



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

# **Neue Zytokin abhängige und unabhängige Funktion von Jak2 in der Apoptose und bei Infektionen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Pia Liebfried**

aus Mettmann

Düsseldorf, März 2016

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. Klaus Pfeffer  
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2016





## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Apoptose .....	1
1.1.1 Die Signalwege der Apoptose .....	2
1.1.2 Regulatoren der Apoptose .....	8
1.2 Das Immunsystem: Ein Schutzmechanismus gegen Pathogene .....	14
1.2.1 Der Parasit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
1.2.2 Die Antwort des Immunsystems auf eine Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	18
1.3 Janus Kinasen und „Signal Transducers and Activators of Transcription“ .....	24
1.3.1 Die Jak-Stat Signaltransduktion .....	24
1.3.2 Der strukturelle Aufbau der Jaks .....	26
1.3.3 Die Janus Kinase 2 .....	27
1.4 Zielsetzung .....	30
<b>2 Material .....</b>	<b>31</b>
2.1 Verbrauchsmaterial .....	31
2.2 Geräte .....	32
2.3 Chemikalien.....	33
2.4 Primer, Sonden und Plasmide .....	36
2.5 Enzyme .....	37
2.6 Zytokine.....	38
2.7 Antikörper .....	38
2.8 Kits .....	39
2.9 Medien und Puffer .....	40
2.10 Medien für die Zellkultur .....	41
2.11 Bakterienstämme.....	42
2.12 Eukaryotische Zellen/Zelllinien .....	42
2.13 Versuchstiere .....	42
<b>3 Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.1 Zellbiologische Methoden .....	43
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	43
3.1.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen .....	43
3.1.3 Präparation primärer muriner Hepatozyten .....	43
3.1.4 Induktion von Apoptose.....	44
3.1.5 Behandlung eukaryontischer Zellen mit Inhibitoren .....	44
3.1.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen .....	45
3.1.7 Immunfluoreszenzfärbung.....	45
3.1.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials .....	45
3.2 Durchflusszytometrie .....	46

3.2.1	Bestimmung von Apoptose nach Nicoletti.....	46
3.2.2	Messung des mitochondrialen Membranpotentials .....	46
3.2.3	Messung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (mROS) .....	47
3.2.4	Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmarkern .....	47
3.3	Histologische Analysen .....	47
3.3.1	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	48
3.3.2	TUNEL-Färbung .....	48
3.3.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung .....	48
3.3.4	Giemsa-Färbung.....	49
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.4.1	Isolierung von DNA aus Gewebeproben.....	49
3.4.2	Isolierung von RNA aus Zellen .....	50
3.4.3	cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA.....	50
3.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Genotypisierung.....	50
3.4.5	quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	52
3.4.6	quantitative-PCR zur Analyse der <i>T. gondii</i> -Last.....	52
3.4.7	Transformation von <i>E. coli</i> Top10 .....	53
3.4.8	Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien.....	53
3.5	Proteinanalytische Methoden .....	53
3.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen .....	53
3.5.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Organen.....	53
3.5.3	Fraktionierte Zellyse.....	54
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay .....	54
3.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	54
3.5.6	Western-Blot.....	55
3.5.7	Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) .....	55
3.6	Nachweis von RNI (reactive nitrogen intermediates)-Metaboliten.....	56
3.7	Tierversuche .....	56
3.7.1	Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> Zysten .....	56
3.7.2	Entnahme von Versuchsmaterial .....	57
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
4.1	Analyse der Funktion von Jak2 während des programmierten Zelltodes .....	58
4.1.1	Untersuchung des Einflusses von Jak2 auf den Fas-vermittelten Signalweg der Apoptose .....	58
4.1.2	Die anti-apoptotische Funktion von Jak2 in einem Mausmodell .....	65
4.1.3	Der Einfluss von Jak2 auf Signalmechanismen der TNFR-Superfamilie .....	69
4.1.4	Die Lokalisation von Jak2 während der Apoptose.....	73
4.1.5	Die protektive Funktion von Jak2 in Zusammenhang mit der Induktion apoptotisch-relevanter Zielgene.....	76
4.1.6	Der Einfluss von Jak2 auf die Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie .....	81
4.1.7	Jak2 und Mitochondrien.....	83
4.1.8	Die Charakterisierung der protektiven Funktion von Jak2 innerhalb der intrinsischen Apoptose.....	91
4.1.9	Die Charakterisierung der protektiven Funktion von Jak2 in Abhängigkeit einer funktionellen Kinase-Domäne .....	94
4.2	Analyse der Bedeutung von Jak2 während einer parasitären Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	99
4.2.1	Die Generierung eines konditionalen Jak2-Knockouts .....	100

4.2.2	Relevanz der Expression von Jak2 in Makrophagen und Granulozyten für das Überleben nach einer <i>T. gondii</i> Infektion .....	102
4.2.3	Anatomische Beurteilung im Verlauf einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	104
4.2.4	Analyse von Zelltypen des Immunsystems während der Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	108
4.2.5	Analyse der parasitären Last in Organen während der Infektion mit <i>T. gondii</i> ..	118
4.2.6	Untersuchung proinflammatorischer Zytokine während der Immunantwort gegen <i>T. gondii</i> .....	121
4.2.7	Analyse IFN- $\gamma$ induzierter anti-parasitärer Mechanismen .....	122
4.2.8	Histologische Analysen von Organen nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	124
4.2.9	Analyse der Jak2 Expression in der Milz .....	129
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>131</b>
5.1	Apoptose .....	131
5.1.1	Identifizierung einer protektiven Funktion von Jak2 während der Apoptose	131
5.1.2	Protektion von humanen Zellen durch Jak2 .....	134
5.1.3	Biologische Relevanz der Jak2 vermittelten protektiven Funktion (Beispiel: Leber) .....	136
5.1.4	Jak2 ist Teil des Todesrezeptor-induzierten Signalweges .....	138
5.1.5	Nukleäres Jak2 beeinflusst die Regulation anti-apoptotischer Gene .....	139
5.1.6	Jak2 ist essentiell für die mitochondriale Integrität .....	143
5.1.7	Die Dualität der Janus Kinase 2 während der Todesrezeptor induzierten Apoptose.....	148
5.2	Die Funktion von Jak2 während parasitärer Infektionen.....	150
5.2.1	Die zelluläre Immunantwort während der Toxoplasmose .....	152
5.2.2	Manifestation der akuten Toxoplasmose .....	155
5.3	Ausblick.....	157
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>162</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>193</b>
9.1	Publikationen.....	193
9.2	Danksagung .....	194
9.3	Eidesstattliche Erklärung .....	195

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Klassifizierung der Familie der Caspasen.....	3
Abb. 1.2 Todesrezeptoren und ihre Liganden.....	4
Abb. 1.3 Die Todesrezeptor induzierte Apoptose.....	6
Abb. 1.4 Die intrinsisch induzierte Apoptose.....	8
Abb. 1.5 Der programmierte Zelltod wird durch anti-apoptotische Faktoren reguliert.....	9
Abb. 1.6 Der Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> .....	17
Abb. 1.7 Immunantwort auf eine Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	21
Abb. 1.8 IFN- $\gamma$ -induzierte Effektormechanismen.....	22
Abb. 1.9 Modell der Jak-Stat Signaltransduktion .....	25
Abb. 1.10 Die Domänen-Struktur der Janus Kinasen .....	27
Abb. 1.11 Jak2-abhängige Rezeptoren .....	27
Abb. 4.1: Induktion von Apoptose in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs nach FasL-Stimulation. ....	59
Abb. 4.2: Inhibition der FasL-vermittelten Apoptose in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	61
Abb. 4.3 Aktivierung von Caspasen in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs nach FasL-Inkubation. ..	62
Abb. 4.4 Induktion von Apoptose in 2C4 und $\gamma$ 2A nach FasL Stimulation. Humane.....	63
Abb. 4.5 Induktion von Apoptose und Caspase-Aktivität nach Inhibition von Jak2 in humanen Zellsystemen. ....	64
Abb. 4.6 Induktion von Apoptose nach Inhibition von Jak2 in Jurkat A3 Zellen. ....	65
Abb. 4.7 Morphologie der Leber nach einem Hepatozyten-spezifischen Jak2-Knockout. 66	
Abb. 4.8 Visualisierung apoptotischer Zellen der Leber nach einem Hepatozyten-spezifischen Jak2-Knockout .....	67
Abb. 4.9 Apoptose in FasL stimulierten primären Hepatozyten.....	68
Abb. 4.10 Aktivierung von Caspasen in FasL stimulierten primären Hepatozyten.....	69
Abb. 4.11 Apoptose in TNF stimulierten Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	70
Abb. 4.12 Aktivierung von Caspasen in TNF stimulierten murinen Fibroblasten .....	71
Abb. 4.13 Induzierte Apoptose in TRAIL stimulierten Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	72
Abb. 4.14 Aktivierung von Caspasen in TRAIL stimulierten murinen Fibroblasten .....	72
Abb. 4.15 Änderung der Lokalisation von Jak2 nach FasL Stimulation.....	73
Abb. 4.16 Analyse der subzellulären der Lokalisation von Jak2.....	74
Abb. 4.17 Subzelluläre Lokalisation von Jak2-Trunkationsmutanten .....	75
Abb. 4.18 Bestimmung der Jak2 Lokalisation durch subzelluläre Fraktionierung.....	76
Abb. 4.19 Expression anti-apoptotischer Faktoren nach FasL Stimulation in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	77
Abb. 4.20 Expression pro-apoptotischer Faktoren nach FasL Stimulation in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	78
Abb. 4.21 Expression von Transkriptionsfaktoren nach FasL Stimulation in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	79
Abb. 4.22 Inhibition von NF- $\kappa$ B während der FasL vermittelten Apoptose in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	80
Abb. 4.23 Aktivierung von Bid in FasL-stimulierten murinen Fibroblasten.....	81
Abb. 4.24 Bcl-2 Expression im Verlauf einer Inkubationskinetik mit FasL .....	82
Abb. 4.25 Inhibition von Bcl-2 während der FasL-vermittelten Apoptose in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	83
Abb. 4.26 Darstellung der Mitochondrien in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	84
Abb. 4.27 Analyse der Mitochondrien-Morphologie in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	86
Abb. 4.28 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials.....	88

---

Abb. 4.29 Quantifizierung der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials.....	89
Abb. 4.30 Quantifizierung gebildeter mROS in Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	90
Abb. 4.31 Apoptose in Mitomycin C-stimulierten Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	92
Abb. 4.32 Analyse der Funktionalität der Mitochondrien in Mitomycin C behandelten Fibroblasten.....	93
Abb. 4.33 Apoptose in Thapsigargin stimulierten Jak2 <sup>+/+</sup> und Jak2 <sup>-/-</sup> MEFs .....	94
Abb. 4.34 Analyse der Apoptose Induktion Jak2-Kinase inaktiven MEFs .....	95
Abb. 4.35 Identifizierung von aktivierenden Tyrosin-Phosphorylierungen nach FasL- Stimulation.....	97
Abb. 4.36 Identifizierung von aktivierten MAPK nach FasL Stimulation.....	98
Abb. 4.37 Induktion von Fas-vermittelter Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK und p38 .....	99
Abb. 4.38 Anzahl der Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten.....	101
Abb. 4.39 Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in naiven Mäusen .....	102
Abb. 4.40 Überleben und Körpergewicht nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	103
Abb. 4.41 Makroskopische Aufnahmen zur Beurteilung der Anatomie von Mäusen nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	105
Abb. 4.42 Organgewichte während einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	106
Abb. 4.43 Makroskopische Aufnahmen des Darmtraktes von Mäusen nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	107
Abb. 4.44 Anzahl der Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T</i> <i>. gondii</i> .....	108
Abb. 4.45 Granulozyten in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . .....	109
Abb. 4.46 Monozyten in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . 110	
Abb. 4.47 Makrophagen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . .....	111
Abb. 4.48 Dendritische Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T.</i> <i>gondii</i> .....	113
Abb. 4.49 NK-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . 114	
Abb. 4.50 T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . ... 115	
Abb. 4.51 T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	117
Abb. 4.52 B-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .... 118	
Abb. 4.53 Toxoplasmenlast in Gehirn, Leber, Lunge und Milz .....	120
Abb. 4.54 Nachweis von Zytokinen im Serum nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	122
Abb. 4.55 Nachweis der Bildung von NO-Metaboliten (RNI) nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . .....	123
Abb. 4.56 Analyse des Gehirns nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	126
Abb. 4.57 Analyse der Leber nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	127
Abb. 4.58 Analyse der Milz nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	128
Abb. 4.59 Analyse der inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	129
Abb. 4.60 Jak2 Expression in der Milz .....	130

