhin offen, ob die IDO tatsächlich eine essentielle Rolle während einer Toxoplasmeninfektion einnimmt.

Wegen der multiplen durch 1-MT ausgelösten Effekte, ist es daher besser, die Rolle der IDO *in vivo* in einem Modell mit IDO defizienten Tieren zu untersuchen. Hierzu ist in der Literatur

beschrieben, dass eine Infektion mit *T. gondii* Zysten bei IDO defizienten Mäusen (C57Bl6-Hintergrund) im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren zu keiner erhöhten Mortalität führt, obwohl eine eindeutige Aktivität der IDO in der Lunge von Wildtyp-Mäusen detektierbar ist (Murakami et al., 2012). Diese Publikation von Murakami et al., die während meiner eigenen Arbeiten am Toxoplasmosemodell mit IDO defizienten Tieren erschienen ist, wurde aber unter anderen Experimentalbedingungen durchgeführt: Zum einen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Tachyzoiten zur Infektion verwendet. Durch die Verwendung von Tachyzoiten kann der Einsatz der exakten Infektionsdosis gewährleistet werden, während in den Experimenten von Murakami et al. Bradyzoiten-enthaltende Zysten verwendet wurden. Infektionen mit Zysten, die durch ihre unterschiedlichen Größen eine variierende Anzahl an Bradyzoiten beinhalten können, weisen eine erhebliche Schwankung bei der Infektionsdosis auf. Zum anderen wurden im Vergleich zu Murakami et al. (Fukaya, Typ 2) in der vorliegenden Arbeit andere Toxoplasmen Stämme für die Infektion gewählt (ME49, Typ 2 sowie RH, Typ 1). Weder die Infektion von WT bzw. IDO^{-/-} Mäusen mit Tachyzoiten des Typ 2 Stammes, noch die Infektion mit Tachyzoiten des Typ 1 Stammes führte dabei zu einer erhöhten Mortalitätsrate IDO defizienter Tiere verglichen mit wildtypischen Kontrolltieren. Somit konnten wir die Befunde von Murakami et al. auch unter anderen Experimentalbedingungen verifizieren.

Um die Schwere der Infektion zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die infektionsbedingte Veränderung des Körpergewichts von WT und IDO defizienten Tieren vergleichend ermittelt. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch die Schwere der Infektion in IDO defizienten Tieren nicht erhöht ist, da die infektionsbedingte Gewichtsreduktion der Mäuse zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen aufwies. Demnach kann bestätigt werden, dass der Abwesenheit der IDO im Mausmodell keine entscheidende Rolle für das Überleben *T. gondii* infizierter Mäuse zukommt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen jedoch, in Übereinstimmung mit vielen anderen Forschern (Murakami et al., 2012; Silva et al., 2002; Silva et al., 2009), dass es im Rahmen der Toxoplasmose auch bei der Maus zur Expression eines funktionellen IDO-Proteins kommt. So konnte hier gezeigt werden, dass es im Rahmen der Toxoplasmose zu einer signifikanten Verringerung des Tryptophan-Spiegels und gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung des Kynurenin-Spiegels im Serum kommt. Diese Befunde haben mich ermutigt den Verlauf der Toxoplasmose in Wildtyp und IDO defizienten Tieren genauer zu analysieren: Die Toxoplasmeninfektion führt in Mäusen zu eindeutigen Veränderungen der Organe, in denen sich durch die Abwesenheit der IDO Unterschiede manifestieren könnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind in Vorexperimenten drei Organe aufgefallen, die infektionsbedingte, makroskopische Veränderungen aufwiesen. Diese Organe sind die Milz, die Leber und die Lunge.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten in WT und IDO^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung des Milzgewichtes um etwa 400% führt (Tag 11 *post infectionem* (p.i.)). Die Erhöhung des Milzgewichtes bzw. -volumens in Folge einer experimentellen *T. gondii* Typ 2 Infektion im Mausmodell wurde bereits 1986

beschrieben (Jones et al., 1986). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen (FACS) zusätzlich infektionsbedingte Veränderungen von B- und T-Zellen (CD19⁺ bzw. CD3⁺) beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl lebender B- und T-Zellen in der Milz im Verlauf der experimentellen *T. gondii* Infektion in wildtypischen und IDO defizienten Mäusen sinkt (Annexin⁻/DAPI⁻). Parallel dazu stieg die Anzahl apoptotischer (Annexin⁺/DAPI⁻) bzw. toter (Annexin⁺/DAPI⁺) B- und T-Zellen an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden hier verwendeten Genotypen (WT und IDO^{-/-}) konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Auch die Leber war als Konsequenz einer Toxoplasmeninfektion verändert. Es ließ sich eine leichte Hepatomegalie nachweisen und auf der Leberoberfläche fanden sich nach der Infektion Leukoplakie-ähnliche Veränderungen. Diese beiden Auffälligkeiten wurden gleichermaßen in IDO^{-/-} und WT Tieren detektiert. Zudem konnten erste signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gezeigt werden: In der vorliegenden Arbeit konnte die Präsenz von *T. gondii* im Lebergewebe nachgewiesen werden, wobei die Parasiten-Last im Lebergewebe von IDO defizienten Mäusen an Tag 7 *p.i.* im Vergleich zu WT Mäusen signifikant erhöht war. Außerdem konnte in IDO defizienten Tieren im Vergleich zum WT ein stärkerer Leberzellschaden ermittelt werden, was durch die erhöhte Konzentration der Transaminase Alanin-Aminotransferase (ALT, früher: GPT) im Serum nachgewiesen werden konnte. Der höhere Toxoplasmen-Befall des Lebergewebes scheint demnach direkt mit einer erhöhten Leberzellschädigung zu korrelieren: Das starke Wachstum der Parasiten in der Leber von IDO defizienten Tieren, löst vermutlich eine verstärkte Zerstörung der Leberzellen aus. Dadurch wird die Transaminase ALT aus den Wirtszellen freigesetzt und kann in erhöhter Konzentration im Serum nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen belegen, dass es in der Leber von WT und IDO^{-/-} Mäusen zu keiner IDO-Expression kommt. Ferner zeigten HPLC-Analysen, dass es im Lebergewebe nicht zu einer Verringerung der Tryptophan- oder einer Erhöhung der Kynurenin-Konzentration kommt. Es stellt sich daher die Frage, wieso die Parasiten-Last im Lebergewebe von IDO defizienten Mäusen erhöht ist. Als Erklärung hierfür bietet sich eine veränderte Immunantwort bei IDO defizienten Tieren an, worauf im weiteren Teil der Diskussion genauer eingegangen wird.

Wie bereits geschildert, kommt es weder in der Leber noch in der Milz im Rahmen der Toxoplasmeninfektion zu einer IDO-Expression. Im Gegensatz dazu ist die Induzierbarkeit der IDO im Lungengewebe im Verlauf der Toxoplasmose mehrfach beschrieben (Fujigaki et al., 2002; Fujigaki et al., 2003; Murakami et al., 2012; Notarangelo et al., 2014; Silva et al., 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte infektionsbedingte Aktivität der IDO in der Lunge ist an einer deutlichen Verringerung der Tryptophan-Konzentration mit einhergehender Erhöhung der Kynurenin-Konzentration erkennbar. Mit Hilfe von Western Blot Analysen konnte zudem eine infektionsbedingte, induzierte Expression des IDO-Enzyms nachgewiesen werden. Überraschender Weise wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit jedoch auch eine leichte Verringerung der Tryptophan-Konzentration in Lungen-Homogenisaten von *T. gondii* infizierten IDO defizienten Tieren beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, dass ein

zweites Tryptophan degradierendes Enzym, die Indolamin 2,3-Dioxygenase 2 (IDO2), hierfür verantwortlich ist. Da in der Lunge IDO defizienter Tiere jedoch kein Kynurenin nachweisbar war, kann die Herabsetzung der Tryptophan-Konzentration nicht auf der Aktivität des IDO-Homologs IDO2 beruhen. Weiterhin besitzt die murine IDO2 eine weitaus geringere Potenz Tryptophan abzubauen, als die murine IDO (IDO ist etwa um ein vierfaches effektiver als IDO2). Dies wurde durch *in vitro* Versuche mit IDO bzw. IDO2 transfizierten Zellen gezeigt (Metz et al., 2007). Ferner beweisen neuere Ergebnisse von Metz et al., dass IDO defiziente Mäuse kein Vollängen-Transkript der IDO2 ausbilden können: Bei murinen primären peritonealen Makrophagen (PPM) IDO defizienter Mäuse, die *ex vivo* mit IFN γ stimuliert wurden, blieb die vollständige Transkription der mRNS der IDO2 aus. Im Vergleich zum wildtypischen Vollängen-Transkript, fehlen dem Transkript der IDO2 in IDO defizienten PPM 36 Nukleotide bzw. 12 Aminosäuren, was in einer noch weiter reduzierten enzymatischen Wirkung der IDO2 in IDO defizienten Mäusen resultieren könnte, wie Metz et al. mutmaßen (Metz et al., 2014). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in den IDO^{-/-} Mäusen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, das trunkierte IDO2 Protein funktionell alteriert ist. Die Aktivität der IDO2 in IDO defizienten Mäusen spielt demnach vermutlich keine Rolle für den infektionsbedingten Tryptophan-Abbau in der Lunge.

Die in dieser Arbeit gefundene Verringerung der Tryptophan-Konzentration in den Lungen infizierter IDO^{-/-} Mäuse, könnte alternativ auf den direkten Verbrauch der Aminosäure durch die massive Vermehrung der Tryptophan-auxotrophen Toxoplasmen zurückzuführen sein. So zeigen *in vitro* Experimente mit humanen Zellen, dass Toxoplasmen das freie, verfügbare Tryptophan aus dem Zellkultur-Medium inkorporieren und damit ihre eigene Reproduktion gewährleisten (Schmidt et al., 2012).

Um eine weitere Erklärung für die Verringerung des Tryptophan-Spiegels in der Lunge infizierter IDO^{-/-} Mäuse zu bieten, ist es wichtig, die Art und Weise der Auswertung, der mittels HPLC gewonnenen Rohdaten der Tryptophan-Konzentration in den Lungen, detailliert zu betrachten: Die Konzentration von Tryptophan bzw. Kynurenin wurde stets auf das Gesamt-Lungengewicht normiert. Somit wurde die infektionsbedingte Zunahme des Lungengewichtes bei der Konzentrations-Bestimmung der Aminosäure berücksichtigt, indem die ermittelte Tryptophan-Konzentration (Dividend) durch das Lungengewicht (Divisor) geteilt wurde. Dadurch ergibt sich die Tryptophan-Konzentration in μg Tryptophan pro mg Lunge (Quotient). Da die Lunge innerhalb des knöchernen Thorax lokalisiert ist, kann die Zunahme des Lungengewichtes nicht durch eine Vergrößerung des Lungengewebes kompensiert werden. Berechnet man nun alternativ die Tryptophan-Konzentration ohne Berücksichtigung des Lungengewichtes als μg Tryptophan pro μl Lungen-Homogenisat ergibt sich bei den IDO defizienten Tiere keine Abnahme der Tryptophan-Konzentration.

So lässt sich zusammenfassend sagen, dass ausschließlich in den Lungen von WT Tieren, nicht aber in den Lungen von IDO defizienten Tieren, eine infektionsbedingte Verringerung der Tryptophan-Konzentration erfolgt, die mit einer steigenden Konzentration von Kynurenin einhergeht und durch die pulmonale IDO-Aktivität vermittelt wird.

Dass die infektionsbedingte Degradation von Tryptophan bzw. die Produktion von Kynurenin in wildtypischen Mäusen eine antiparasitäre Funktion *in vivo* ausübt, konnte mit der

vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden: In der frühen Phase der Infektion (Tag 7 und 9 *p.i.*) wurde im Vergleich zu Lungen-Homogenisaten von infizierten WT Mäusen, in Lungen-Homogenisaten infizierter IDO^{-/-} Tiere eine signifikant höhere Toxoplasmen-Last detektiert. Demnach führt die Deletion der IDO in der Lunge von Mäusen zu einer abgeschwächten Eliminierung der Parasiten, sodass der IDO eine antiparasitäre Funktion *in vivo* zugesprochen werden kann.

Gegenteilige Ergebnisse bezüglich der antiparasitären Funktion der IDO *in vivo* liefert die Publikation von Murakami et al.: Deren Daten zeigen, dass die Toxoplasmen-Last in der Lunge von IDO defizienten Tieren an Tag 7 *p.i.* geringer ist, als in der Lunge von WT Mäusen, obwohl eine IDO-Aktivität im Lungengewebe der WT Mäuse nachgewiesen wurde (Murakami et al., 2012). Die konträren Resultate zwischen der Publikation von Murakami et al. und denen der vorliegenden Arbeit, sind möglicherweise auf die unterschiedlichen PCR-Methoden zur Detektion der Toxoplasmen zurückzuführen. Murakami et al. analysierten die Menge der mRNA (*messenger* RNS, Boten-RNS), die für das Oberflächenprotein SAG2 (*surface antigen* 2) von *T. gondii* kodiert, um die Toxoplasmen-Last in der Lunge zu ermitteln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch die Detektion eines *T. gondii* spezifischen Gens (*b1*), wodurch die Quantifizierung von *T. gondii* auf DNS-Ebene ermöglicht wird. Dadurch wird jeder einzelne Parasit, unabhängig vom Entwicklungsstadium (Tachyzoiten oder Bradyzoiten), erfasst. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Quantifizierung von Toxoplasmen mittels Detektion des *b1*-Gens als die sensitivste Methode für die Mengen-Bestimmung des Parasiten angesehen wird (Jones et al., 2000). Die Analyse des Oberflächenproteins SAG2 kann zwar prinzipiell verwendet werden, um das Vorhandensein von *T. gondii* zu bestätigen. Jedoch sind für SAG2 in der Literatur lediglich DNS- (Yu et al., 2013), nicht RNS-basierte quantitative Analyse-Methoden zu finden (Buchbinder et al., 2003). Außerdem liefern Murakami et al. keine detaillierten Informationen über, das für die Detektion von *T. gondii* analysierte, SAG2: Da die Familie der SAG2-Proteine, die als *single copy* Gene vorliegen (Contini et al., 2006), verschiedene Subklassen enthält (SAG2A - SAG2D), die in den unterschiedlichen Stadien von *T. gondii* spezifisch exprimiert werden (SAG2A/B von Tachyzoiten, SAG2C/D von Bradyzoiten) (Lekutis et al., 2000), ist diese Methode ungeeignet, um die parasitäre Last eindeutig feststellen zu können. Lediglich die Anwesenheit von Toxoplasmen und die Aktivität bzw. ihr Stadium, nicht aber die Toxoplasmen-Last *per se*, kann mit Hilfe dieser Methode von Murakami et al. analysiert werden. Somit ist die Interpretation von Murakami et al., die besagt, dass das Fehlen der IDO zu einer geringeren Toxoplasmen-Last führt, falsch.

Zusammenfassend kann das Ergebnis der Verringerung der Toxoplasmen-Last durch die Abwesenheit der IDO (in der Lunge von IDO defizienten Tieren) von Murakami et al. im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: Die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal *in vivo*, dass das Fehlen der IDO im Mausmodell zu einer höheren Toxoplasmen-Last führt. Im Umkehrschluss beweisen die eigenen Daten somit, dass die Aktivität der IDO in der Lunge von WT Mäusen eine antiparasitäre Wirkung vermittelt.

Der Befund, dass es in Abwesenheit der IDO in der Lunge zu einer erhöhten Parasiten-Last kommt, passt außerdem gut zu den Arbeiten, die von Peng und Monack sowie Zhang et al. publiziert wurden. So veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Peng et al., dass eine Infektion von Mäusen mit *Francisella novicida*, einem gram-negativen Bakterium, zur Expression der IDO in der Lunge führt. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Infektion mit *Francisella novicida* in IDO defizienten Tieren, im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe, zu einem leicht erhöhten Wachstum des Bakteriums in der Lunge führt. Einen größeren Effekt auf die Wachstumsrate des Tryptophan-prototrophen Bakteriums *Francisella novicida* konnten Peng et al. beobachten, wenn sie die Gene für die Tryptophan-Biosynthese (*trpA* und *trpB*) des Bakteriums ausschalteten. Nach intranasaler Infektion mit der so mutierten Form von *Francisella novicida*, war das Wachstum des Bakteriums in den Lungen von IDO defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen stark erhöht (Peng und Monack, 2010). Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Tryptophan abhängigen Mutanten von *Francisella novicida* im Lungengewebe von WT Mäusen einen Überlebensnachteil haben, da durch die Aktivität der IDO ein Tryptophan-armes Mikromilieu in der Lunge erzeugt wird.

In einem anderen bakteriellen Infektionsmodell konnten ähnliche Befunde erhoben werden (Zhang et al., 2013). Die Arbeitsgruppe um Zhang et al. zeigte in *ex vivo* Versuchen, dass durch den *Knockout* des *trpE*-Gens im Genom von *Mycobacterium tuberculosis*, ebenfalls Tryptophan-prototroph, ein IDO-abhängiges verringertes Wachstum in murinen Makrophagen nachgewiesen werden kann. Auch *in vivo* konnte daraufhin gezeigt werden, dass die Hemmung der bakteriellen Tryptophan-Synthese durch 2-Amino-6-Fluoro-Benzolsäure (6-FABA) zu einer Inhibition des bakteriellen Wachstums in den Lungen *Mykobakterium tuberculosis*-infizierter Mäuse führt (Zhang et al., 2013). Dieses Ergebnis weist auf ein therapeutisches Potential von 6-FABA hin, das bei der Behandlung mykobakterieller Infektionen bei Menschen erfolgsversprechende Resultate erzielen könnte.

Die genannten Veröffentlichungen liefern Hinweise auf die antimikrobielle Wirkung der murinen IDO bzw. auf die Relevanz von Tryptophan für das Wachstum von Mikroorganismen *in vivo*. Zusätzlich untermauern diese Publikationen die im Rahmen dieser Arbeit bewiesene antiparasitäre Funktion der IDO *in vivo* und bestätigen die bestehenden Daten von *in vitro* Experimenten mit humanen Zellen (Carlin et al., 1989b; Heseler et al., 2013; MacKenzie et al., 2007; Meisel et al., 2011; Schmidt et al., 2009). Somit wird bekräftigt, dass die IDO nicht nur *in vitro* im humanen System, sondern auch im Mausmodell eine antiparasitäre Wirkung hat und das Wachstum von *T. gondii* in der Lunge von Mäusen durch die Degradation von Tryptophan inhibieren kann.

Da also eine Bedeutung der IDO bei der Kontrolle des Toxoplasmenwachstums im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, interessierte ich mich für weitere IDO-vermittelte Effekte. Ausgelöst durch die Arbeiten von Mellor und Munn (Munn et al., 1998), findet in den letzten Jahren die immunregulatorische Bedeutung der IDO immer breiteres Interesse. Mellor und Munn wiesen erstmals eine immunregulatorische Wirkung der IDO in einem Trächtigkeitsmodell mit Mäusen nach. Sie konnten zeigen, dass der IDO bei der Ausbildung der maternalen Toleranz gegenüber dem foetalen Gewebe eine entscheidende Bedeutung zukommt: Wurden Tiere allogenen gekreuzt, so führte die Blockade der IDO mit 1-DL-MT zu

einer Abstoßung der allogenen Foeten, während eine Trächtigkeit von syngen gekreuzten Tieren durch 1-DL-MT nicht beeinflusst wurde (Munn et al., 1998).

Ferner konnte die Arbeitsgruppe um Uyttenhove belegen, dass viele unterschiedliche Tumorzelltypen des Menschen IDO exprimieren. Im Mausmodell zeigte diese Gruppe, dass murine IDO-positive Tumorzellen *in vivo* die Anti-Tumor-Antwort inhibieren und so der Immunantwort entgehen können (Uyttenhove et al., 2003).

Auch bei Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, scheint das Vorhandensein der IDO eine immunologisch wichtige Rolle einzunehmen. Im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, ist im Verlauf der Erkrankung eine IDO-Aktivität in Makrophagen und Mikroglia-Zellen des ZNS nachweisbar. Durch die Administration des IDO-Inhibitors 1-MT, wurde eine Erhöhung des Schweregrades der EAE ausgelöst. Somit konnte gezeigt werden, dass die pathophysiologische Expression der IDO im ZNS eine protektive Rolle bei dieser Autoimmunerkrankung besitzt (Kwidzinski et al., 2005; Sakurai et al., 2002).

Die IDO-vermittelte Immunregulation ist aber auch bei der Transplantation solider Organe von großer Bedeutung. So führt die Inhibition der IDO nach einer Lebertransplantation im Mausmodell zu einer verstärkten *Host-versus-Graft*-Reaktion (Miki et al., 2001). Außerdem ist die immunregulatorische Wirkung der IDO bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation bedeutsam: Die IFN γ -induzierte Aktivität der IDO in dendritischen Zellen und Monozyten von Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation korreliert mit der Schwere der Abstoßungsreaktion. Dabei war zu erkennen, dass die Abstoßungsreaktion geringer ausfiel je höher die IDO-Aktivität war (Steckel et al., 2003).

Da zelluläre Immunreaktionen aber auch für die Abwehr von Toxoplasmen essentiell sind (Pifer und Yarovsky, 2011; Sturge und Yarovsky, 2014; Yarovsky, 2014; Yarovsky et al., 2005), liegt es nahe zu untersuchen, ob die IDO *in vivo* auch im Rahmen der Toxoplasmose immunregulatorische Aufgaben übernimmt. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst orientierende Serum-Zytokin-Arrays durchgeführt, die zeigten, dass es im Rahmen der Toxoplasmose bei IDO defizienten Tieren, im Vergleich zu WT Tieren, zu einer zweitägig verzögerten Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt. Während bei WT Tieren ein Maximum der Konzentration proinflammatorischer Zytokine (IFN γ , CCL2, CXCL-10, CXCL-1, G-CSF, in Abbildung 3.3 gezeigt) an Tag 7 *p.i.* im Serum beobachtet werden konnte, war dieses Maximum bei IDO defizienten Mäusen erst an Tag 9 *p.i.* zu sehen. Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die Immunantwort in IDO defizienten Tieren verändert ist.

Somit ist es möglich, dass auch die Eliminierung der Parasiten in IDO defizienten Tieren durch den langsameren Anstieg der Konzentration proinflammatorischer Zytokine in peripheren Organen, wie z. B. der Leber (siehe Kapitel 3.3.2.), verzögert stattfindet.

Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Konzentration proinflammatorischer Zytokine in den Lungen von WT Tieren im Vergleich zu IDO defizienten Tieren geringer ist. Auffallend ist insbesondere die signifikant erhöhte Konzentration von IFN γ und CCL2 an Tag 7 *p.i.* im Lungengewebe von IDO^{-/-} Mäusen. Diese erhöhte Menge an Zytokinen in der Lunge IDO defizienter Mäuse kann einerseits dazu führen, dass es zu einer IFN γ -bedingten Inhibition der T-Zellantwort kommt, schädliche proinflammatorische Effekte vermittelt werden oder alternativ eine verstärkte IDO-unabhängige Abwehr gegen

Toxoplasmen ausgelöst wird (siehe Kapitel 1.3.3., Kapitel 3.4.2. und Abbildung 3.34). Alternativ könnte es durch die erhöhte Konzentration von CCL2, einem Protein, welches die Rekrutierung bzw. Migration von T-Zellen fördert (Carr et al., 1994), zu einer verstärkten zellulären Infiltration des Lungengewebes kommen. Die verringerte Konzentration proinflammatorischer Zytokine in Lungen-Homogenisaten von infizierten WT Tieren, verglichen mit der erhöhten Konzentration in IDO defizienten Tieren, kann als Hinweis auf eine immunsupprimierende Funktion der IDO gewertet werden. Neben IFN γ und CCL2 konnte in den Lungen-Homogenisaten von infizierten WT Mäusen, im Vergleich zu IDO defizienten Mäusen, auch eine geringere Konzentration der proinflammatorischen Zytokine M-CSF, TNF α , CXCL-9 und CXCL-10 in der akuten Phase der Infektion ermittelt werden, was die immunsuppressive Wirkung der IDO weiterhin bestätigt.

Tatsächlich wurde eine solche IDO-vermittelte Suppression der Immunantwort bereits von Makala et al. in einem anderen Infektionsmodell gezeigt. Im Rahmen der Studien von Makala et al. wurden WT Tiere mit Leishmanien (*Leishmania major*) infiziert, wodurch die Expression von IDO in den Lymphknoten induziert wurde. Durch die orale Gabe von 1-D-MT während der Infektion, wurde die Menge an CD4⁺ T-Zellen, die das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) sezernieren, in den Lymphknoten reduziert. Proinflammatorische Zytokine hingegen, wie z. B. IL-6, waren in erhöhter Konzentration in den Lymphknoten 1-D-MT behandelter und Leishmanien-infizierter Mäuse nachweisbar (Makala et al., 2011). So zeigt sich, dass die Inhibition der IDO durch 1-D-MT zu einer stärkeren proinflammatorischen Immunreaktion während der Infektion mit Leishmanien führt, was gut zu den eigenen Daten der erhöhten Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der Lunge Toxoplasmen-infizierter IDO defizienter Mäuse, verglichen mit WT Tieren, passt.

Nach den vielfältigen Resultaten, die eine verstärkte Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in die Lunge von IDO^{-/-} Tieren vermuten lassen, wurden immunhistologische Untersuchungen, zum Teil auch per Durchflusszytometrie, durchgeführt. An Tag 7 *p.i.*, an dem die besonders deutliche Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine messbar war, waren immunhistologische Untersuchungen nicht zielführend: Es konnten in den Lungen infizierter Tiere beider Genotypen nur vereinzelte inflammatorische Zellen nachgewiesen werden.

Erste sichere Hinweise auf eine zelluläre Infiltration der Lunge gab die morphologische Veränderung des Lungengewebes an Tag 9 *p.i.* bei beiden infizierten Genotypen. Das pulmonale Septum war im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren sichtbar vergrößert. Zusätzlich konnten zelluläre Infiltrate beobachtet werden. Diese Veränderungen in der Lunge weisen auf eine interstitielle Pneumonie hin, die durch entzündliche Veränderungen nahe der dünnen Alveolenwand gekennzeichnet ist (Lippert, Herbold und Lippert-Burmester, 2010). Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits von Murakami et al. publiziert: Die Arbeitsgruppe um Murakami zeigte, dass eine Toxoplasmeninfektion mit Zysten in wildtypischen Tieren ebenfalls zu morphologischen Veränderungen in der Lunge führt, die durch infiltrierende, inflammatorische Histiozyten und einer Verdickung der alveolaren epithelialen Zellwand gekennzeichnet waren. Zusätzlich zeigte die Gruppe um Murakami et al., dass Mäuse, deren IDO-Aktivität durch die orale Administration von 1-L-MT inhibiert wurde, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine geringere infektionsbedingte Rekrutierung

inflammatorischer Zellen und eine geringere Verdickung der alveolaren Zellwände aufwiesen (Murakami et al., 2012).

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Beobachtungen in der Lunge infizierter IDO defizienter Mäuse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemacht wurden: Mit Hilfe von FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von T-Zellen in der Lunge infizierter IDO^{-/-} Mäuse geringer ist, als bei der wildtypischen, infizierten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis erscheint zunächst überraschend, da die Daten der vorliegenden Arbeit gleichzeitig zeigen, dass die Konzentration proinflammatorischer Zytokine während der parasitären Infektion in Lungen-Homogenisaten von IDO defizienten Tieren höher ist, als in WT Tieren. Daher wurde erwartet, dass die Infiltration von Immunzellen wie CD4⁺ T-Zellen, die diese Zytokine sezernieren können, in den Lungen IDO defizienter Tiere ebenfalls höher ist, als im WT. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den vermehrt infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen in den Lungen von WT Mäusen um immunsuppressiv wirkende regulatorische CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{regs}) handelt. Eine direkte Bestimmung von funktionellen T-Zell Subpopulationen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch gibt es in der Literatur vielfältige Hinweise auf eine IDO-vermittelte Induktion von regulatorischen T-Zellen. So zeigten z. B. Sharma et al. im Mausmodell, dass plasmazytoide dendritische Zellen aus den Tumor-drainierenden Lymphknoten eine Aktivierung von T_{regs} auslösen (Sharma et al., 2007). Ferner ist bekannt, dass humane Tumorzellen selbst IDO exprimieren und über den Tryptophanabbau und die dabei entstehenden Metaboliten Effektor T-Zellen inhibieren und die Entstehung von T_{regs} fördern (Choi et al., 2012).

Die Relevanz von T_{regs} bei der Regulation proinflammatorischer Zytokine, ist bereits in einem Infektionsmodell beschrieben: Nach einer RSV-Infektion (RSV: respiratorisches Synzytial-Virus) weisen Mäuse, die keine T_{regs} besitzen (DEREG-Mäuse, *Depletion of regulatory T-cells*), eine signifikant erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolaren Flüssigkeit auf, verglichen mit infizierten WT Tieren (Loebbermann et al., 2012). Somit werden T_{regs} für das Abmildern einer frühen Immunantwort verantwortlich gemacht und dieser Zelltyp könnte auch während der Toxoplasmeninfektion in WT Tieren eine IDO-vermittelte Immunsuppression auslösen.

Es wird somit deutlich, dass die IDO nicht nur antiparasitäre, sondern auch immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Effekte einnimmt. Es war daher naheliegend zu untersuchen, ob die immunregulatorische Wirkung der IDO essentiell für die Ausbildung einer protektiven Immunität gegen Toxoplasmen ist. Um dies zu überprüfen, wurden Immunisierungs-Studien durchgeführt, wie sie aktuell von Jensen et al. publiziert wurden: Diese Arbeitsgruppe konnte Mäuse erfolgreich mit avirulenten Toxoplasmen des Typ 3 Stammes immunisieren, sodass etwa 95% dieser Tiere eine Sekundär-Infektion mit dem hoch virulenten Typ 1 Toxoplasmen Stamm RH überlebten (Jensen et al., 2015).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden WT und IDO defiziente Tiere mit einer subletalen Dosis an Tachyzoiten des moderat virulenten *T. gondii* Typ 2 Stammes (ME49) infiziert und dadurch immunisiert. Nach ca. 50 – 70 Tagen wurden die immunisierten Mäuse mit 10³ RH Tachyzoiten infiziert. In diesem Modell konnte eine hohe Überlebensrate von immunisierten und danach mit Typ 1 Toxoplasmen-infizierten WT Mäusen ermittelt werden. Es konnte

gezeigt werden, dass 93% der immunisierten WT Tiere die Infektion mit dem hochvirulenten Typ 1 Stamm überlebten, während 100% der nicht immunisierten WT Tiere verstarben bzw. auf Grund der Erfüllung definierter Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen wurden. Auch bei den immunisierten IDO^{-/-} Mäusen zeigte sich eine hohe Überlebensrate von 75%, wohingegen 100% der nicht immunisierten IDO^{-/-} Tiere an der Typ 1 Toxoplasmeninfektion verstarben. Die Überlebensraten von 95% bei WT Tieren vs. 75% bei den IDO^{-/-} Tieren erwiesen sich im log-rank-Test (Mantel-Cox) als nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,22$). Zusätzlich zu den Überlebens-Analysen wurde auch der infektionsbedingte Gewichtsverlust der immunisierten Mäuse dokumentiert und als Beweis dafür angesehen, dass in der Maus eine eindeutige Entzündungsreaktion mit klinisch manifestieren Krankheitssymptomen induziert wurde. Die Primärinfektion galt als überwunden, sofern die Mäuse keine äußerlichen Krankheitssymptome wie Apathie, gesträubtes Fell oder Bewegungsunlust mehr zeigten und sie ihr Anfangsgewicht in vollem Umfang erreicht hatten. Erst wenn diese Kriterien erfüllt waren (in der Regel 50 - 70 Tage *p.i.*), wurden die Tiere mit einer für gewöhnlich letalen Dosis hoch virulenter *T. gondii* Tachyzoiten des Typ 1 Stammes (RH) konfrontiert. Betrachtete man dabei die Gewichtsreduktion aller primär infizierten Mäuse, so fiel auf, dass bei einer von 14 WT Mäusen (7%), sowie bei drei von 12 IDO defizienten Mäusen (25%) eine infektionsbedingte Gewichtsreduktion ausblieb. Interessant ist, dass genau diese Tiere in Folge der Typ 1 Infektion verstarben bzw. wegen eindeutiger Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen werden mussten. Somit könnte das Versterben durch eine Typ 1 Infektion einer „immunisierten“ WT Maus und drei „immunisierter“ IDO defizienter Mäuse mit einer misslungenen Etablierung einer protektiv wirkenden Erstinfektion erklärt werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass eine tatsächlich gelungene Primärinfektion nicht zwingend mit einer deutlich messbaren Gewichtsabnahme korrelieren muss. In zukünftigen Experimenten sollte daher zur Feststellung der gelungenen Primärinfektion eine retrobulbäre Blutabnahme am lebenden Tier durchgeführt werden, also die Blutpunktion zur Gewinnung von Blut aus dem Venengeflecht hinter dem Auge. So könnte eine ausreichende Menge an Blut (Serum) gewonnen werden, um Antikörper-Tests (z. B. *Enzyme linked immunosorbent Assay*, (ELISA)) durchführen zu können, die durch das Vorhandensein von Toxoplasma-spezifischen Antikörpern eindeutige Hinweise auf die erfolgreiche Induktion einer humoralen Immunantwort geben. Dadurch wäre es möglich, ausschließlich diejenigen Mäuse für die Konfrontations-Experimente mit der letalen RH-Dosis zu verwenden, die *T. gondii* spezifische Antikörper produziert haben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Immunisierungs-Studie, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, dass die IDO zwar immunmodulatorische Funktionen (gemessen an den Zytokin-Konzentrationen in der Lunge, Kapitel 3.3.3.3) während einer Toxoplasmose übernimmt, aber *in vivo* keine entscheidende Rolle in der Ausbildung einer protektiven Immunität gegen *T. gondii* übernimmt (Kapitel 3.4.4).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass die IDO sowohl antiparasitäre als auch immunmodulatorische Effekte während der Toxoplasmose im Mausmodell hat. Trotzdem führt die Deletion der IDO zu keiner erhöhten Mortalitätsrate, obwohl eine erhöhte Parasiten-Last und eine erhöhte, potentiell schädlich wirkende Konzentration

proinflammatorischer Zytokine in der Lunge IDO defizienter Tiere nachgewiesen wurde. Daher stellt sich die Frage, wieso die Toxoplasmose in IDO defizienten Tieren keinen klinisch schwereren Verlauf nimmt.