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1.1 Vergleich Apoptose und Nekrose .....	2
Tab. 3.1 Induktion von extrinsischer und intrinsischer Apoptose.....	44
Tab. 3.2 Verwendung der verschiedenen Inhibitoren.....	44
Tab. 4.1 Bildung der verschiedenen Gruppen der Versuchstiere.....	100

---

**Abkürzungsverzeichnis**


---

#	Nummer	DISC	death inducing signalling complex
%	Prozent		
<	Kleiner	DMSO	Dimethylsulfoxid
≤	kleiner oder gleich	DNA	Desoxyribonukleinsäure
≥	größer oder gleich	DR	Todesrezeptor (death receptor)
∞	unendlich		
°C	Grad Celsius	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
×	mal	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Abb.	Abbildung	ELISA	Enzyme Linked
AIF	Apoptosis inducing factor		Immunosorbent Assay
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1	EPO	Erythropoetin
		FACS	fluorescent activating cell sorting
APZ	Antigen präsentierende Zelle	FADD	Fas-associated death domain
AST/ALT	Aspartat-Transaminase/ Alanin-Transaminase	FasL	Fas Ligand
		FCS	Fötale Kälberserum
ATP	Adenosintriphosphat	FLICE	FADD-like interleukin-1β-converting enzyme
Bak	Bcl-2 antagonist killer		
Bax	Bcl-2 associated X protein	FERM	four-point-one, ezrin, radixin, moesin
BCA	Bicinchinic Acid		
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	GBP	Guanylat-bindende Proteine
Bcl-x	B-cell lymphoma-x	GH	growth hormone
Bcl-X <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-extra large	GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne	GTP	Guanosintriphosphat
Bid	BH3-interacting death agonist	h	Stunde
		IAP	inhibitor of apoptosis
BIR	baculoviral IAP repeat	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
BSA	Bovines Serumalbumin	Ig	Immunglobulin
bzw.	beziehungsweise	IFN	Interferon
ca.	circa	IFNGR	Interferon-γ Rezeptor
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne	IL	Interleukin
		IMM	innere Mitochondrien-Membran
CD	Cluster of differentiation		
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein	iNOS	induzierbare Nictric Oxide Synthase
CHX	Cycloheximid	IRF	Interferon-regulierender Faktor
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol	IRG	Immunity related GTPase
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)	Jak	Janus Kinase
		JH	Jak-Homologie-Domäne
DD	Todesdomäne (death domain)	kDa	Kilodalton
		MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)	MEF	Murine embryonale Fibroblasten
Diablo	Direct IAP binding protein with low pl		

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilisation
mRNA	messenger Ribinukleinsäure
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-„kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nuclear localisation signal
OMM	outer mitochondrial membrane
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKC	Proteinkinase C
PRR	Pattern Recognition Receptors
PV	parasitophore Vakuole
RIP	receptor interacting protein
RNI	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
Smac	second mitochondrial activator of caspases
Stat	signal transducer and activator of transcription
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thrombopoetin
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRADD	TNF-receptor associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tyk	Tyrosinkinase
ü.N.	über Nacht
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

---

Ländercodes nach ISO 3166

# 1 Einleitung

Die Wissenschaft der Biologie erforscht das einzigartige Zusammenspiel lebender Organismen in einem komplexen System. Hierbei ist die Kollektivität viel- (z.B. Menschen) und einzelliger (z.B. Bakterien) Organismen für die Aufrechterhaltung vielfältiger Ökosysteme essentiell. Der Organismus des Menschen wird durch das Zusammenspiel und die Mechanismen einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen organisiert (zelluläre Ebene), deren Interaktion überwiegend durch Signalmechanismen auf molekularer Ebene bestimmt wird. Demnach sind zelluläre Prozesse wie die Apoptose und das Immunsystem innerhalb des homöostatischen Gleichgewichtes eng miteinander verknüpft. Dabei sind signalgebende molekulare Bestandteile an unterschiedlichen Prozessen beteiligt und ein Verlust der Bestandteile kann somit zu einem Ungleichgewicht mehrerer biologischer Prozesse (Bsp. Apoptose und Immunsystem) führen. Die koordinierte Weiterleitung von extrazellulären Signalen über intrazelluläre Effektormoleküle im Zytosol wird als Signaltransduktion bezeichnet (Rensing, 1972). So werden z.B. im Zuge der Apoptose membranständige Todesrezeptoren aktiviert (Peter et al., 2007). Dies induziert die Aktivierung von Effektormolekülen (z.B. Caspasen) in einer genauen Abfolge, wodurch eine zelluläre Antwort induziert wird (Peter et al., 2007). Für das Verständnis der Komplexität der verschiedenen übergeordneten Systeme ist mithin die Aufklärung der vielfältigen Funktionen einzelner Effektormoleküle von großer Bedeutung.

Innerhalb dieser Dissertation soll die Funktion der Signal-vermittelnden Janus Kinase 2 (Jak2) während der Apoptose und der Immunantwort gegen den Parasiten *Toxoplasma gondii* untersucht werden. Hierzu werden im Folgenden zunächst die Apoptose, das Immunsystem und schließlich die Janus Kinasen selbst erläuternd beschrieben.

## 1.1 Apoptose

Die als programmierter Zelltod definierte Apoptose wurde 1972 durch Kerr *et al.* nach dem griechischen Wort *apóptosis* für „abfallen“ benannt (Kerr et al., 1972). Seitdem wird Apoptose morphologisch durch verschiedene nacheinander ablaufende Änderungen der betroffenen Zellen, die gezielt induziert werden, charakterisiert (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Die frühe Phase der Apoptose beschreibt das „Schrumpfen“ der Zellen (Elmore, 2007). Die Zellen verkleinern sich und das Zytosol sowie die darin enthaltenen Organellen erscheinen dichter gepackt (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Ebenfalls entsteht während der frühen Phase eine Karyopyknose, die durch die Verkleinerung des Nukleus und die Kondensierung des Chromatins charakterisiert wird (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Eine zweite Phase der Apoptose wird durch das Membran-„blebbing“, die Karyorrhexis (Fragmentierung des Chromatins) und die Ausbildung der typischen „apoptotic-bodies“ gekennzeichnet (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Innerhalb der apoptotic-bodies befinden sich dicht gepackte, aber dennoch intakte Organellen, Zytosol und oftmals nukleäre Fragmente, die durch eine intakte Schicht der Plasmamembran umschlossen sind (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Schließlich werden in einem dritten und letzten Schritt die apoptotic-bodies von Makrophagen oder auch Parenchymzellen phagozytiert und innerhalb der gebildeten Phagolysosomen entfernt (Kerr et al., 1972; Savill and Fadok, 2000). Damit grenzen sich die morphologischen Veränderungen und Charakteristika der Apoptose klar von denen der Nekrose ab (Tab. 1.1).

**Tab. 1.1 Vergleich Apoptose und Nekrose.** Erstellt nach (Elmore, 2007)

<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
Einzelne Zellen	Areale von Zellen (Gewebe)
Zellschrumpfung	Zellschwellung
Karyopyknose, Karyorrhexis	Karyolyse, Karyopyknose, Karyorrhexis
Intakte Zellmembran und Organellen	Schädigung der Zellmembran und Organellen
Zytosol in apoptotic-bodies	Zytosolfreisetzung
Keine Inflammation	Inflammation

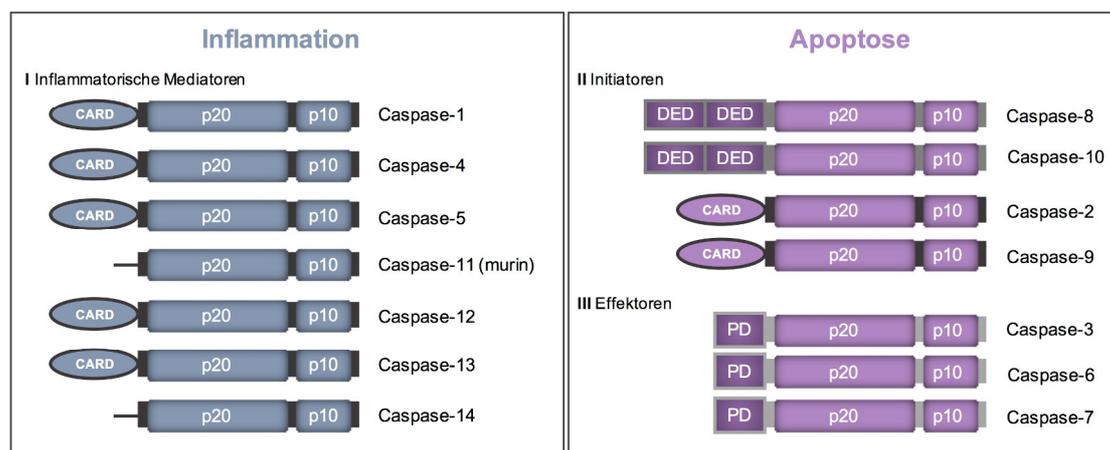
Nekrose entsteht als passiver Prozess durch den Abbruch des Energiestoffwechsels der Zellen oder Schädigungen der Zellmembran und kann im Gegensatz zur Apoptose eine große Anzahl der Zellen eines Gewebes betreffen (Majno and Joris, 1995). Für Nekrose charakteristische morphologische Änderungen sind das Anschwellen von Zellen, die Schädigung der Zellmembran und der Zellorganellen sowie die Lyse der Kernmembran (Kerr et al., 1972; Majno and Joris, 1995; Trump et al., 1997). Dagegen sind Karyopyknose und Karyorrhexis Charakteristika von Apoptose und der Nekrose (Elmore, 2007). Jedoch wird im Zuge einer Nekrose durch die Freisetzung des Zytosols und der zytosolischen Bestandteile eine inflammatorische Antwort induziert, die während einer Apoptose durch die Bildung der apoptotic-bodies und die sofortige Phagozytose verhindert wird (Savill and Fadok, 2000) (Kurosaka et al., 2003).

Durch diese besonderen Eigenschaften nimmt die Apoptose eine wichtige Funktion während verschiedener Vorgänge in vielzelligen Organismen (Metazoa) ein (Strasser et al., 2011). Während der Entwicklung (Bsp. Embryogenese) werden unter anderem überflüssige Zellen durch Apoptose entfernt, um spezifisches Gewebe wie die Extremitäten auszuformen (Sanders and Wride, 1995). In adulten Organismen antagonisiert Apoptose die Zellproliferation von sich schnell erneuerndem Gewebe (z.B. Darmepithel), um die Homöostase aufrechtzuerhalten (Strasser et al., 2011). Zudem ist Apoptose essentiell für die Eliminierung auto-reaktiver Immunzellen und infizierter Wirtszellen nach dem Eindringen eines intrazellulären Pathogens (Strasser et al., 2000; Trambas and Griffiths, 2003). Sind Signalmechanismen der Apoptose fehlreguliert, können im Zuge einer Inhibition maligne Zellen oder im Falle einer Überreaktion neurodegenerative Krankheiten entstehen (Elmore, 2007).