Die IDO ist *in vivo* ein wichtiges immunsuppressives, Toleranz-induzierendes Enzym. Es gibt jedoch, wie bei vielen anderen Schlüsselfunktionen, mehrere redundante Systeme, welche die IDO funktionell ersetzen können. So wirken z. B. die über viele Mechanismen induzierbaren Zytokine TGF β (*transforming growth factor β*) oder Interleukin-10 immunsuppressiv und hemmen die Lymphozytenproliferation bzw. die Produktion anderer Zytokine (Murphy, Travers und Walport, 2006). Auch Adenosin, welches durch die Aktivität von Ektonukleotidasen aus Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) synthetisiert werden kann (Lennon et al., 1998), ist als immunsuppressiv wirkendes Molekül beschrieben, da es durch die Bindung am A2a-Adenosin-Rezeptor antiinflammatorische Effekte auslöst, wie *in vitro* Experimente mit murinen Makrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) (Yamaguchi et al., 2014) und murinen mesenchymalen Stammzellen (Sattler et al., 2011) zeigen. Ferner zeigten Salinas et al. in *ex vivo* Experimenten an murinen Splenozyten, dass der IL-2 Verbrauch durch *Bystander*-Zellen wie z. B. T_{regs}, zur Apoptose von T-Zellen führt, da die klassischen T-Zellen mit den T_{regs} um das vorhandene IL-2 konkurrieren. Durch die daraus resultierende geringere Verfügbarkeit an IL-2 für T-Zellen, gehen die proliferierenden T-Zellen letzten Endes in die Apoptose über (Salinas et al., 2014). Diese Vielfalt an IDO-unabhängigen, alternativ induzierbaren Mechanismen macht es wahrscheinlich, dass der Ausfall der IDO durch weitere immunsuppressiv wirkende Moleküle kompensiert werden kann, um eine pathologische Immunreaktion während der Toxoplasmose zu mildern.

Des Weiteren ist es nicht ausreichend nur die alternativen immunsuppressiv wirkenden Moleküle zu beachten, um zu erklären warum IDO defiziente Tiere im Rahmen einer Toxoplasmose keine erhöhte Mortalität aufweisen. So ist meiner Meinung nach besonders wichtig zu analysieren, welche unterschiedlichen Effektorsysteme im murinen System während der Toxoplasmose aktiv sind und IDO redundante Funktionen übernehmen können. Ein deutlicher Hinweis auf solche alternativen Effektorsysteme ergibt sich im Rahmen dieser Arbeit aus der Beobachtung, dass die Parasiten-Last nicht nur in der Lunge von WT sondern auch in der Lunge von IDO defizienten Mäusen bis Tag 60 *p.i.* abnimmt. Da in IDO defizienten Tieren, wie bereits erwähnt, weder die IDO, noch die IDO2 für diesen antiparasitären Effekt in der chronischen Phase der Infektion verantwortlich sein können, müssen demnach weitere antiparasitäre Proteine in der Lunge infizierter Mäuse existieren, die die Eliminierung von *T. gondii* gewährleisten: Eines dieser Proteine ist die sogenannte induzierbare NO-Synthase (iNOS); aber auch IFN γ -induzierbare *immunity related* GTPasen (IRGs) bzw. Guanylat-bindende Proteine (GBPs), die der Familie der p47 bzw. p65 GTPasen zugeordnet werden, gehören zu diesen antiparasitär wirksamen Proteinen.

Das erste Protein, das nun genauer beschrieben wird, ist die iNOS. Dieses IFN γ -induzierbare Enzym katalysiert in vielen murinen Zellen den Umsatz der essentiellen Aminosäure Arginin zu Citrullin. Dabei entsteht Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die Interaktion mit eisenhaltigen Enzymen bzw. der DNS toxische Effekte vermittelt (Denis, 1994). In vielen murinen *in vitro* Infektionsmodellen konnte die antimikrobielle Wirkung der iNOS gegen

verschiedene Pathogene beschrieben werden (Granger et al., 1988; Green et al., 1990; James und Glaven, 1989), dazu gehören auch Toxoplasmen (Adams et al., 1990). So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass murine mesenchymale Stammzellen nach einer Stimulation mit IFN γ , TNF α und Interleukin-1 in der Lage sind das Wachstum von Typ I Toxoplasmen zu inhibieren. Dieser antiparasitäre Effekt konnte durch Zugabe des iNOS Inhibitors NG-Monomethyl-L-Arginin (NGMMA) nahezu vollständig aufgehoben werden (Meisel et al., 2011). Im humanen System gibt es nur wenige Belege für eine antimikrobielle Wirkung der iNOS. So zeigen z. B. Experimente in einem Infektionsmodell mit *Mykobakterium tuberculosis*, dass die Expression der iNOS und die nachfolgende Produktion von NO in humanen alveolaren Makrophagen das Wachstum des Bakteriums inhibieren kann (Nicholson et al., 1996; Rich et al., 1997). Bestätigend konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Inhibition der iNOS in humanen Monozyten (Jagannath et al., 1998) oder alveolaren Makrophagen (Nozaki et al., 1997) zu einem verstärkten intrazellulären Wachstum von *Mykobakterium tuberculosis* führt.

Dass die iNOS ein essentielles Protein ist, um das Überleben von Mäusen während der Toxoplasmeninfektion zu gewährleisten, wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen: So wurde gezeigt, dass die Deletion der iNOS zu einer erhöhten infektionsbedingten Mortalität in der chronischen Phase (ab Tag 20 *p.i.*) der Toxoplasmose (C57Bl/6, *i.p.*, 20 Zysten ME49) führt. An Tag 24 *p.i.* waren alle iNOS^{-/-} Tiere verstorben, während die Kontrollgruppe wildtypischer infizierter Tiere überlebte (Scharton-Kersten et al., 1997). Zusätzlich existieren weitere, ähnliche Experimente, die die Relevanz der iNOS für die Toxoplasmenabwehr im Mausmodell bestätigen (Alexander et al., 1997; Fujigaki et al., 2002; Fujigaki et al., 2003; Silva et al., 2009). Ferner konnte gezeigt werden, dass die IDO auf komplexe, bisher nicht genau beschriebene Weise mit der iNOS interagiert: Experimente mit IFN γ ^{-/-} Mäusen zeigten, dass die Transkription der IDO mRNA IFN γ -abhängig ist, wohingegen die mRNA, die für die iNOS kodiert auch in der Lunge IFN γ defizienter Mäuse nachweisbar ist und demnach zumindest teilweise IFN γ -unabhängig induzierbar (Fujigaki et al., 2002). Zudem führt die Administration des iNOS Inhibitors L-NG-Nitroarginin-Methylester (L-NAME) während einer Toxoplasmeninfektion im Mausmodell einerseits zu einer erfolgreichen Hemmung der systemischen NO-Produktion; andererseits führt diese iNOS-Inhibition zu einer signifikant erhöhten Kynurenin-Konzentration im Serum, die vermutlich auf eine erhöhte IDO-Aktivität zurückzuführen ist. Erwähnenswert ist, dass die Inhibition der iNOS durch die Administration von L-NAME keinen Effekt auf die Toxoplasmen-Last in der Lunge hat (Fujigaki et al., 2002), obwohl die Transkription der iNOS mRNA in der Lunge während einer Toxoplasmeninfektion im Mausmodell nachgewiesen werden konnte (Silva et al., 2002). Zusammenfassend ist die iNOS demnach für das Überleben während der chronischen Phase der Toxoplasmose wichtig ohne dabei eine Verringerung der Parasiten-Last in der Lunge zu bewirken. Interessanter Weise scheint die iNOS-Aktivität im Maussystem zusätzlich die IDO-Aktivität zu reprimieren (Fujigaki et al., 2002).

Eine inhibitorische Wirkung der iNOS auf die IDO-Aktivität konnte durch unsere Arbeitsgruppe auch *in vitro* in humanen uroepithelialen RT-4 Zellen nachgewiesen werden. Die Zelllinie RT-4 ist eine der wenigen humanen Zelllinien, bei welcher nach adäquater Stimulation deutliche Mengen an NO im Zellkulturüberstand messbar sind. Unter diesen

Bedingungen wird die Aktivität der gleichzeitig induzierten IDO blockiert. Zudem wird durch die iNOS eine verstärkte proteasomale Degradation des IDO-Proteins ausgelöst (Hucke et al., 2004). Ähnliche Experimente von Thomas et al. zeigten, dass in humanen mononukleären Phagozyten durch die Zugabe von NO die IFN γ -induzierte Aktivität der IDO ebenfalls inhibiert werden kann (Thomas et al., 1994). Spekulativ könnte also das Fehlen des IDO-Proteins in IDO defizienten Mäusen durch die Aktivität der iNOS kompensiert werden, wodurch die Abnahme der Parasiten-Last in IDO defizienten Mäusen während der Toxoplasmose begründet werden könnte. Es ist jedoch fraglich, ob diese im Maussystem generierten *in vivo* Daten auf das humane System übertragbar sind.

Bezüglich der Expression der iNOS im humanen System liefert die Literatur unterschiedliche Daten (Denis, 1994). Viele Veröffentlichungen belegen, dass hauptsächlich murine, nicht aber humane Makrophagen nach IFN γ /LPS Stimulation eine hohe iNOS Aktivität aufweisen (Murray und Teitelbaum, 1992; Padgett und Pruett, 1992). Auch konnte gezeigt werden, dass murine mesenchymale Stammzellen, kokultiviert mit anti CD3 Antikörper stimulierten Splenozyten, große Mengen an NO produzieren, wohingegen vergleichbare Experimente mit humanen mesenchymalen Stammzellen (kokultiviert mit anti CD3 Antikörper stimulierten peripheren Blut-Monozyten) keine Produktion von NO auslösen (Su et al., 2014). Vergleichbare Daten wurden zuvor auch von unserer Arbeitsgruppe nach Stimulation von mesenchymalen Stammzellen mit IFN γ bzw. IFN γ plus IL-1 und TNF α erzielt (Meisel et al., 2011).

Während die iNOS im humanen System eventuell bei der Abwehr von Bakterien eine Rolle einnehmen könnte, ist sie bei Toxoplasmeninfektionen (in humanen Monozyten) nicht bei der Abwehr von *T. gondii* involviert (Murray und Teitelbaum, 1992), sodass ihr kein antiparasitärer Effekt im humanen System zugesprochen werden kann. Die Übertragung der Daten aus dem Mausmodell ist daher nicht möglich und die Relevanz der antiparasitären Wirkung der iNOS im humanen System fraglich.