### 1.1.1 Die Signalwege der Apoptose

In Vertebraten existieren zwei verschiedene Signalmechanismen, um Apoptose einzuleiten (Strasser et al., 1995). Durch die Aktivierung eines membrangebundenen sogenannten Todesrezeptors wird der extrinsische Signalweg eingeleitet. Die Ausbildung des „Todes-induzierenden Komplexes“ („death inducing complex“, DISC) durch die Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle führt so zur Aktivierung Apoptose-einleitender Signalmoleküle. Neben der extrinsischen Apoptose induzieren DNA-Schäden oder Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) intrinsische Apoptose unabhängig von Todesrezeptoren, durch eine direkte Permeabilisierung der Mitochondrien. Sowohl extrinsische als auch intrinsische Apoptose sind von der Aktivierung der Cystein-abhängigen und Asparaginsäure-spezifischen Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden, abhängig (Alnemri et al., 1996). Gegenwärtig sind fünfzehn verschiedene Mitglieder der Familie der Caspasen bekannt, die anhand ihrer Prodomänen und

Funktionen unterschieden werden (Abb. 1.1) (Alnemri et al., 1996; Deveraux and Reed, 1999). So werden zunächst zwei große Unterfamilien differenziert: ICE (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme) und die CED-3 (cell death protein 3)-ähnlichen Familienmitglieder (Chowdhury et al., 2008). Die diesbezüglich namensgebende ICE/Caspase-1 wurde als erste Caspase identifiziert und als an der Aktivierung von IL-1 $\beta$  beteiligte Protease beschrieben (Black et al., 1989; Cerretti et al., 1992; Kostura et al., 1989; Thornberry et al., 1992). Bis heute sind sechs weitere Mitglieder der ICE-Unterfamilie bekannt, die bedeutende Funktionen während der Reifung von Zytokinen einnehmen und daher für die Ausbildung inflammatorischer Immunantworten essentiell sind (Deveraux et al., 1998). So zählen neben der Caspase-1, die Caspase-4 (human), -5 (human), -11 (murin), -12 (murin), -13 (human) und -14 zu den Gruppe 1 Caspasen; den inflammatorischen Mediatoren (Chowdhury et al., 2008; Deveraux et al., 1998). Durch die Entdeckung des *CED-3* Genes des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), welches in der Entwicklung von *C. elegans* eine wichtige Funktion einnimmt, um gezielt überflüssige Zellen zu eliminieren, konnte schließlich die Unterfamilie der Zelltod-fördernden Caspasen identifiziert werden (Yuan and Horvitz, 1992; Yuan et al., 1993). So wurde 1995 durch Nicholson et. al und Tewari et. al die Caspase-3 als erste Apoptose einleitende Caspase der *Mammalia* beschrieben (Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995). Durch die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Apoptose induzierender Caspasen konnte die Unterfamilie in zwei Gruppen unterteilt werden. Die als Initiator-Caspasen bezeichnete Gruppe II umfasst Caspasen, die sowohl zwei aufeinander folgende Todes-Effektor-Domänen besitzen (DED: death effector domains), wie die Caspase-8 und -10, als auch eine Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD: caspase-recruitment-domain), wie die Caspase-2 oder-9 (Chowdhury et al., 2008). Die dritte Gruppe der Caspasen umfasst die Effektor-Caspasen, die eine kurze Prodomäne besitzen und von den Caspasen 3, 6 und 7 gebildet wird (Chowdhury et al., 2008).



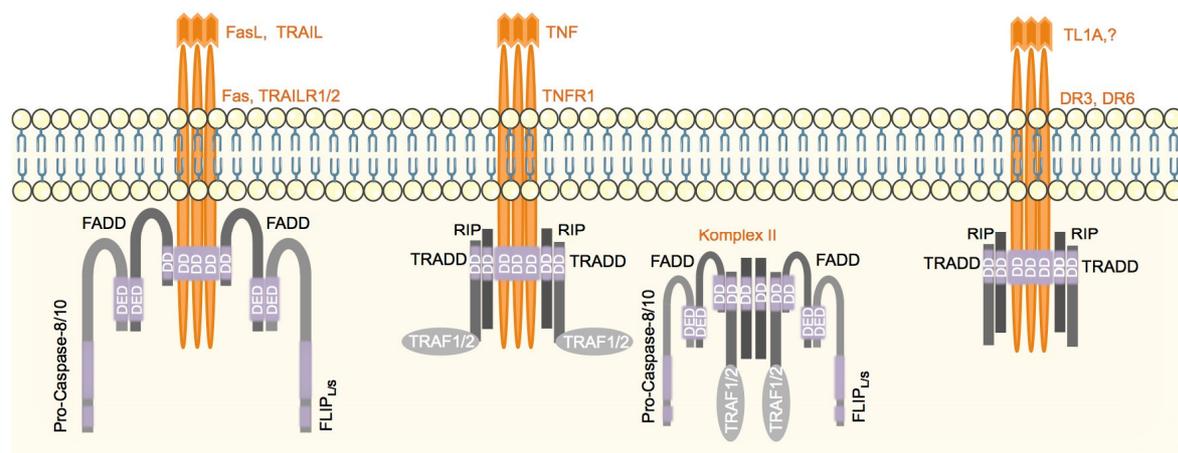
**Abb. 1.1 Klassifizierung der Familie der Caspasen.** Unterteilung der Caspasen in zwei Hauptklassen; an der Inflammation beteiligte Caspasen (links) und an der Apoptose beteiligte Caspasen (rechts). Todes-induzierende Caspasen werden in zwei weitere Gruppen unterteilt: die Apoptose-einleitenden Initiator-Caspasen und die ausführenden Effektor-Caspasen. Alle Caspasen bestehen aus einer kleinen Untereinheit (p10) und einer großen Untereinheit (p20) sowie einer jeweils unterschiedlich ausgebildeten Prodomäne: CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) DED (Death-effector-domain: Todes-Effektor-Domäne) oder einer sehr kurzen Sequenz (PD: Prodomäne), die wiederum für die Bindung der spezifischen Interaktionspartner essentiell ist. Dargestellt nach (Chowdhury et al., 2008).

Die Aktivierung der Caspasen entsteht durch die Spaltung an zwei spezifischen Aspartat-Resten, wodurch die Prodomäne abgespalten wird (Ausnahme: Gruppe II) und die p10

von der p20 Untereinheit getrennt wird. Durch die Assemblierung einer weiteren homologen Caspase wird ein Tetramer gebildet, bestehend aus zwei p10 Untereinheiten im Zentrum und zwei äußeren p20 Untereinheiten (Chowdhury et al., 2008). Während die für Initiator-Caspasen beschriebene Substratspezifität auf die Effektor-Caspasen und eine auto-katalytische Reaktivität beschränkt ist, sind für die Effektor-Caspasen mittlerweile hunderte Substrate identifiziert worden (Nunez et al., 1998). Neben zytosolischen Proteinen (z.B. Aktin) sowie nukleären Proteinen (z.B. Lamin-A) werden unter anderem DNA-reparierende Faktoren (z.B. PARP) oder auch Proteinkinasen (z.B. ERK) gespalten (Earnshaw et al., 1999; Fischer et al., 2003). Folglich führt die Spaltung der spezifischen Substrate durch die Caspasen zu den Apoptose-typischen Änderungen der einzelnen Zelle, wie Karyopyknose und der Bildung von apoptotic-bodies (Chowdhury et al., 2008). Die sofortige Phagozytose der apoptotic-bodies durch Makrophagen um eine Entzündungsreaktion zu vermeiden, wird durch die gleichzeitige Produktion und Sekretion relevanter Zytokine („find me“ und „eat me“) bereits während der frühen Phase der Apoptose eingeleitet (Ravichandran, 2011).

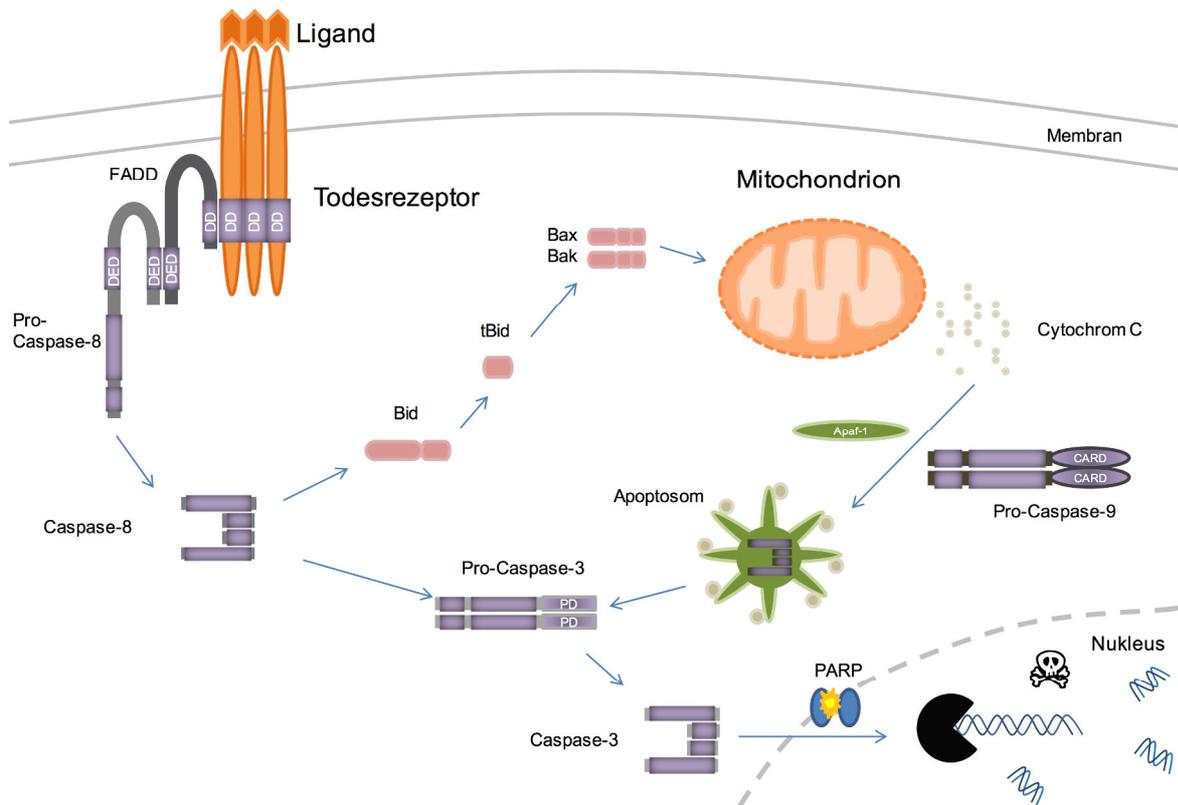
### 1.1.1.1 Der extrinsische Signalmechanismus der Apoptose

Durch die Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Todesrezeptor wird der extrinsische Signalweg der Apoptose eingeleitet (Peter and Kramer, 2003; Scaffidi et al., 1998). Die Todesrezeptoren (DR: death receptor) und deren Liganden gehören zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) bzw. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie (Bhardwaj and Aggarwal, 2003). Bis heute sind acht verschiedene Todesrezeptoren bekannt: TNFR1 (auch DR1, CD120a, p55 und p60), Fas (auch DR2, CD95 und APO-1), DR3 (TRAMP, LARD, APO-3 und WSL1), DR4 (auch TRAILR1 und APO-2), DR5 (auch TRAILR2, KILLER und TRICK2), DR6, Ektodysplasie A Rezeptor (EDAR) und NGFR (nerve growth factor receptor) (Lavrik et al., 2005; Wajant, 2003).



**Abb. 1.2 Todesrezeptoren und ihre Liganden.** Fas und TRAILR1/2 bilden einen Todes-induzierenden Komplex (DISC: „death inducing complex“) aus rekrutiertem FADD (Fas associated death domain), den Pro-Caspase-8/10 und anti-apoptotischem FLIP (FLICE inhibitory protein). Eine zweite Gruppe um TNFR1, DR3 und DR6 bilden einen anti-apoptotischen Komplex aus RIP (receptor interacting protein), TRADD (TNFR1 associated death domain) und ggf. TRAF1/2 (TNFR associated factor), sowie einen Todes-induzierenden Komplex II aus RIP, TRADD, TRAF1/2, FADD, Pro-Caspase-8/10 und FLIP. Die Bindungen der Adaptermoleküle erfolgen entweder über DDs (DD: death domain) oder DEDs (DED: death effector domains). Dargestellt nach (Lavrik et al., 2005) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank ([www.servier.com](http://www.servier.com)).