Neben der iNOS sind auch GTPasen, wie die immun regulierten p47 GTPasen (IRGs) bei der Eliminierung von Toxoplasmen im murinen System beteiligt. Dabei akkumulieren diese Proteine nach IFN γ -Stimulation an der Membran der parasitophoren Vakuole (PV). Daraufhin vermitteln sie die Zerstörung der PV, wodurch die Parasiten ins Zytosol der Wirtszelle gelangen und durch Autophagie beseitigt werden (Howard et al., 2011; Ling et al., 2006). In *in vitro* Experimenten ist die Relevanz der murinen IRGs für die Eliminierung von *T. gondii* bereits beschrieben. So zeigten Martens et al., dass die IFN γ -abhängige Hemmung des Toxoplasmen-Wachstums in murinen Astrozyten mit der Expression von IRGs korreliert. Ferner konnte die Hemmung des Toxoplasmen-Wachstums durch gezielte Mutationen an einzelnen IRG-Genen aufgehoben werden (Martens et al., 2005).

Aber auch *in vivo* spielt das Vorhandensein der p47 GTPasen eine bedeutende Rolle wie Collazo et al. bereits 2001 unter der Verwendung von IRG^{-/-} Mäusen zeigen konnten (Collazo et al., 2001). Dabei kommen verschiedenen IRGs unterschiedliche Bedeutungen bei der Abwehr von Toxoplasmen zu. So zeigten z. B. Experimente von Liesenfeld et al., dass eine Infektion mit Toxoplasmen Zysten (*i.p.* mit 10 ME49 Zysten) nur zu einer mittelgradigen Erhöhung der Mortalität IRGa6 defizienter Mäuse im Verlauf der Infektion führt: Während

IRGa6^{-/-} Mäuse sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase verstarben (60% bis Tag 25 *p.i.*), wiesen wildtypische infizierte Kontrolltiere bis zu diesem Zeitpunkt (10% bis Tag 25 *p.i.*) eine geringe Mortalitätsrate auf (Liesenfeld et al., 2011).

Im Gegensatz zu der wesentlichen Bedeutung der IRGs für die Eliminierung von Toxoplasmen in der Maus, ist die Relevanz dieser Proteine im humanen System jedoch umstritten. Während im murinen Genom 23 Gene für verschiedene p47 GTPasen kodieren, konnte im humanen Genom bisher nur ein einziges Volllängen-Transkript dieser p47 GTPasen sowie ein trunkiertes mutmaßliches Pseudogen als IRG Homolog nachgewiesen werden (Bekpen et al., 2005). Eine ähnlich wichtige antiparasitäre Bedeutung der IRGs im humanen System, so wie es für das Mausmodell beschrieben ist, kann daher mit der momentanen Literaturlage nicht bestätigt werden (Bekpen et al., 2005; Gazzinelli et al., 2014).

Die zweite Gruppe der GTPasen, die bei der Abwehr gegen *T. gondii* beteiligt ist, sind die p65 GTPasen, die auch als Guanylat-bindende Proteine (GBPs) bezeichnet werden. Diese nehmen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Toxoplasmen im Mausmodell ein. Durch die Akkumulation der GBPs an der parasitophoren Vakuole, in der sich die Toxoplasmen in der Wirtszelle vermehren, werden antimikrobielle Proteinkomplexe, wie z. B. das Autophagosom, das Inflammasom oder die NADPH-Oxidase 2 (MacMicking, 2012) zur PV rekrutiert, die letzten Endes die Zerstörung der PV fördern. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht genau geklärt (Haldar et al., 2013).

Yamamoto et al. konnten bereits zeigen, dass die gleichzeitige Deletion von insgesamt sechs murinen GBPs zu einer 90 prozentigen Mortalitätsrate Toxoplasmen-infizierter (*i.p.*, 1x10² ME49) Mäuse führt, während die wildtypische Kontrollgruppe zu 70% überlebt (Yamamoto et al., 2012). Wenig später konnten Degrandi et al. zeigen, dass auch die Deletion eines einzigen GBPs im Mausmodell eine essentielle Rolle in der Abwehr gegen *T. gondii* *in vivo* einnimmt: Die Infektion mit Toxoplasmen (*i.p.*, 20 Zysten ME49) bei GBP2^{-/-} Mäusen führte zu einer erhöhten Mortalität, verglichen mit infizierten wildtypischen Kontrolltieren. GBP2 defiziente Tiere verstarben, sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase, zu insgesamt 65%, während die Mortalitätsrate wildtypischer Kontrolltiere 30% betrug. Zurückzuführen ist die erhöhte Mortalitätsrate der GBP2^{-/-} Mäuse vermutlich darauf, dass GBP2 defiziente Mäuse die Vermehrung der Parasiten in den Organen nicht mehr kontrollieren können: Z. B. findet man an Tag 30 *p.i.* eine erhöhte Parasiten-Last im Gehirn GBP2 defizienter Mäuse, verglichen mit WT Tieren (Degrandi et al., 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die meisten der bekannten murinen GBPs in der Lunge von Toxoplasmen-infizierten WT Mäusen auf Proteinebene exprimiert werden (Degrandi et al., 2007). Somit nehmen p65 GTPasen im murinen System anscheinend eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Mikroorganismen ein.

Im Gegensatz zu den p47 GTPasen, sind die p65 GTPasen in Vertebraten hoch konserviert. Nachdem bereits 1983 gezeigt wurde, dass humane IFN γ -stimulierte Fibroblasten GBP1 exprimieren (Cheng et al., 1985; Cheng et al., 1983), konnten in den nachfolgenden Jahren insgesamt sieben GBPs im humanen (Degrandi et al., 2007; Nguyen et al., 2002; Schwemmle et al., 1996) und elf GBPs im murinen Organismus nachgewiesen werden (Boehm et al., 1998; Cheng et al., 1991; Degrandi et al., 2007; Han et al., 1998; Kresse et al., 2008; Staeheli et al.,

1983; Vestal et al., 1996; Wynn et al., 1991). Auch in einigen anderen Vertebraten konnten GBPs detektiert werden (Asundi et al., 1994; Olszewski et al., 2006; Schwemmle et al., 1996; Vestal et al., 1996). Diese Veröffentlichungen lassen die Vermutung zu, dass GTPasen nicht nur in der Maus sondern auch im Menschen und anderen Vertebraten eine Aufgabe bei der Abwehr gegen Mikroorganismen übernehmen könnten.

So ist es möglich, dass in den IDO defizienten Mäusen GTPasen als antiparasitäre Effektorproteine funktionell aktiv sind und daher die Toxoplasmen-Last auch in der Lunge IDO defizienter Mäuse im Verlauf der Infektion abnimmt. Daher wurde überprüft, ob IRGs und GBPs, die als Schlüsselproteine bei der Abwehr des intrazellulären Erregers im Mausmodell beschrieben sind (Degrandi et al., 2013; Liesenfeld et al., 2011; Yamamoto et al., 2012), in den Lungen von WT und IDO defizienten Mäusen exprimiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten sowohl in Lungen von WT als auch in Lungen von IDO defizienten Tieren die Expression von GBP2 und IRGa6 induziert. Vergleichende densitometrische Analysen zur Expressions-Stärke der GTPasen ergaben, dass beide Proteine in den Lungen beider Genotypen gleichermaßen stark hochreguliert wurden. Wenn man die große Bedeutung der GTPasen bei der Toxoplasmenabwehr im murinen System berücksichtigt, erscheint es wahrscheinlich, dass diese Proteine auch in IDO defizienten Tieren eine effektive Kontrolle des Parasiten bewirken.

Die bisher genannten Abwehrmechanismen haben gemeinsam, dass sie durch IFN γ -induzierbar sind. Mäuse, die kein IFN γ exprimieren (Scharton-Kersten et al., 1996) oder durch Rezeptor-Defizienz (Deckert-Schlüter et al., 1996) nicht auf IFN γ reagieren können, zeigen eine extrem hohe Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*. Mäuse, bei denen einzelne GTPasen oder die iNOS deletiert wurden, zeigen hingegen eine deutlich niedrigere Mortalität. Es ist daher zu vermuten, dass die Effektormechanismen *in vivo* gemeinsam an der Abwehrleistung beteiligt sind. Um die Bedeutung der IDO genauer zu erfassen, wäre es in zukünftigen Arbeiten sinnvoll, mehrere dieser Abwehrmechanismen gleichzeitig zu inaktivieren. Es ist denkbar, dass die Deletion zweier (*double knockout*) oder sogar aller drei Effektormechanismen (*triple knockout*) im Mausmodell (beispielsweise GBP2^{-/-}/IDO^{-/-}, iNOS^{-/-}/IDO^{-/-} oder GBP2^{-/-}/IDO^{-/-}/iNOS^{-/-}), zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate der mehrfach-defizienten Tiere in der akuten bzw. chronischen Phase der Toxoplasmose führt.

Abschließend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass der IDO in vivo eine antiparasitäre Funktion gegenüber T. gondii zugesprochen werden kann. Somit ist der IDO-vermittelte antiparasitäre Effekt, der zuvor in humanen Zellkultursystemen beschrieben wurde (MacKenzie et al., 2007; MacKenzie et al., 1999; Meisel et al., 2011; Pfefferkorn, 1984; Schwartzman et al., 1990), auf das Mausmodell in vivo übertragbar. Des Weiteren konnten im Toxoplasmosemodell der Maus Hinweise auf eine immunsuppressive Wirkung der IDO gefunden werden.

Letztlich muss erwähnt werden, dass das Vorhandensein bzw. die Aktivität der IDO während der Toxoplasmose in der Maus für das Überleben jedoch nicht essentiell ist, da weitere Effektorproteine, wie die iNOS oder GTPasen, wirksam sind, um dem Wachstum der Parasiten entgegenzuwirken. Da im murinen Modell der Toxoplasmose mehrere Spezies-spezifische

Effektormechanismen (IRGs und iNOS) bedeutsam sind, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Wenn man jedoch berücksichtigt, dass die IDO in in vitro Modellen mit humanen Zellen der effektivste Mechanismus gegen Toxoplasmen zu sein scheint, ist davon auszugehen, dass die IDO im Verlauf der Toxoplasmose im Menschen eine größere Rolle spielt als im murinen System.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression bzw. Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in der Lunge von Mäusen während einer Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten des Typ 2 Stammes (ME49) eine antiparasitäre Funktion besitzt. Diese Funktion wurde zuvor ausschließlich in Experimenten mit humanen Zellen *in vitro* gezeigt: Durch die IDO-vermittelte Degradation von Tryptophan und die korrelierende Produktion von Kynurenin in der Lunge von infizierten Wildtyp Mäusen (WT), kommt es in der akuten Phase der Infektion (Tag 7 und 9 *p.i.*) zu einem verringerten Wachstum des Tryptophan-auxotrophen Parasiten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der IDO während einer *T. gondii* Infektion mit einer, im Vergleich zum WT, verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine in der Lunge einhergeht. Histologische Untersuchungen der Lunge zeigten, dass die Toxoplasmeninfektion bei beiden Genotypen eine interstitielle Pneumonie auslöst, die durch eine an Tag 9 *p.i.* beginnende Infiltration von T-Zellen gekennzeichnet ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der Lunge infizierter IDO defizienter Tiere, verglichen mit WT Tieren, eine geringere Anzahl CD4 positiver T-Zellen vorhanden ist.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die infektionsbedingte Degradation von Tryptophan und die Produktion von Kynurenin im Serum von WT Mäusen messbar ist. Ferner wurde gezeigt, dass die maximale Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Serum von IDO defizienten Tieren tendenziell zwei Tage später erreicht wird, als im Serum von WT Tieren. Dies deutet darauf hin, dass die IDO *in vivo* auch immunmodulatorische Funktionen während einer Toxoplasmeninfektion einnimmt. Immunisierungs-Studien ergaben jedoch, dass der IDO bei der Ausbildung einer protektiven Immunität keine essentielle Rolle zugesprochen werden kann: Sowohl WT als auch IDO defiziente Tiere überleben eine gewöhnlich letale Infektion mit einem Typ 1 Toxoplasmen Stamm (RH), sofern sie zuvor mit einer subletalen Dosis eines Typ 2 Stammes (ME49) immunisiert wurden.