Eine Aktivierung der Todesrezeptoren führt zu einer Assemblierung verschiedener Adaptermoleküle und Faktoren zu zytoplasmatischen Signalkomplexen weshalb Todesrezeptoren in zwei Gruppen unterteilt werden (Lavrik et al., 2005). Die erste Gruppe umfasst Fas, DR4 und DR5, die nach Liganden-Bindung, Rezeptor-Trimerisierung und Bildung des Todes-induzierenden Komplexes (DISC: death inducing complex) Apoptose-einleitende Signale innerhalb der Zelle weiterleiten (Abb. 1.2) (Kischkel et al., 1995; Locksley et al., 2001; Nagata, 1997; Peter and Krammer, 2003; Ware, 2003). Über homotypische Kontakte der Todesdomänen (DD: death domain) bindet das Adaptermolekül FADD (Fas associated death domain) an Fas, DR4 oder DR5 (Lavrik and Krammer, 2012). Nach homotypischen Bindungen über die Todes-Effektor-Domänen (DED: death effector domains) der zwei Isoformen der Pro-Caspase-8, (Caspase-8a und Caspase-8b), die sich lediglich durch ihre Größe unterscheiden (50kDa vs. 55kDa), oder der Pro-Caspase-10 an FADD wird die Initiator-Caspase-8 oder Caspase-10 aufgrund erhöhter Moleküldichten durch autoproteolytische Spaltungen aktiviert (Lavrik et al., 2005; Medema et al., 1997; Scaffidi et al., 1997). Das entstandene Heterotetramer der Initiator-Caspase wird schließlich in das Zytosol der Zelle entlassen (Boatright et al., 2003). Durch eine Aktivierung nachfolgender unterschiedlicher Effektormoleküle wurden zwei Zelltypen unterschieden. In Typ I Zellen, wie z.B. Thymozyten, werden hohe Level an DISC gebildet und daraus resultierend große Mengen an aktiver Caspase-8 induziert (Lavrik and Krammer, 2012). Die aktivierte Caspase-8 führt wiederum zu der Spaltung und Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie der Caspase-3, die schließlich spezifische Substrate, wie das DNA-reparierende Enzym PARP (Poly-(ADP-ribose)-Polymerase), spalten und apoptotische Charakteristika, wie DNA Fragmentierung, induzieren (Earnshaw, 1999; Lavrik and Krammer, 2012). Demgegenüber wird in Typ II Zellen, wie z.B. Hepatozyten, eine deutlich geringere Menge an DISC gebildet und folglich weniger Caspase-8 aktiviert (Lavrik and Krammer, 2012; Yin et al., 1999). Aufgrund dessen benötigen Typ II Zellen einen Amplifikations-Loop, indem Bid (BH3 interacting-domain death agonist) mittels Caspase-8 in eine trunkierte und aktive Form tBid (15kDa) gespalten wird (Lavrik et al., 2005). Nach der Oligomerisierung von tBid mit den ebenfalls der Bcl-2-Familie angehörigen Bax (Bcl-2 associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) in die äußere Mitochondrien-Membran (OMM: outer mitochondrial membrane), wird diese durch die Porenbildung permeabilisiert (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilisation) (Li et al., 1998; Youle and Strasser, 2008). Daraus und nach Depolarisierung der inneren Mitochondrien-Membran wird Cytochrom C aus den Mitochondrien entlassen (Korsmeyer et al., 2000). Das zytosolische Cytochrom C bildet mit dem „scaffold“-Protein Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) und der Pro-Caspase-9 das Apoptosom, worauf die Caspase-9 nachfolgend durch proteolytische Spaltung aktiviert wird (Lavrik et al., 2005). Die aktive Caspase-9 induziert schließlich die Effektor-Caspasen (Chowdhury et al., 2008; Lavrik et al., 2005). Zusätzlich ist für Typ II Zellen charakteristisch, dass durch eine Überexpression der anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie die Inhibierung der induzierten Apoptose möglich ist (Lavrik et al., 2005).

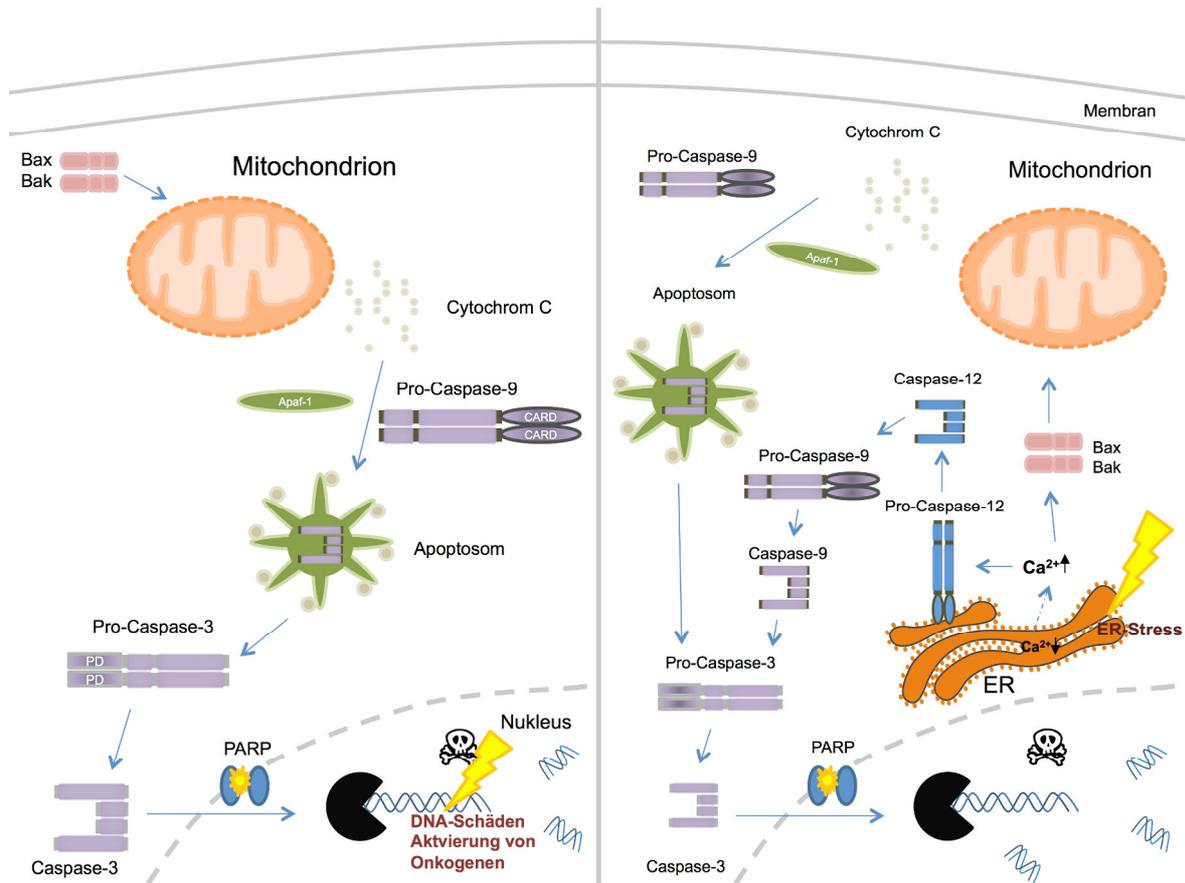


**Abb. 1.3 Die Todesrezeptor induzierte Apoptose.** Nach Bindung des Liganden an den Todesrezeptor, wird die Caspase-8 über den DISC (death-inducing-complex) aktiviert und induziert aktive Caspase-3 (Typ I) oder tBid (Typ II). Darauf aktiviert tBid die Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak und die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, was zu der Ausschüttung von Cytochrom C führt. Nach der Bildung des Apoptosoms durch Apaf-1, Cytochrom C und Caspase-9 wird Caspase-3 aktiviert. Aktive Caspase-3 spaltet DNA-reparierende Enzyme wie PARP (Poly-(ADP-ribose)-Polymerase) und Karyorrhexis entsteht.

TNFR, DR3, DR6 und EDAR induzieren Apoptose zum Teil über andere Signalmechanismen und grenzen sich daher von der Fas-induzierten Apoptose ab (Lavrik et al., 2005). Daher bilden TNFR, DR3, DR6 und EDAR eine zweite Gruppe der Todesrezeptoren (Lavrik et al., 2005). Demnach entstehen nach Aktivierung des TNFR zwei verschiedene Komplexe, die unterschiedliche Signalmechanismen einleiten (Micheau and Tschopp, 2003). Der an der Membran entstandene Komplex I umfasst über homotypische DD-Bindungen gebundene Adaptermoleküle in folgender Reihenfolge: RIP-1 (receptor-interacting-protein-1), TRADD (TNFR-associated death-domain protein) und TRAF-1/2 (TNFR-associated-Factor) (Lavrik et al., 2005). Anschließend wird durch den Komplex I eine starke anti-apoptotische Antwort durch die IKK-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder eine pro-apoptotische Antwort über einen ASK-1 beteiligten Komplex und die Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase JNK (c-Jun-N-terminale-Kinase) induziert (Lavrik et al., 2005). Der alternativ gebildete Komplex II entsteht nach der zytoplasmatischen Translokation des Komplex I und der zusätzlichen Bindung von FADD und Pro-Caspase-8 oder 10 an TRADD (Micheau and Tschopp, 2003). Der auch als TRADDosom bezeichnete Komplex II leitet schließlich die Aktivierung der Initiator-Caspasen und die darauf folgende apoptotische Signalweiterleitung (siehe Fas-induzierter Signalweg) ein (Lavrik et al., 2005; Micheau and Tschopp, 2003).

### 1.1.1.2 Der intrinsische Signalmechanismus der Apoptose

Neben dem extrinsischen Signalweg wird Apoptose ebenfalls über den intrinsischen Mechanismus der Apoptose signalisiert, der durch Schäden der DNA, einen Mangel an Zytokinen, Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder der Aktivierung von Onkogenen eingeleitet wird (Happo et al., 2012). Obgleich alle Induktoren dieselben Effektor-Caspasen induzieren, tragen unterschiedliche Initiator-Caspasen zur apoptotischen Signalweiterleitung bei und demonstrieren so die Unabhängigkeit der einzelnen Signalwege (Strasser et al., 1995). Durch irreversible Schäden der DNA wird unter anderem das Protein p53 akkumuliert und induziert als Transkriptionsfaktor die Expression des pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes Bax (Miyashita et al., 1994). Die intrinsische Apoptose wird durch weitere pro- und anti-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2 Familie reguliert (Ow et al., 2008). So transloziert Bax nach Aktivierung an die mitochondriale Membran, integriert zu dem residenten Familienmitglied Bak in die äußere Mitochondrien-Membran (OMM: outer-mitochondrial-membrane). Beide öffnen die OMM durch anschließende Konformationsänderungen (Abb. 1.3, links) (Youle and Strasser, 2008). Das zuvor aufgrund von Cristae Modellierungen umverteilte Cytochrom C ist unter normalen metabolischen Bedingungen in der inneren mitochondrialen Membran (IMM: inner-mitochondrial-membrane) verankert und trägt zur ATP-Synthese bei, um das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) aufrecht zu erhalten (Ow et al., 2008; Scorrano et al., 2002). Durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien Membran (MOMP) verlässt Cytochrom C das Mitochondrium (Ow et al., 2008; Scorrano et al., 2002). Für die Freisetzung von Cytochrom C nehmen zudem mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (mROS) eine wichtige Funktion ein (Zamzami et al., 1995). mROS, die als geringe Nebenprodukte während der ATP-Synthese entstehen, werden bei Defekten innerhalb des Metabolismus oder im Verlauf der Apoptose angehäuft (Galluzzi et al., 2012). Die massiv gebildeten mROS oxidieren darauf mitochondriale Poren in der OMM und tragen so zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol bei (Zamzami et al., 1995). Das zytosolische Cytochrom C bindet an Monomere von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), wodurch Apaf-1 die Konformation ändert und heptamerisiert (Riedl and Salvesen, 2007). Das gebildete Apoptosom trägt innenliegende CARD Domänen die durch homotypische Wechselwirkungen die Initiator Pro-Caspase-9 binden und durch proteolytische Spaltungen aktivieren (Riedl and Salvesen, 2007). Schließlich induziert Caspase-9 die Spaltung und Aktivierung von Effektor-Caspasen (Li et al., 1997).



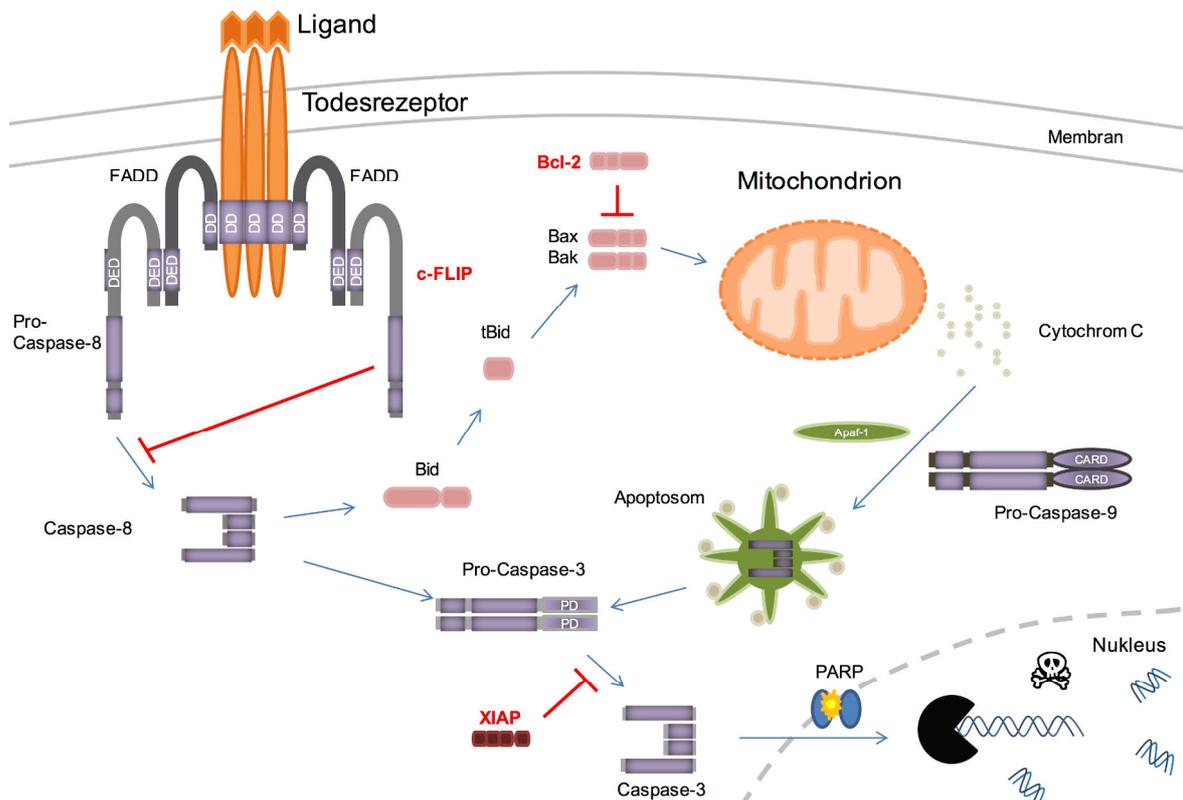
**Abb. 1.4 Die intrinsisch induzierte Apoptose.** Linke Seite: Intrinsische Apoptose induziert durch DNA-Schäden oder Aktivierung von Onkogenen. Aktiviertes Bax und Bak induzieren die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran (OMM) und die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol. Nach Bildung des Apoptosoms durch Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase-9 induziert Caspase-9 die Effektor-Caspase-3 und die Spaltung von PARP. Rechte Seite: Durch Stress des ER steigt der zytosolische  $Ca^{2+}$ -Spiegel, was sowohl Bax und Bak als auch daraus folgend die Bildung des Apoptosoms induziert. Die alternative Aktivierung der ER-residenten Caspase-12 führt zu der Aktivierung der Caspase-9, die Effektorcaspase-3 spaltet und PARP inaktiviert.

Intrinsische Apoptose ist ebenfalls durch Stress des ER induzierbar (Abb. 1.3, rechts). Durch die Blockade von  $Ca^{2+}$ -Pumpen sinkt der  $Ca^{2+}$ -Spiegel innerhalb des ER wobei die Konzentration von  $Ca^{2+}$  im Zytosol steigt (Breckenridge et al., 2003). Hohe  $Ca^{2+}$  Konzentrationen innerhalb des Zytosols tragen zur Aktivierung von Bax und Bak und der darauf folgenden Permeabilisierung der OMM, der Entlassung von Cytochrom C und der Bildung des Apoptosoms bei (Boya et al., 2002; Hacki et al., 2000). Neben der Aktivierung von Bax/Bak führen hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen zudem zur proteolytischen Spaltung der ER-assoziierten Pro-Caspase-12 (Nakagawa and Yuan, 2000; Nakagawa et al., 2000). Die aktive Caspase-12 induziert schließlich eine Kaskade, innerhalb welcher Caspase-9 und Effektor-Caspasen aktiviert und PARP inaktiviert werden (Morishima et al., 2002; Rao et al., 2002).

### 1.1.2 Regulatoren der Apoptose

Die extrinsische und die intrinsische Apoptose werden durch verschiedene anti- und pro-apoptotische Faktoren streng reguliert. Hier wirken anti-apoptotische Proteine innerhalb unterschiedlicher Ebenen auf die pro-apoptotische Signalkaskade ein (Abb. 1.4). C-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein) inhibiert die Spaltung und Aktivierung der Caspase-8,

wohingegen Bcl-2 über die Blockade von Bax und Bak in den mitochondrialen Signalweg eingreift und die Permeabilisierung der Mitochondrien verhindert (Irmeler et al., 1997; Vaux et al., 1988). Im Weiteren sind die Mitglieder der IAP (Inhibitor of apoptosis proteins) Familie, wie z.B. XIAP (X-linked IAP), für die Inhibierung der Effektor-Caspasen-Induktion verantwortlich (Deveraux et al., 1997).



**Abb. 1.5 Der programmierte Zelltod wird durch anti-apoptotische Faktoren reguliert.** Verschiedene anti-apoptotische Faktoren regulieren den pro-apoptotischen Signalweg. C-FLIP blockiert die Aktivierung der Caspase-8. Bcl-2 inhibiert Bax und Bak und verhindert sowohl die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran als auch die Apoptosom-Bildung. XIAP, ein Mitglied der IAP-Familie, hemmt die Induktion der Effektor-Caspase-3.

Die regulatorischen Funktionen von c-FLIP, der Mitglieder der Bcl-2 Familie, der IAP-Familie, der Fusions- und Fissionsmaschinerie der Mitochondrien und der Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK) sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

### 1.1.2.1 c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ converting enzyme)-like inhibitory protein)

C-FLIP wurde zuerst 1997 durch Irmeler *et. al* als starker Inhibitor der Aktivierung der Caspase-8 beschrieben (Irmeler et al., 1997). Nach der Rekrutierung von FADD an die aktivierten Todesrezeptoren Fas, DR4 oder DR5, induziert FADD neben der Rekrutierung der Pro-Caspase 8 oder 10 die Rekrutierung von c-FLIP (Kantari and Walczak, 2011). c-FLIP verfügt ebenfalls über DED Domänen, die an die DED Domänen von FADD binden (Lavrik and Krammer, 2012). Bis heute sind drei humane Isoformen für c-FLIP beschrieben (Lavrik and Krammer, 2012; Scaffidi et al., 1999). Eine „lange“ Form c-FLIP<sub>L</sub>

(c-FLIP-Long), die neben DED Domänen ebenfalls eine Caspase-ähnliche p20 sowie eine p12 Untereinheit besitzt, sowie zwei „kurze“ Formen c-FLIP<sub>S</sub> (c-FLIP-Short) bzw. c-FLIP<sub>R</sub> (c-FLIP-Raji) (Golks et al., 2005; Irmeler et al., 1997; Scaffidi et al., 1999). Anders als humane Zellen besitzen murine Zellen ausschließlich die zwei Isoformen c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>R</sub> (Ueffing et al., 2008). Die kurzen Isoformen c-FLIP<sub>S</sub> und c-FLIP<sub>R</sub> blockieren die Caspase-8 und werden dementsprechend als anti-apoptotisch wirkende Faktoren charakterisiert (Golks et al., 2005; Krueger et al., 2001; Scaffidi et al., 1999). Für c-FLIP<sub>L</sub> ist dagegen sowohl eine anti-apoptotische als auch eine pro-apoptotische Funktion beschrieben (Lavrik and Kramer, 2012; Ozturk et al., 2012). Eine starke Stimulation des Todesrezeptors oder hohe Konzentrationen der kurzen Isoformen von c-FLIP induzieren die pro-apoptotische Antwort, genauer die Aktivierung der Caspase-8 durch c-FLIP<sub>L</sub> (Chang et al., 2002; Lavrik and Kramer, 2012; Micheau et al., 2002). Demgegenüber führen hohe Konzentrationen von c-FLIP<sub>L</sub> zu der Besetzung der freien Bindestellen der DED-Domänen des DISC-Komplexes, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase-8 verhindert wird (Lavrik and Kramer, 2012; Ozturk et al., 2012). Durch die Blockade des DISC-Komplexes werden jedoch ebenso anti-apoptotische Mechanismen blockiert (Lavrik and Kramer, 2012). Nach Stimulation des Todesrezeptors und Caspase-8 Aktivierung prozessiert Caspase-8 ebenfalls durch die Abspaltung der p12 Untereinheit von c-FLIP<sub>L</sub>, das Spaltprodukt p43-FLIP (Neumann et al., 2010). Das anti-apoptotisch wirkende p43-FLIP interagiert mit Faktoren der TNFR-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, wie TRAF1, TRAF2 oder RIP, oder aktiviert direkt den IKK-Komplex, um NF- $\kappa$ B zu induzieren (Kataoka et al., 2000; Kataoka and Tschopp, 2004). Durch die Aktivierung und die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus wird anschließend die Transkription anti-apoptotisch relevanter Zielgene eingeleitet (Lavrik and Kramer, 2012; Neumann et al., 2010).

### 1.1.2.2 Die Familie der Bcl-2 Proteine

Die Familie der Bcl-2 Proteine umfasst sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Regulatoren des programmierten Zelltodes, die hauptsächlich mit dem Mitochondrium assoziiert sind (Garcia-Saez, 2012). Die Mitglieder werden anhand der Anzahl von konservierten Bcl-2 Homologie-Domänen (BH) charakterisiert und in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (Chipuk and Green, 2008; Strasser et al., 2011). Die erste Gruppe umfasst die anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> (Bcl-2 related gene, long isoform), BCL-w, MCL-1 (Myeloid cell leukemia 1) und A1, die vier BH Domänen besitzen (Happo et al., 2012). Eine zweite Gruppe bestehend aus Bax (Bcl-2 associated X protein), Bak (Bcl-2 antagonist killer 1) und Bok (Bcl-2 related ovarian killer) ist diesen in Struktur und Sequenz sehr ähnlich, führt jedoch pro-apoptotische Funktionen aus (Happo et al., 2012; Strasser et al., 2011). Die dritte und letzte Gruppe der Bcl-2-Familie wird von den „BH3-only“ Proteinen gebildet, die lediglich aus einer BH3 Domäne bestehen (Moldoveanu et al., 2014; Strasser et al., 2011). Hierzu zählen die pro-apoptotische Faktoren Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Noxa, Bid (Bcl-2 interacting domain death agonist), Bmf (Bcl-2 modifying factor), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death), Bik (Bcl-2 interacting killer) und Hrk (Harakiri) (Moldoveanu et al., 2014). Das Zusammenspiel aller Mitglieder der Bcl- Familie entscheidet über die Einleitung der Apoptose (Chipuk and Green, 2008; Strasser et al., 2011). So aktivieren Bid, Puma sowie Bim, induziert durch Caspase-8, p53 bzw. JNK, die Poren- und MOMP-bildenden Faktoren Bax und Bak (Lei and Davis, 2003; Li et al., 1998;

Luo et al., 1998; Nakano and Vousden, 2001; Putcha et al., 2003; Yu et al., 2001). Gleichzeitig inhibieren Bid, Puma und Bim die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-Familie. Dagegen blockiert Noxa nur Mcl-1 und A1 und Bad inhibiert ausschließlich Bik. Die Induktion von Bmf sorgt für eine Blockade von Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> sowie Bcl-w. Durch die Inhibition wird die schützende Funktion der anti-apoptotischen Faktoren aufgehoben, da Bcl-2 sowie Bcl-w hauptsächlich Bax und Mcl-1, A1 und Bcl-X<sub>L</sub> Bax sowie Bak blockieren (Moldoveanu et al., 2014; Strasser et al., 2011). Die beschriebene Aktivierung von Bax und Bak ist durch zwei verschiedene Mechanismen beschrieben, die jedoch simultan in apoptotischen Zellen auftreten können: das „direkte“ und das „indirekte“ Modell (Chipuk and Green, 2008). Das direkte Modell beschreibt tBid, Puma und Bim als hauptsächliche Aktivatoren von Bax und Bak während die übrigen BH3-only Proteine durch die Inhibition der anti-apoptotischen Moleküle als sensitivierende Faktoren dienen (Strasser et al., 2011). Dagegen beschreibt das indirekte Modell die Aktivierung von Bax und Bak durch die ausschließliche Inhibition der anti-apoptotischen Mitglieder und anschließende Autoaktivierung von Bax und Bak, die darauf folgend als Effektoren den mitochondrialen Weg der Apoptose induzieren (Willis et al., 2007).