Neben den Veränderungen in der Lunge, konnten auch in der Leber sowie in der Milz infektionsbedingte Schädigungen nachgewiesen werden: Auffällig war insbesondere eine Hepatomegalie mit Leukoplakie-ähnlichen Veränderungen sowie eine enorme Schädigung des Leberparenchyms. Dabei wiesen IDO defiziente Tiere an Tag 7 *p.i.* höhere Leberschäden und gleichzeitig eine höhere Parasiten-Last in der Leber auf.

In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen der Milz zeigten, dass die Toxoplasmeninfektion zur Splenomegalie führt. Zusätzlich erhöhte sich die Anzahl apoptotischer T- und B-Zellen in der Milz *T. gondii* infizierter Mäuse beider Genotypen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen letztlich darauf schließen, dass das Vorhandensein bzw. die Aktivität der IDO während der Toxoplasmose in der Maus für das Überleben nicht entscheidend ist. Dies liegt vermutlich daran, dass weitere Effektorproteine, wie die induzierbare NO-Synthase (iNOS) oder Guanosintriphosphatasen (GTPasen), in der Lunge beider Genotypen wirksam sind und das Wachstum des Parasiten IDO-unabhängig einschränken.

6. Summary

The present thesis is concerned with anti-parasitic functions of the Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) during infection with *T. gondii* tachyzoites of type 2 strain (ME49) in mice. Up to now this function has only been shown in *in vitro* experiments with human cells: In this thesis it was shown that the induction of pulmonary IDO as a result of *i.p.* infection with toxoplasma is important for lowering parasite growth in mice: Comparison of toxoplasma load in lungs of infected wild type (WT) and IDO deficient mice suggests that pulmonary IDO mediated degradation of tryptophan and correlating production of kynurenine in lungs of infected WT mice lead to reduced growth of the tryptophan-auxotroph parasite in the acute phase of the infection (day 7 and 9 *p.i.*).

In addition, deletion of IDO during *T. gondii* infection correlates with increased proinflammatory cytokine-concentration in the lungs of IDO^{-/-} compared to WT mice. Histological examination of the lung tissue of *T. gondii* infected mice revealed that animals of both genotypes suffered from an interstitial pneumonia which is characterized by the infiltration of T-cells: Flow cytometry categorized these infiltrating cells predominantly as CD4⁺ T-cells. Compared to the WT, lungs of IDO deficient mice showed a lower amount of CD4⁺ T-cells.

Furthermore, HPLC-measurement demonstrated that *i.p.* infection with *T. gondii* leads to decreased tryptophan-concentration and increased kynurenine-concentration in sera of infected WT animals. Moreover, compared to WT, analysis of cytokine-levels in sera of infected IDO^{-/-} mice revealed that maximum cytokine-concentration is delayed by two days suggesting an immunomodulatory function of IDO. However, immunization-experiments demonstrated that the IDO enzyme does not play an essential role during the development of protective immunity against *T. gondii*: Both, WT and IDO deficient mice survived an infection with type 1 toxoplasma (RH) which is usually lethal, when they had been immunized with a sub lethal dosage of type 2 toxoplasma (ME49) before.

Beside infection-caused changes of the lung, there were also infection-caused damages in the liver and in the spleen: Especially hepatomegaly with leucoplacia-like tissue changes and enormous damages of liver parenchyma were prominent. Interestingly, liver tissue of IDO deficient mice showed stronger damage and simultaneously a higher parasite load at day 7 *p.i.*, compared to the WT.

Investigation of the spleen demonstrated that *T. gondii* infection leads to splenomegaly. Additional analysis revealed an increase of apoptotic T- and B-cells in the spleen of infected WT and IDO deficient mice.

At last, the experiments of the present thesis suggest that the expression and the activity of the IDO enzyme are not crucial during *T. gondii* infection in mice. This might be due to other effector proteins, such as inducible NO-synthase (iNOS) or guanosintriphosphatases (GTPases), which are also able to inhibit the growth of the parasite in an IDO independent manner.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Walter Däubener möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie für die unkomplizierte, durchgängige Finanzierung bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die bereitwillige Übernahme des Korreferats und der Betreuung meiner Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit diese Doktorarbeit in seinem Institut anzufertigen.

Herzlich möchte ich mich bei den lieben TAs Vanessa und Claudia alias „Miss Piggy“ und „Kackfrosch“ bedanken. Eure Unterstützung hat mich wirklich entlastet als es mehr als nötig war. Die beruflichen sowie privaten Besprechungen waren mir immer eine Freude und sehr beruhigend. Vanessa, ich wünsch dir nur das Beste und bin mehr als optimistisch. Streng dich bloß an! Tschakka!

Ich möchte mich ebenso herzlich bei weiteren (Ex-)Mitgliedern des Instituts bedanken: Julia Hartmann-Küpper, Nicole Küpper-Hartmann, Uschi, Apu-Krefeld-*connction*, Sonja, Conny, Piali, Margareteli und Verena. Ohne euch wäre der Wahnsinn des Arbeitsalltags bei Weitem nicht so lustig gewesen. Und wem hätte ich sonst meine *Paycash*-Ware vermacht? Bleibt wie ihr seid!

Auch Herrn Günther van Bonn („Herr van Bommelmann“) möchte ich Dank aussprechen, da er mir zügig, äußerst kompetent und mit kreativen Verwaltungsumleitungen bei Reparaturen rund um die HPLC unter die Arme gegriffen hat. Auch sonntags!

Auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und stete Diskussionsbereitschaft bei Problemen, Verwirrungen oder sonstigen Gedankengang-Knoten bedanken.

Julia!!! Nadine the Brain wäre stolls auf uns! Ich würde sagen: „Was man hat, hat man!“, oder war es „Was man hat, hat man doch nicht!“? -Nein: „Was man nicht hat, wird man auch nicht kriegen!“? Wie auch immer: Es tat so oft so gut Dinge mit dir zu besprechen und eine Verbündete zu haben. Es war ein ewiger Kampf die Toleranz- sowie Frustrationsgrenze immer weiter zu verschieben, wegzuhören oder einfach alles nochmal und nochmal und nochmal zu machen. „Was sind das hier überhaupt für *Blätta*...und diese ganzen Buchstaben...*śmieci*!“

Nicht zu vergessen sind meine lieben Freunde, die mir Motivationsschübe geben konnten und denen ich die nervtötenden Ereignisse des Arbeitsalltags erzählen konnte, was eigentlich im Nachhinein meistens sehr belustigend war. Ich bin froh, dass es euch gibt!

Auch meinen Eltern und meiner lieben Omi möchte ich danken: „No to tyle! Starczy juz!“

8. 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. *J Immunol* 144, 2725-2729.
- Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C. R., Rüsing, 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 Infect* 6, 806-812.
- Alexander, J., Schariton-Kersten, T. M., Yap, G., Roberts, C. W., Liew, F. Y., and Sher, A. (1997). Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1355-1359.
- 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.
- Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Velasco-Velazquez, M. A., Garces-Alvarez, M. E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabian, S., and Pavon, L. (2015). Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin. *J Immunol Res* 2015, 354957.
- Asundi, V. K., Stahl, R. C., Showalter, L., Conner, K. J., and Carey, D. J. (1994). Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1217, 257-265.
- Ball, H. J., Jusof, F. F., Bakmiwewa, S. M., Hunt, N. H., and Yuasa, H. J. (2014). Tryptophan-catabolizing enzymes - party of three. *Front Immunol* 5, 485.
- Ball, H. J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C. J., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J. A., Stocker, R., Jermini, L. S., and Hunt, N. H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396, 203-213.
- 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 Biol* 6, R92.
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321, 424.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Fütterer, A., Pfeffer, K., and Howard, J. C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161, 6715-6723.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Buchbinder, S., Blatz, R., and Rodloff, A. C. (2003). Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45, 269-271.
- Cai, G., Kastelein, R., and Hunter, C. A. (2000). Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 68, 6932-6938.
- Canning, E. U. (1990). Protozoan infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 Suppl 1, 19-24.

- Carlin, J. M., Borden, E. C., and Byrne, G. I. (1989a). Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. *J Interferon Res* 9, 329-337.
- Carlin, J. M., Ozaki, Y., Byrne, G. I., Brown, R. R., and Borden, E. C. (1989b). Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia* 45, 535-541.
- Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., and Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-3656.
- Cerioti, F., Henny, J., Queralto, J., Ziyu, S., Ozarda, Y., Chen, B., Boyd, J. C., Panteghini, M., Intervals, I. C. o. R., Decision, L., and Committee on Reference Systems for, E. (2010). Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. *Clin Chem Lab Med* 48, 1593-1601.
- Chang, H. R., Grau, G. E., and Pechere, J. C. (1990). Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 69, 33-37.
- Chen, Y., and Guillemin, G. J. (2009). Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res* 2, 1-19.
- Cheng, Y. S., Becker-Manley, M. F., Chow, T. P., and Horan, D. C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J Biol Chem* 260, 15834-15839.
- Cheng, Y. S., Colonna, R. J., and Yin, F. H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258, 7746-7750.
- 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. *Mol Cell Biol* 11, 4717-4725.
- Choi, B. D., Fecci, P. E., and Sampson, J. H. (2012). Regulatory T cells move in when gliomas say "I Do". *Clin Cancer Res* 18, 6086-6088.
- Collazo, C. M., Yap, G. S., Sempowski, G. D., Lusby, K. C., Tessarollo, L., Vande Woude, G. F., Sher, A., and Taylor, G. A. (2001). Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med* 194, 181-188.
- Contini, C., Giuliodori, M., Cultrera, R., and Seraceni, S. (2006). Detection of clinical-stage specific molecular *Toxoplasma gondii* gene patterns in patients with toxoplasmic lymphadenitis. *J Med Microbiol* 55, 771-774.
- 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.
- Cooper, J. R., and Melcer, I. (1961). The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 132, 265-268.
- Dai, W., Pan, H., Kwok, O., and Dubey, J. P. (1994). Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J Interferon Res* 14, 313-317.
- Dang, Y., Dale, W. E., and Brown, O. R. (2000). Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free Radic Biol Med* 28, 615-624.