### 1.1.2.3 Die Familie der IAP (inhibitor of apoptosis proteins)

Neben der Bcl-2-Familie wurde eine zweite Familie von Proteinen identifiziert, die essentielle regulatorische Funktionen im Verlauf des apoptotischen Signalweges übernehmen (Kocab and Duckett, 2015). Die Familie der IAP umfasst acht Mitglieder (*Mammalia*), XIAP (x-linked IAP), c-IAP1/2 (cellular IAP-1/2), hILP-2 (human IAP like protein), ML-IAP (melanoma-IAP), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), Survivin und Apollo (Kocab and Duckett, 2015). Alle Mitglieder besitzen mindestens eine Familiencharakterisierende homologe Baculovirus IAP Repeat (BIR)-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen zwischen IAPs und anderen Faktoren relevant ist (Deveraux et al., 1998). So regulieren die Mitglieder der IAP Familie die Apoptose durch die Inhibition von Caspasen (Kocab and Duckett, 2015). Das Mitglied XIAP bindet direkt über seine BIR-Domänen an die Caspase-3, -7 oder -9 und blockiert so die pro-apoptotische Signalweiterleitung und den programmierten Zelltod (Deveraux et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Die genauen Funktionen von c-IAP werden in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert. Während erste Studien über c-IAP 1 und c-IAP 2 eine Effektor-Caspasen-bindende und inhibierende Funktion beschreiben, identifizierten aktuelle Studien, dass c-IAPs nach TNFR-Induktion an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind (Eckelman and Salvesen, 2006; Roy et al., 1997; Vince et al., 2009). Hier tragen c-IAP1 und 2 über die Assoziation an TRAF2 und die RING und UBA (ubiquitin-associated domain) zu der Ubiquitinierung und dem Abbau des NF- $\kappa$ B-inhibierenden IKK-Komplexes bei (Kocab and Duckett, 2015). Jedoch werden im Zuge des mitochondrialen Signalweges der Apoptose die anti-apoptotischen Funktionen von XIAP und c-IAP durch Einleitung von MOMP blockiert (Kocab and Duckett, 2015). Durch MOMP werden neben Cytochrom C weitere mitochondriale Faktoren, wie Smac und Omi/HtrA2, in das Zytosol entlassen (Kocab and Duckett, 2015). Daraufhin bindet Smac c-IAP1 und 2, fördert deren Abbau durch Auto-Ubiquitinierung und Omi/HtrA2 bindet über IAP-bindende Motive XIAP, woraufhin frei werdende Caspasen aktiviert werden (Kocab and Duckett, 2015; Tait and Green, 2010).

#### **1.1.2.4 Die Fusions- und Fissionsmaschinerie der Mitochondrien**

Neben der Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran und der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran (MOMP) werden Mitochondrien im Verlauf der Apoptose fragmentiert (Scorrano, 2013). Folglich gelten Mitochondrien als Schlüssel-Regulatoren der Apoptose und besitzen zudem essentielle Funktionen im zellulären Metabolismus und der Redox- sowie Kalzium-Homöostase (Kasahara and Scorrano, 2014). Für die Funktionalität der Mitochondrien sind die dynamischen Prozesse der Fission- und Fusionsmaschinerie, d.h. das ständige Teilen und Fusionieren, von großer Bedeutung (Kasahara and Scorrano, 2014; Scorrano, 2013). Die „Doppel-Membran-Architektur“ der Mitochondrien wird durch die Mitochondrien-assoziierten Proteine geformt (Kasahara and Scorrano, 2014). In der äußeren Mitochondrien-Membran sind die GTPasen Mitofusine 1 und 2 (MFN 1 und 2) verankert, die nach Konformationsänderungen der gebildeten Hetero- oder Homodimere durch die Hydrolyse von GTP die Fusion der OMM induzieren (Chen et al., 2003). Durch eine JNK-abhängige Phosphorylierung der MFN werden diese aufgrund einer anschließenden Markierung durch Ubiquitin degradiert (Leboucher et al., 2012). Für die Fusion der IMM ist das Protein Optic atrophy 1 (OPA-1) essentiell, was z.B. durch OMA-1 reguliert wird (Cipolat et al., 2004; Head et al., 2009). Durch die Inhibition der Fusions-beteiligten Faktoren MFN und OPA-1 sowie die Aktivierung Fissions-beteiligter Proteine wird die Teilung der Mitochondrien eingeleitet (Kasahara and Scorrano, 2014). Hierfür ist die Phosphorylierung von DRP1 (dynamamin-related-protein1) durch zytosolisch angehäuften Calcineurin entscheidend, indem die Translokation von DRP1 an die OMM und Fission induziert wird (Kasahara and Scorrano, 2014). Zudem ist DRP1 an der Bindung von Bax an die OMM beteiligt, dieser inhibiert MFN und kann durch eine Phosphorylierung der Proteinkinase A gehemmt werden (PKA) (Sheridan et al., 2008; Sheridan and Martin, 2010). Daher ist die Fission der Mitochondrien in Folge der Fragmentierung bedeutend für die Initiation von Apoptose, wohingegen durch die Fusion induzierte Elongation einen Austausch der mitochondrialen Inhalte ermöglicht, defekte Mitochondrien erneuert und somit Zellen schützt (Chan, 2006; Sheridan and Martin, 2010).

#### **1.1.2.5 Die Mitogen-aktvierten Proteinkinasen (MAPK)**

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind evolutionär konservierte Enzyme, die als Komponenten vieler Signalmechanismen für die intrazelluläre Signalweiterleitung und die zellulären Antworten auf verschiedene Stimuli verantwortlich sind (Wagner and Nebreda, 2009). Die als stress-induzierte Kinasen beschriebenen MAPK p38 und JNK sind sowohl an pro-apoptotischen Signalweiterleitungen als auch an anti-apoptotischen sowie an Zellproliferation und Zelldifferenzierung fördernden Mechanismen beteiligt (Wagner and Nebreda, 2009). Aktiviert durch die Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr (Threonin-X-Tyrosin) Motifs, phosphorylieren p38 und JNK Serin- und Threonin-Reste ihrer Zielstrukturen, die andere Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren umfassen (Wagner and Nebreda, 2009). So ist die Art des Stimulus sowie die Stärke und Dauer der Aktivierung für die verschiedenen durch JNK und p38 induzierten Antworten entscheidend (Wagner and Nebreda, 2009).

Bisher konnten drei verschiedene JNK-codierende Gene beschrieben werden: JNK1 (ubiquitär), JNK2 (ubiquitär) und JNK3 (Gehirn), die zehn verschiedene Isoformen von JNK codieren, welche wiederum durch die MAPK MKK4 und MKK7 aktiviert werden können (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Gupta et al., 1996). Wird JNK im Zuge der

Apoptose durch Stimulation von TNF oder UV aktiviert, ist JNK an der pro-apoptischen Signalweiterleitung durch die Aktivierung der Caspase-8 bzw. des Mitochondrien assoziierten Bax beteiligt (Tournier et al., 2000; Ventura et al., 2006). Eine Stimulation des G-CSFR (Granulocyte-colony-stimulating factor receptor) führt jedoch zu der Aktivierung von JNK-abhängigen Transkriptionsfaktoren, die proliferationsfördernde Zielgene induzieren (Rausch and Marshall, 1997).

Für p38 sind 4 verschiedene Proteine bekannt: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ , die durch die MAPK MKK3, MKK6 oder MKK4 aktiviert werden (Lee et al., 1994; Wagner and Nebreda, 2009). Durch Induktion von DNA Schäden oder ROS wird p38 durch die Kaskade der MAPK aktiviert und leitet die Weiterleitung von pro-apoptischen Signalen ein; z.B. durch Aktivierung von p53 oder von Mitochondrien-assoziierten Proteinen wie u. a. Bax (Jung et al., 2004). Dagegen werden p38-abhängige anti-apoptische Signalmechanismen durch die Stimulation des Interleukin-6 (IL-6) vermittelt (Ogata et al., 1997; Wagner and Nebreda, 2009).

So können durch JNK und p38 sowohl Zelltod-fördernde, als auch Zelltod-inhibierende Mechanismen induziert werden, die von dem jeweiligen Zelltyp, der Intensität und der Dauer des Signals und der Interaktion weiterer Signalmechanismen abhängig sind (Wagner and Nebreda, 2009).

## 1.2 Das Immunsystem: Ein Schutzmechanismus gegen Pathogene

Das Immunsystem beschreibt den natürlichen Schutzmechanismus eines Organismus nach Eindringen von infektiösen und toxischen Substanzen. Es wird durch zelluläre, lösliche oder gebundene molekulare Bestandteile in einer komplexen und zielgesteuerten Abfolge gebildet (Murphy et al., 2008).

Dem Organismus dienen physikalische und chemische Barrieren, wie die Haut und die Mucinschicht der Nase oder des Darmes, als erster Schutz gegen Pathogene. (Murphy et al., 2008) Durchbrechen Pathogene diese erste Barriere werden sofortige Reaktionsmechanismen des angeborenen Immunsystems eingeleitet (Murphy et al., 2008). Hierzu zählen gewebespezifische, ansässige Makrophagen und Dendritische Zellen (DC), die über hoch-sensitive Rezeptoren Pathogene identifizieren und die Pathogene über Phagozytose aufnehmen können (Kumar et al., 2011). Die als „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (PRR) bezeichneten Rezeptoren erkennen konservierte Strukturen der Pathogene, „Pathogen-associated-molecular-Patterns“ (PAMPs), wie das Lipopolysaccharid (LPS) der bakteriellen Zellwand und unterscheiden so gezielt körpereigene von körperfremden Bestandteilen (Kumar et al., 2011). Nach der Identifikation phagozytierter Pathogene prozessieren teilweise Makrophagen, aber vor allem DCs Pathogene und präsentieren Antigene über den als „Major-Histocompatibility-Complex“ (MHC) bezeichneten Molekülkomplex auf ihrer Zelloberfläche (Murphy et al., 2008). Daher gelten Makrophagen und DCs als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) (Murphy et al., 2008). Aktivierte Makrophagen produzieren und sezernieren chemische Botenstoffe, die Zytokine und Chemokine, und zerstören zuvor aufgenommene Pathogene durch spezifische Enzyme und toxische Substanzen (Murphy et al., 2008). Durch die Ausschüttung von Chemokinen werden weitere Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutiert (Murphy et al., 2008). Über den Blutstrom migrieren Granulozyten, Monozyten und Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) entlang eines Chemokingradienten in das infizierte Gewebe (Murphy et al., 2008). Innerhalb des infizierten Gewebes differenzieren und reifen Monozyten zu Makrophagen; Granulozyten, die in neutrophile, eosinophile und basophile unterteilt werden, erkennen, phagozytieren (nur neutrophile Granulozyten) und eliminieren dort Pathogene; NK-Zellen erkennen und lysieren infizierte Zellen (Murphy et al., 2008). Die Sekretion von Zytokinen führt zur Aktivierung weiterer immunologischer Effektor-Zellen (Murphy et al., 2008). Dieser durch Chemokine und Zytokine hervorgerufene Effekt wird als Inflammation zusammengefasst und beschreibt den induzierten Einstrom von Zellen in das Gewebe sowie die Anregung des Lymphflusses über den APZs in die peripheren lymphatischen Gewebe migrieren, um Effektor-Zellen des erworbenen, adaptiven Immunsystems zu aktivieren und zu rekrutieren (Murphy et al., 2008).

APZ migrieren über die Lymphe in periphere lymphatische Organe und präsentieren auf ihrer Oberfläche über MHC gebundene Antigene den Effektor-Zellen des adaptiven Immunsystems (Murphy et al., 2008). Die als Effektor-Zellen bezeichneten Lymphozyten werden in zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen, regulatorische T-Zellen und B-Zellen unterteilt (Murphy et al., 2008). Lymphozyten besitzen im Gegensatz zu den Effektor-Zellen der angeborenen Immunität eine hohe Antigen-Spezifität (Murphy et al., 2008). Zytotoxische T-Zellen werden über MHC-Klasse-I gebundene Antigene aktiviert. MHC Komplexe der Klasse I präsentieren Antigene endogenen Ursprungs (Murphy et al., 2008). Aufgrund dessen sind zytotoxische T-Zellen für die Apoptose-vermittelte Lyse und

Eliminierung infizierter Zellen verantwortlich (Murphy et al., 2008). Demgegenüber binden MHC Moleküle der Klasse II prozessierte Antigene exogener Pathogene, die spezifisch von T-Helfer-Zellen erkannt werden (Murphy et al., 2008). T-Helfer-Zellen dienen unter anderem als Ko-Stimulatoren für die Aktivierung von B-Zellen, die anschließend zu Plasma-Zellen reifen und Antigen-bindende Antikörper sezernieren um exogene Pathogene zu eliminieren (Murphy et al., 2008). Nach der Aktivierung spezifischer Lymphozyten in Folge der Erkennung ihres Antigenes differenzieren und proliferieren diese, was als klonale Expansion definiert wird (Murphy et al., 2008). Ausgereifte Lymphozyten migrieren schließlich in infiziertes Gewebe und sezernieren Zytokine, die für die Induktion und Rekrutierung weiterer immunologisch relevanter Zellen verantwortlich sind (Murphy et al., 2008). Abhängig des durch die APZ hervorgerufenen umgebenden Zytokinmilieus können T-Helfer-Zellen außerdem zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, die anti-inflammatorische Zytokine sezernieren und daher für die Regulation der Immunantwort maßgeblich sind (Murphy et al., 2008). Im Verlauf jeder Infektion ist die Bildung immunologischer Gedächtnis-Zellen („Memory Cells“) von besonderer Bedeutung (Murphy et al., 2008). T- und B-Gedächtnis-Zellen bilden während einer sekundären Infektion eine sofortige und starke Immunantwort aus, die Pathogene effektiv eliminiert und den Organismus vorbeugend schützt (Murphy et al., 2008).

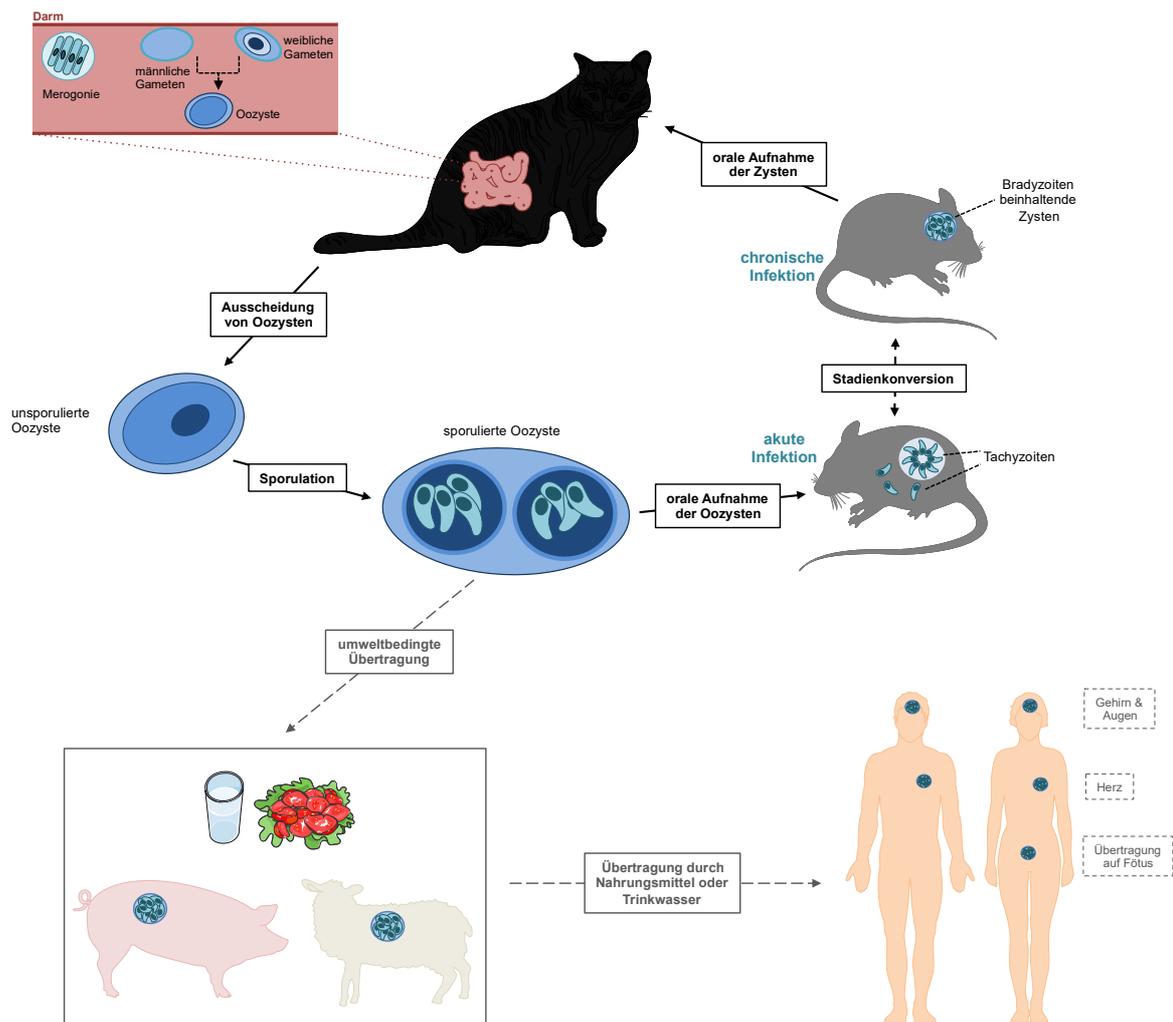
Da innerhalb der Dissertationsarbeiten eine parasitäre Infektion eingesetzt wurde, soll im Folgenden *Toxoplasma gondii* sowie die hiermit assoziierte Immunantwort erläutert werden.

### 1.2.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* ist ein etablierter Modellorganismus für parasitäre Infektionen. Der obligat intrazelluläre Protozoon ist dem Phylum der *Apicomplexa* zugeordnet, das weitere intrazelluläre Parasiten (z.B. *Plasmodium*, *Cyclospora cayetanensis*) umfasst und ein weites Spektrum an Wirtsorganismen infizieren kann (Hunter and Sibley, 2012). Neben Plasmodien ist *T. gondii* einer der bekanntesten und am weitesten verbreiteten *Apicomplexa*, der nahezu alle warmblütigen Vertebraten infiziert (Dubey, 2010). Aufgrund der breiten Wirtsspezifität (z.B. bzgl. Katzen, Menschen und Nutztieren) ist *T. gondii* sowohl für die Human- als auch die Veterinärmedizin ein substanzielles Pathogen (Dubey, 2008).

Trotz des breiten Wirtsspektrums gelten die *Felidae* (Familie der Katzen) als einzige End- bzw. Hauptwirte von *T. gondii* (Dubey et al., 1970; Frenkel, 1970). Durch eine orale Übertragung Parasiten-haltiger Gewebezysten vollzieht sich dessen geschlechtliche Vermehrung ausschließlich innerhalb des Darmtraktes der Katze (Abb. 1.5) (Dubey et al., 1970). Während des Verdauungsprozesses werden im Intestinum der Katze Bradyzoiten aus den Zysten entlassen, die Darmepithelzellen penetrieren (Dubey and Frenkel, 1972). Nach der Bildung und Replikation der entstandenen Merozoiten (Merogonie) differenzieren diese in weibliche und männliche Gameten (Hunter and Sibley, 2012). Durch die anschließende Verschmelzung einer männlichen und einer weiblichen Gamete wird eine diploide, nicht infektiöse Oozyste gebildet (Hunter and Sibley, 2012). Die Lyse der infizierten Epithelzelle führt zu der Entlassung von Oozysten in das Lumen des Darmes, worauf nicht-sporulierte Oozysten durch die Ausscheidung von Fäzes in die Umwelt freigesetzt werden (Hunter and Sibley, 2012). Ausgelöst durch diverse

Bedingungen der Umwelt (Temperatur und Sauerstoffgehalt) beginnt die Sporulation der widerstandsfähigen Oozysten woraufhin zwei Sporoblasten entstehen, die wiederum je vier hochinfektiöse Sporozoiten beinhalten (Hunter and Sibley, 2012). Eine orale Aufnahme der sporulierten Oozysten durch Zwischenwirte erfolgt meist über kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser, in denen eine asexuelle Vermehrung des Parasiten erfolgt (Jones and Dubey, 2012). Infolge dessen differenzieren im Darm entlassene Sporozoiten zu schnell replizierenden Tachyzoiten, die anschließend die Epithelzellen des Darmes infizieren (Hunter and Sibley, 2012). Innerhalb der Wirtszellen schützt sich *T. gondii* durch die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole vor einer Lysosomen-vermittelten Zersetzung (Suss-Toby et al., 1996). Aufgrund dessen ist eine schnelle Replikation der penetrierenden Tachyzoiten möglich, die während der frühen Phase durch eine typische Rosettenbildung ausgezeichnet ist und nach weiteren Zellteilungen zu einer Lyse der Epithelzelle führt (Masihi and Werner, 1976). Während der akuten Phase der *T. gondii*-vermittelten Infektion wird eine große Anzahl gebildeter Tachyzoiten aus dem Darmepithel freigesetzt, die über eine Invasion des Blut- und Lymphsystems alle Organe des Wirtes penetrieren (Dubey, 2010). Eine bevorzugte und gesteigerte Replikation der Tachyzoiten findet jedoch in der Leber und der Lunge statt (Dubey, 1997a). Durch die Abwehrreaktion des Immunsystems des Wirtes wird eine Stadienkonversion der Tachyzoiten in die langsam replizierenden Bradyzoiten induziert (Dubey, 1997b). Die sich durch einen langsamen Metabolismus auszeichnenden Bradyzoiten vermehren sich innerhalb von Zysten und überdauern zeitlich unbeschränkt in den Geweben (hauptsächlich Gehirn) des Zwischenwirtes, woraufhin die akute in die chronische Phase der Infektion übergeht (Lyons et al., 2002). Eine Aufnahme des infizierten Gewebes durch Endwirte und die sich anschließende erneute sexuelle Vermehrung schließt letztendlich den Lebenszyklus von *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012).



**Abb. 1.6 Der Lebenszyklus von *T. gondii*.** Katzen gelten als Hauptwirte von *T. gondii*, in deren Darm die sexuelle Vermehrung des Parasiten stattfindet. In Darm-Epithelzellen-replizierende Merozoiten (Merogonie) formen weibliche und männliche Gameten, die zu unsporulierten diploiden Oozysten fusionieren. Nach Ausscheidung der Oozysten durch den Fäzes der Katze in die Umwelt entwickeln sich innerhalb der Oozysten Sporozoiten (Sporulation), die oral von Zwischenwirten (Nagetiere) aufgenommen werden. In dem Zwischenwirt wird die asexuelle Vermehrung von *T. gondii* vollzogen. Innerhalb der innenliegenden Organe entstehen schnell replizierende Tachyzoiten (akute Infektion), die durch eine Konversion in langsam replizierende und Zysten bildende Bradyzoiten (Stadienkonversion) die chronische Phase der Infektion einleiten. Diese überdauern schließlich im Gehirn des Zwischenwirtes und werden oral durch den Hauptwirt aufgenommen. Sporulierte Oozysten werden bei dem Verzehr von rohem Fleisch, Gemüse sowie verunreinigtem Trinkwasser auf den Menschen übertragen und bilden in dem Gehirn, den Augen und dem Herz Zysten. Eine Erstinfektion während einer Schwangerschaft kann zudem zu einer kongenitalen Übertragung auf den Fötus führen. Dargestellt nach (Hunter and Sibley, 2012) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank ([www.servier.com](http://www.servier.com)).