- Däubener, W., Spors, B., Hücke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., and Schroten, H. (2001). Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 69, 6527-6531.
- 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*. *J Immunol* 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. *Lab Invest* 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. *J Immunol* 179, 7729-7740.
- Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klümpers, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 294-299.
- Denis, M. (1994). Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 55, 682-684.
- Derouin, F., and Garin, Y. J. (1991). *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *Exp Parasitol* 73, 460-468.
- Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* 50, 146-159.
- Divanovic, S., Sawtell, N. M., Trompette, A., Warning, J. I., Dias, A., Cooper, A. M., Yap, G. S., Arditi, M., Shimada, K., Duhadaway, J. B., *et al.* (2012). Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *J Infect Dis* 205, 152-161.
- Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28, 1019-1024.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* 157, 1767-1770.
- Dubey, J. P., Speer, C. A., Shen, S. K., Kwok, O. C., and Blixt, J. A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 83, 870-882.
- Dubremetz, J. F., and Ferguson, D. J. (2009). The role played by electron microscopy in advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. *Int J Parasitol* 39, 883-893.
- Ebe, Y., Hasegawa, G., Takatsuka, H., Umezu, H., Mitsuyama, M., Arakawa, M., Mukaida, N., and Naito, M. (1999). The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 49, 519-532.
- Esch, K. J., and Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev* 26, 58-85.
- Eza, D. E., and Lucas, S. B. (2006). Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Med* 7, 415-420.

- Fallarino, F., and Grohmann, U. (2011). Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance: IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr Med Chem* 18, 2215-2221.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003a). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-1212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2003b). T cell apoptosis by kynurenines. *Adv Exp Med Biol* 527, 183-190.
- Flegr, J. (2013). How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol* 29, 156-163.
- Frenkel, J. K. (1970). Pursuing toxoplasma. *J Infect Dis* 122, 553-559.
- Frenkel, J. K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 4, 273-278.
- Frenkel, J. K., and Dubey, J. P. (1972). Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis* 126, 664-673.
- Frenkel, J. K., Ruiz, A., and Chinchilla, M. (1975). Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 24, 439-443.
- Freyre, A., Dubey, J. P., Smith, D. D., and Frenkel, J. K. (1989). Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol* 75, 750-755.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196, 459-468.
- Fuentes, I., Rubio, J. M., Ramirez, C., and Alvar, J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 39, 1566-1570.
- Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H., and Seishima, M. (2002). L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 70, 779-786.
- Fujigaki, S., Takemura, M., Hamakawa, H., Seishima, M., and Saito, K. (2003). The mechanism of interferon-gamma induced anti *Toxoplasma gondii* by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues. *Adv Exp Med Biol* 527, 97-103.
- Fukushige, H., Fukuda, Y., Tanaka, M., Inami, K., Wada, K., Tsumura, Y., Kondo, M., Harada, T., Wakamura, T., and Morita, T. (2014). Effects of tryptophan-rich breakfast and light exposure during the daytime on melatonin secretion at night. *J Physiol Anthropol* 33, 33.
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149, 175-180.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146, 286-292.

- Gazzinelli, R. T., Mendonca-Neto, R., Lilue, J., Howard, J., and Sher, A. (2014). Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe* 15, 132-138.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, 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. *J Immunol* 157, 798-805.
- Granger, D. L., Hibbs, J. B., Jr., Perfect, J. R., and Durack, D. T. (1988). Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81, 1129-1136.
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., and Nacy, C. A. (1990). Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145, 4290-4297.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3, 1097-1101.
- Haan, G. J., Hindriks, F. R., and Groen, A. (1977). Evaluation of the aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) assays on the Technicon SMAC. *Clin Chem* 23, 615-616.
- Habara-Ohkubo, A., Shirahata, T., Takikawa, O., and Yoshida, R. (1993). Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 61, 1810-1813.
- Haber, R., Bessette, D., Hulihan-Giblin, B., Durcan, M. J., and Goldman, D. (1993). Identification of tryptophan 2,3-dioxygenase RNA in rodent brain. *J Neurochem* 60, 1159-1162.
- Hainz, U., Obexer, P., Winkler, C., Sedlmayr, P., Takikawa, O., Greinix, H., Lawitschka, A., Pötschger, U., Fuchs, D., Ladisch, S., and Heitger, A. (2005). Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 105, 4127-4134.
- 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 Pathog* 9, e1003414.
- Han, B. H., Park, D. J., Lim, R. W., Im, J. H., and Kim, H. D. (1998). Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* 1384, 373-386.
- Hansen, A. M., Ball, H. J., Mitchell, A. J., Miu, J., Takikawa, O., and Hunt, N. H. (2004). Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *Int J Parasitol* 34, 1309-1319.
- Hayaishi, O., Hirata, F., Fujiwara, M., Senoh, S., and Tokuyama, T. (1975). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol* 29, 291-293.
- Hayashi, T., Rao, S. P., Takabayashi, K., Van Uden, J. H., Kornbluth, R. S., Baird, S. M., Taylor, M. W., Carson, D. A., Catanzaro, A., and Raz, E. (2001). Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 69, 6156-6164.

- Heseler, K., Schmidt, S. K., Spekker, K., Sinzger, C., Sorg, R. V., Quambusch, M., Zimmermann, A., Meisel, R., and Däubener, W. (2013). Cytomegalovirus impairs the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antimicrobial and immunoregulatory effects in human fibroblasts. *PLoS One* 8, e64442.
- Heseler, K., Spekker, K., Schmidt, S. K., MacKenzie, C. R., and Däubener, W. (2008). Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 273-281.
- 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 Parasitol (Praha)* 57, 129-135.
- Hirata, F., Nomiyama, S., and Hayaishi, O. (1975). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note I. Catalytic and molecular properties. *Acta Vitaminol Enzymol* 29, 288-290.
- Holland, G. N. (1999). Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 128, 502-505.
- Howard, J. C., Hunn, J. P., and Steinfeldt, T. (2011). The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* 14, 414-421.
- Howe, D. K., and Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 1561-1566.
- Hucke, C., MacKenzie, C. R., Adjogble, K. D., Takikawa, O., and Däubener, W. (2004). Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 72, 2723-2730.
- Hunter, C. A., Candolfi, E., Subauste, C., Van Cleave, V., and Remington, J. S. (1995a). Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology* 84, 16-20.
- Hunter, C. A., Chizzonite, R., and Remington, J. S. (1995b). IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 155, 4347-4354.
- Hunter, C. A., Roberts, C. W., Murray, M., and Alexander, J. (1992). Detection of cytokine mRNA in the brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Parasite Immunol* 14, 405-413.
- Hunter, C. A., and Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10, 766-778.
- Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., and Young, H. A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164, 3596-3599.
- Jacobs, L., Remington, J. S., and Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46, 11-21.
- Jagannath, C., Actor, J. K., and Hunter, R. L., Jr. (1998). Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by Mycobacterium tuberculosis. *Nitric Oxide* 2, 174-186.
- James, S. L., and Glaven, J. (1989). Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 143, 4208-4212.
- Jenne, C. N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 14, 996-1006.

- 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., and Sayles, P. C. (2002). Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun* 70, 185-191.
- Jones, C. D., Okhravi, N., Adamson, P., Tasker, S., and Lightman, S. (2000). Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 634-644.
- Jones, T. C., Alkan, S., and Erb, P. (1986). Spleen and lymph node cell populations, in vitro cell proliferation and interferon-gamma production during the primary immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 8, 619-629.
- Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M., and Sekiba, K. (1991). Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama* 45, 135-139.
- 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., and Howard, J. C. (2010). Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* 12, 939-961.
- Koblansky, A. A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M. S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119-130.
- Koseoglu, E., Yazar, S., and Koc, I. (2009). Is *Toxoplasma gondii* a causal agent in migraine? *Am J Med Sci* 338, 120-122.
- Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wuerthner, J., Pfeffer, K., and Beer, S. (2008). Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* 9, 158.
- Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R., and Bechmann, I. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J* 19, 1347-1349.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-1586.
- Lee, W. Y., Moriarty, T. J., Wong, C. H., Zhou, H., Strieter, R. M., van Rooijen, N., Chaconas, G., and Kubes, P. (2010). An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol* 11, 295-302.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J., and Boothroyd, J. C. (2000). *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol* 96, 89-96.
- Lennon, P. F., Taylor, C. T., Stahl, G. L., and Colgan, S. P. (1998). Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 188, 1433-1443.
- Liesenfeld, O., Parvanova, I., Zerrahn, J., Han, S. J., Heinrich, F., Munoz, M., Kaiser, F., Aebischer, T., Buch, T., Waisman, A., et al. (2011). The IFN-gamma-inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. *PLoS One* 6, e20568.

- 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. *J Exp Med* 203, 2063-2071.
- Löb, S., Königsrainer, A., Rammensee, H. G., Opelz, G., and Terness, P. (2009a). Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer* 9, 445-452.
- Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., Brücher, B. L., Rammensee, H. G., Opelz, G., and Terness, P. (2009b). IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother* 58, 153-157.
- Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K. E., Sprent, J., Culley, F. J., Johansson, C., and Openshaw, P. J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol* 5, 161-172.
- Luft, B. J., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211-222.
- MacKenzie, C. R., Heseler, K., Müller, A., and Däubener, W. (2007). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab* 8, 237-244.
- MacKenzie, C. R., Langen, R., Takikawa, O., and Däubener, W. (1999). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon-gamma-induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmatosis. *Eur J Immunol* 29, 3254-3261.
- MacKenzie, C. R., Worku, D., and Däubener, W. (2003). Regulation of IDO-mediated bacteriostasis in macrophages: role of antibiotics and anti-inflammatory agents. *Adv Exp Med Biol* 527, 67-76.
- Mackler, A. M., Barber, E. M., Takikawa, O., and Pollard, J. W. (2003). Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 170, 823-830.
- MacMicking, J. D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 367-382.
- Makala, L. H., Baban, B., Lemos, H., El-Awady, A. R., Chandler, P. R., Hou, D. Y., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2011). *Leishmania* major attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *J Infect Dis* 203, 715-725.
- Marczynski, T. J., Yamaguchi, N., Ling, G. M., and Grodzinska, L. (1964). Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-n-acetyltryptamine) to the hypothalamus in unrestrained cats. *Experientia* 20, 435-437.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J. C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog* 1, e24.
- Mashayekhi, M., Sandau, M. M., Dunay, I. R., Frickel, E. M., Khan, A., Goldszmid, R. S., Sher, A., Ploegh, H. L., Murphy, T. L., Sibley, L. D., and Murphy, K. M. (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35, 249-259.
- McAuley, J. B. (2014). Congenital Toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3, S30-S35.

- 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*. *J Immunol* 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.
- Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M., and Munn, D. H. (2003a). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 171, 1652-1655.
- Mellor, A. L., Munn, D., Chandler, P., Keskin, D., Johnson, T., Marshall, B., Jhaver, K., and Baban, B. (2003b). Tryptophan catabolism and T cell responses. *Adv Exp Med Biol* 527, 27-35.
- Metz, R., Duhadaway, J. B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A. J., and Prendergast, G. C. (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res* 67, 7082-7087.
- Metz, R., Rust, S., Duhadaway, J. B., Mautino, M. R., Munn, D. H., Vahanian, N. N., Link, C. J., and Prendergast, G. C. (2012). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* 1, 1460-1468.
- Metz, R., Smith, C., DuHadaway, J. B., Chandler, P., Baban, B., Merlo, L. M., Pigott, E., Keough, M. P., Rust, S., Mellor, A. L., *et al.* (2014). IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. *Int Immunol* 26, 357-367.
- Miki, T., Sun, H., Lee, Y., Tandin, A., Kovscek, A. M., Subbotin, V., Fung, J. J., and Valdivia, L. A. (2001). Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc* 33, 129-130.
- Miman, O., Kusbeci, O. Y., Aktepe, O. C., and Cetinkaya, Z. (2010a). The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 475, 129-131.
- Miman, O., Mutlu, E. A., Ozcan, O., Atambay, M., Karlidag, R., and Unal, S. (2010b). Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive-compulsive disorder? *Psychiatry Res* 177, 263-265.
- Moffett, J. R., and Namboodiri, M. A. (2003). Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 81, 247-265.
- Müller, A., Heseler, K., Schmidt, S. K., Spekter, K., Mackenzie, C. R., and Däubener, W. (2009). The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med* 13, 1125-1135.
- Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G. C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11, 312-319.
- Muller, A. J., and Prendergast, G. C. (2005). Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer Res* 65, 8065-8068.
- 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. *J Exp Med* 189, 1363-1372.

- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A. L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22, 633-642.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., and Mellor, A. L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 172, 4100-4110.
- 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.
- Murakami, Y., Hoshi, M., Hara, A., Takemura, M., Arioka, Y., Yamamoto, Y., Matsunami, H., Funato, T., Seishima, M., and Saito, K. (2012). Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine* 59, 245-251.
- Murray, H. W., and Teitelbaum, R. F. (1992). L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 165, 513-517.
- Nakamura, T., Shinno, H., and Ichihara, A. (1980). Insulin and glucagon as a new regulator system for tryptophan oxygenase activity demonstrated in primary cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 255, 7533-7535.
- Nelson, D. E., Virok, D. P., Wood, H., Roshick, C., Johnson, R. M., Whitmire, W. M., Crane, D. D., Steele-Mortimer, O., Kari, L., McClarty, G., and Caldwell, H. D. (2005). Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10658-10663.
- Nguyen, T. T., Hu, Y., Widney, D. P., Mar, R. A., and Smith, J. B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 22, 899-909.
- Nicholson, S., Bonecini-Almeida Mda, G., Lapa e Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., *et al.* (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 183, 2293-2302.
- Nicolle, C. und Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 148:369-372.
- Nino-Castro, A., Abdullah, Z., Popov, A., Thabet, Y., Beyer, M., Knolle, P., Domann, E., Chakraborty, T., Schmidt, S. V., and Schultze, J. L. (2014). The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against *Listeria monocytogenes*. *Innate Immun* 20, 401-411.
- Notarangelo, F. M., Wilson, E. H., Horning, K. J., Thomas, M. A., Harris, T. H., Fang, Q., Hunter, C. A., and Schwarcz, R. (2014). Evaluation of kynurenine pathway metabolism in *Toxoplasma gondii*-infected mice: implications for schizophrenia. *Schizophr Res* 152, 261-267.
- Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I., and Shimokata, K. (1997). Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 65, 3644-3647.
- Oberdörfer, C., Adams, O., MacKenzie, C. R., De Groot, C. J., and Däubener, W. (2003). Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv Exp Med Biol* 527, 15-26.
- Obojes, K., Andres, O., Kim, K. S., Däubener, W., and Schneider-Schaulies, J. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol* 79, 7768-7776.

- Olszewski, M. A., Gray, J., and Vestal, D. J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J Interferon Cytokine Res* 26, 328-352.
- Orabona, C., and Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory function: tryptophan starvation and beyond. *Methods Mol Biol* 677, 269-280.
- Orefice, G., Carrieri, P. B., Chirianni, A., Rubino, S., Liuzzi, G., Napolitano, G., and Rocco, A. (1992). Cerebral toxoplasmosis and AIDS. Clinical, neuroradiological and immunological findings in 15 patients. *Acta Neurol (Napoli)* 14, 493-502.
- Padgett, E. L., and Pruett, S. B. (1992). Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 775-781.
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biciato, S., *et al.* (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12, 870-878.
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39, 1385-1394.
- Parker, S. J., Roberts, C. W., and Alexander, J. (1991). CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol* 84, 207-212.
- Pearce, B. D., Kruszon-Moran, D., and Jones, J. L. (2012). The relationship between *Toxoplasma gondii* infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey. *Biol Psychiatry* 72, 290-295.
- Peng, K., and Monack, D. M. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* 78, 2723-2733.
- Pfefferkorn, E. R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 908-912.
- Pfefferkorn, E. R., Eckel, M., and Rebhun, S. (1986). Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol* 20, 215-224.
- Pifer, R., and Yarovinsky, F. (2011). Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol* 27, 388-393.
- Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolusic, E., Frederick, R., De Plaen, E., Uyttenhove, C., Wouters, J., Masereel, B., and Van den Eynde, B. J. (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2497-2502.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M. F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* 3, 77-87.
- Pomeroy, C., and Filice, G. A. (1992). Pulmonary toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis* 14, 863-870.
- Puccetti, P., and Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 7, 817-823.

- Rich, E. A., Torres, M., Sada, E., Finegan, C. K., Hamilton, B. D., and Toossi, Z. (1997). Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber Lung Dis* 78, 247-255.
- Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lonnie, H., Marschall, H. U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., *et al.* (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81, 1390-1397.
- Roshick, C., Wood, H., Caldwell, H. D., and McClarty, G. (2006). Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun* 74, 225-238.
- Ruskin, J., and Remington, J. S. (1971). Resistance to intracellular infection in mice immunized with *Toxoplasma* vaccine and adjuvant. *J Reticuloendothel Soc* 9, 465-479.
- Sage, L. K., Fox, J. M., Mellor, A. L., Tompkins, S. M., and Tripp, R. A. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity during the primary immune response to influenza infection modifies the memory T cell response to influenza challenge. *Viral Immunol* 27, 112-123.
- Sakurai, K., Zou, J. P., Tschetter, J. R., Ward, J. M., and Shearer, G. M. (2002). Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 129, 186-196.
- 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. *Scand J Immunol* 79, 1-11.
- Sattler, C., Steinsdoerfer, M., Offers, M., Fischer, E., Schierl, R., Heseler, K., Däubener, W., and Seissler, J. (2011). Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant* 20, 1221-1230.
- Scharton-Kersten, T. M., Wynn, T. A., Denkers, E. Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R. T., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 157, 4045-4054.
- Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Magram, J., and Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 185, 1261-1273.
- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., and Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol* 304, 917-929.
- Schmidt, S. K., Müller, A., Heseler, K., Woite, C., Spekter, K., MacKenzie, C. R., and Däubener, W. (2009). Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Eur J Immunol* 39, 2755-2764.
- Schmidt, S. K., Siepmann, S., Kuhlmann, K., Meyer, H. E., Metzger, S., Pudilko, S., Leineweber, M., and Däubener, W. (2012). Influence of tryptophan contained in 1-Methyl-Tryptophan on antimicrobial and immunoregulatory functions of indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLoS One* 7, e44797.
- Schwartzman, J. D., Gonias, S. L., and Pfefferkorn, E. R. (1990). Murine gamma interferon fails to inhibit *Toxoplasma gondii* growth in murine fibroblasts. *Infect Immun* 58, 833-834.
- Schwemmler, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P., and Schultz, U. (1996). Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J Biol Chem* 271, 10304-10308.

- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 2570-2582.
- Sheth, K., and Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care* 7, 99-104.
- Shimizu, T., Nomiyama, S., Hirata, F., and Hayaishi, O. (1978). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem* 253, 4700-4706.
- 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., Messina, M., and Niesman, I. R. (1994). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5508-5512.
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M., and Howe, D. K. (2002). Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 81-88.
- Silva, N. M., Rodrigues, C. V., Santoro, M. M., Reis, L. F., Alvarez-Leite, J. I., and Gazzinelli, R. T. (2002). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70, 859-868.
- Silva, N. M., Vieira, J. C., Carneiro, C. M., and Tafuri, W. L. (2009). *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp Parasitol* 123, 65-72.
- Staeheli, P., Colonna, R. J., and Cheng, Y. S. (1983). Different mRNAs induced by interferon in cells from inbred mouse strains A/J and A2G. *J Virol* 47, 563-567.
- Steckel, N. K., Kuhn, U., Beelen, D. W., and Elmaagacli, A. H. (2003). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol* 57, 185-191.
- Sturge, C. R., and Yarovinsky, F. (2014). Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 82, 3090-3097.
- Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., et al. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ* 21, 388-396.
- Sukhumavasi, W., Egan, C. E., Warren, A. L., Taylor, G. A., Fox, B. A., Bzik, D. J., and Denkers, E. Y. (2008). TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J Immunol* 181, 3464-3473.
- 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.
- Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 12-19.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., and Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217-1258.

- Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196, 447-457.
- Thomas, S. R., Mohr, D., and Stocker, R. (1994). Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 269, 14457-14464.
- Torrey, E. F., Bartko, J. J., Lun, Z. R., and Yolken, R. H. (2007). Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull* 33, 729-736.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.
- Vestal, D. J., Buss, J. E., Kelner, G. S., Maciejewski, D., Asundi, V. K., and Maki, R. A. (1996). Rat p67 GBP is induced by interferon-gamma and isoprenoid-modified in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 528-534.
- Wynn, T. A., Nicolet, C. M., and Paulnock, D. M. (1991). Identification and characterization of a new gene family induced during macrophage activation. *J Immunol* 147, 4384-4392.
- Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y., and Nagata, S. (2014). Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *Elife* 3, e02172.
- 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.
- 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 Infect* 8, 1174-1178.
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 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., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.
- Yazar, S., Arman, F., Yalcin, S., Demirtas, F., Yaman, O., and Sahin, I. (2003). Investigation of probable relationship between *Toxoplasma gondii* and cryptogenic epilepsy. *Seizure* 12, 107-109.
- Yoshida, R., and Hayaishi, O. (1978). Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3998-4000.
- Yoshida, R., Urade, Y., Tokuda, M., and Hayaishi, O. (1979). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4084-4086.
- Yu, H., Huang, B., Zhuo, X., Chen, X., and Du, A. (2013). Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy SAG1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 197, 670-673.
- Zhang, Y. J., Reddy, M. C., Ioerger, T. R., Rothchild, A. C., Dartois, V., Schuster, B. M., Trauner, A., Wallis, D., Galaviz, S., Huttenhower, C., *et al.* (2013). Tryptophan biosynthesis protects mycobacteria from CD4 T-cell-mediated killing. *Cell* 155, 1296-1308.
- Zhao, Y. O., Rohde, C., Lilue, J. T., Konen-Waisman, S., Khaminets, A., Hunn, J. P., and Howard, J. C. (2009). *Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 234-240.

Zimmermann, A., Hauka, S., Maywald, M., Le, V. T., Schmidt, S. K., Däubener, W., and Hengel, H. (2014). Checks and balances between human cytomegalovirus replication and indoleamine-2,3-dioxygenase. *J Gen Virol* 95, 659-670.

Verwendete Bücher:

Abbas, Lichtman und Pillai: Cellular and molecular immunology, 6th edition, 2012

Fritsch und Kühnel: Taschenatlas Anatomie, Innere Organe, 9. Auflage, Band 2, 2005

Gross, *Toxoplasma gondii*, 2006

Löffler und Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage, 1990

Lippert, Herbold und Lippert-Burmester: Anatomie, Text und Atlas, 9. Auflage, 2010

Murphy, Travers und Walport: Janeways' Immunobiology, 7th edition, 2006

Speckmann und Wittkowski: Bau und Funktionen des menschlichen Körpers, Praxisorientierte Anatomie und Physiologie, 18. Auflage, 1994

Weiss und Kim: *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: perspectives and methods, 2007

Welsch: Sobotta - Atlas Histologie, 6. Auflage 2002