Neben Nagern, die als Überträger relevanter Toxoplasmen-Stadien auf den Hauptwirt dienen, stellen Menschen ebenfalls mögliche Zwischenwirte von *T. gondii* dar (Jones and Dubey, 2012). Menschen infizieren sich häufig über kontaminiertes Trinkwasser, rohes Gemüse, nicht gegartes Fleisch infizierter Nutztiere sowie Organtransplantationen und bilden hauptsächlich im Gehirn überdauernde Zysten (Derouin et al., 2008; Jones and Dubey, 2012). Eine Toxoplasmose verläuft meist asymptomatisch oder ist durch milde Symptome wie Fieber oder geschwollene Lymphknoten gekennzeichnet (Hunter and Sibley, 2012). Darüber hinaus stellt eine Infektion mit *T. gondii* für immuninkompetente Individuen (z.B. AIDS-Patienten) oder Schwangere ein beträchtliches Risiko dar (Hunter and Sibley, 2012). Demnach entwickeln immuninkompetente Patienten oft eine Pneumonie, eine Myokarditis oder eine Enzephalitis, weshalb eine Infektion in diesen

Situationen als lebensbedrohlich gilt (Remington, 1970). Eine Erstinfektion mit *T. gondii* während einer Schwangerschaft kann zudem zu einer kongenitalen Übertragung auf den Fötus führen, die häufig mit einem Abort oder mit Fehlbildungen assoziiert ist (Havelaar et al., 2007).

Nach Schätzungen ist ca. ein Drittel der Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert. Dabei kommen jedoch verschiedene Stämme vor (Pappas et al., 2009). In Europa und Nordamerika werden drei Stämme unterschieden, die sich durch „Mischen“ während der sexuellen Vermehrung innerhalb der *Felidae* entwickelt haben (Howe and Sibley, 1995). Die verschiedenen Stämme werden schließlich anhand des Grades ihrer Virulenz gegenüber Mäusen eingeteilt (Howe and Sibley, 1995). Zu den Typ I Stämmen zählen RH und BK, die eine hohe Virulenz besitzen, indem eine Infektion mit einem Parasiten zu einer einhundertprozentigen Letalität ( $LD_{100}=1$ ) der untersuchten Tiere führt (Sibley and Boothroyd, 1992). Menschen infizieren sich meist mit dem Typ II Stamm ME49. Typ II Stämme zeichnen sich durch eine mittlere Virulenz aus. Hierbei zeigen untersuchte Tiere eine einhundertprozentige Letalität, wenn diese zuvor mit einer Dosis von mindestens  $10^3$  Parasiten ( $LD_{100}=10^3$ ) infiziert wurden (Kim and Weiss, 2004; Sibley and Boothroyd, 1992). Schließlich bilden Stämme mit einer niedrigen Virulenz eine dritte Gruppe (Typ III Stämme). Bei einer Infektion niedrig-virulenter Stämme ist eine Parasitenanzahl von mindestens  $10^5$  erforderlich ( $LD_{100}=10^5$ ), um eine einhundertprozentige Letalität zu erreichen (Sibley and Boothroyd, 1992).

### 1.2.2 Die Antwort des Immunsystems auf eine Infektion mit *T. gondii*

Die Erkennung intrazellulärer Parasiten stellt eine Besonderheit des Immunsystems dar, da diese nicht über klassische bakterielle oder virale Erkennungsstrukturen verfügen (Yarovinsky, 2014). Bisher konnte beschrieben werden, dass hauptsächlich das angeborene Immunsystem für die Erkennung und die Abwehr einer *T. gondii* Infektion verantwortlich ist (Yarovinsky, 2014). Dabei erscheint die Ausbildung einer Immunantwort von der Sekretion der im Zentrum stehenden Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  und der von diesen induzierten Mechanismen abhängig (Khan et al., 1994) (Scharton-Kersten et al., 1996a; Scharton-Kersten et al., 1996b).

Zu Beginn einer murinen Infektion mit *T. gondii* sind neben Makrophagen hauptsächlich DCs für die Erkennung des Parasiten verantwortlich (Abb. 1.6) (Dupont et al., 2012). DCs binden über die „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) 11 und 12, Mitglieder der Familie der PRR, an Profilin, das von *T. gondii* passiv entlassen wird (Yarovinsky et al., 2005). Weitere Mitglieder der TLR-Familie wie TLR7 oder 9 identifizieren eine *T. gondii*-Infektion über Parasiten-RNA bzw. -DNA während TLR2 und 4 nach Bindung des *T. gondii*-spezifischen Oberflächenmoleküls Glykosylphosphatidylinositol (GPI) aktiviert werden (Andrade et al., 2013; Debierre-Grockiego et al., 2007; Pisitkun et al., 2006). Über die verschiedenen Ebenen der Pathogen-Erkennung wird das für die Immunantwort kritische Adaptermolekül MYD88 aktiviert (Yarovinsky, 2014) (Scanga et al., 2002). MYD88-defiziente Mäuse zeigen eine hohe Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*; ähnlich zu einem kombinierten TLR Knockout, wohingegen ein Defizit einzelner TLR (wie z.B. TLR-11) keinen Einfluss auf die Etablierung einer Immunabwehr zur Folge hat (Scanga et al., 2002) (Dupont et al., 2012). Intrazellulär induziert MYD88 die Transkription von IL-12 und IL-1 über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF8 (Yarovinsky, 2014). DCs, Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten gelten als erste IL-12 Produzenten nach der

Invasion durch den Parasiten, wobei CD8 $\alpha$ + DCs als Hauptquelle des initialen IL-12 beschrieben sind (Bliss et al., 1999; Liu et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003; Reis e Sousa et al., 1997).

Neben der Einleitung essentieller anti-parasitärer Mechanismen sezernieren Makrophagen und Monozyten nach Aktivierung ebenfalls sowohl pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-12 und TNF, als auch Chemokine (Hunter and Sibley, 2012). Während IL-12 und TNF zur Aktivierung von weiteren Immuneffektorzellen und der Verstärkung anti-parasitärer Mechanismen dienen, sind Chemokine für die Rekrutierung von Zellen, z.B. von neutrophilen Granulozyten, an den Infektionsherd verantwortlich (Chang et al., 1990; Denkers et al., 2004).

Rekrutierte und aktivierte neutrophile Granulozyten induzieren verschiedene anti-parasitär wirkende Mechanismen (Dupont et al., 2012). Neben der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und dem darauf folgenden oxidativen Burst ( $\approx$  Akkumulation von ROS), welche jedoch vermutlich keinen Einfluss auf die *T. gondii* Infektion haben, entlassen neutrophile Granulozyten anti-mikrobielle Peptide und „Neutrophil-Extracellular-Traps“ (NETs) (Abi Abdallah et al., 2012; Egan et al., 2008; Konishi and Nakao, 1992). NETs bestehen aus einer Chromatin-Matrix und verknüpften anti-mikrobiellen Peptiden, die schließlich Toxoplasmen binden und inhibieren, was als NETose bezeichnet wird (Amulic et al., 2012; Brinkmann et al., 2004). Neben der gezielten Eliminierung von *T. gondii* sezernieren neutrophile Granulozyten ebenso IL-12 (Bliss et al., 2000). Eine GR-1-Antikörper-vermittelte Depletion von Neutrophilen in Mäusen ist für einen Einbruch der IL-12-Produktion und eine deutlich verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit nach einer *T. gondii* Infektion verantwortlich (Bliss et al., 2001). Dennoch wird dieser Effekt kontrovers diskutiert, da durch die Gabe von  $\alpha$ -GR-1 neben neutrophilen Granulozyten ebenfalls die Anzahl an IL-12 produzierenden Monozyten sinkt (Dunay et al., 2010).

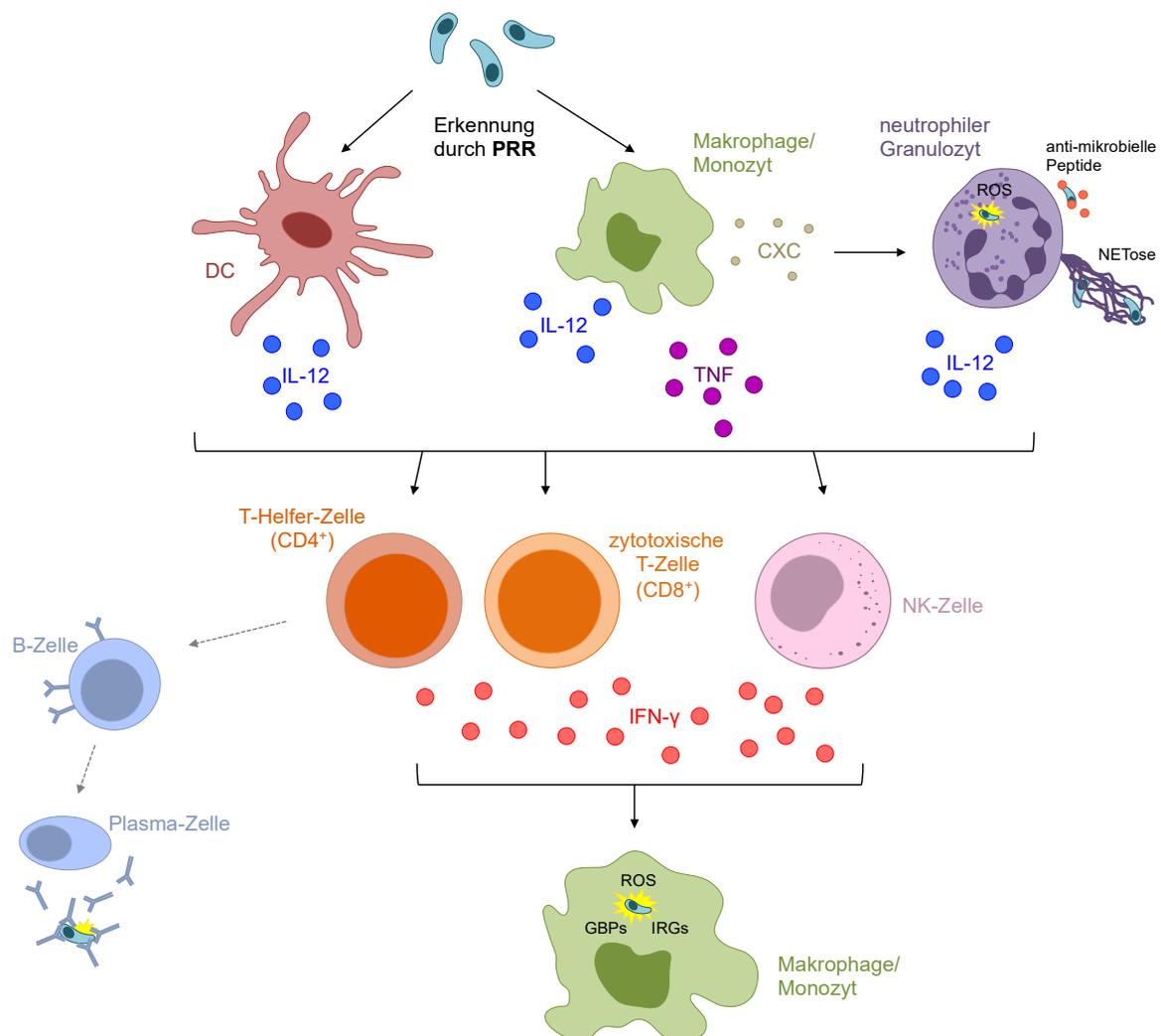
Durch die Ausschüttung von IL-12 werden NK-Zellen aktiviert (Gazzinelli et al., 1993; Hunter et al., 1994). Anders als bei diversen Pathogen-Infektionen besitzen NK-Zellen während einer Immunantwort gegen *T. gondii* keinen zytolytischen Effekt von infizierten Zellen, sondern produzieren und sezernieren große Mengen an IFN- $\gamma$  (Hauser and Tsai, 1986; Hunter et al., 1994). Dabei wirkt IFN- $\gamma$  aktivierend auf Dendritische Zellen und Monozyten sowie Makrophagen, woraufhin die IL-12 Produktion und die Induktion anti-parasitärer Mechanismen verstärkt wird (Dupont et al., 2012).

Zugleich dienen Dendritische Zellen und IL-12 als Brücke zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem (Dupont et al., 2012). Zwei DC Subpopulationen sind für die Präsentation von *T. gondii*-spezifischen Antigenen über MHC-Klasse-II Moleküle verantwortlich: pDCs und CD8 $\alpha$ + DCs (Yarovinsky, 2014). Diese DCs präsentieren *T. gondii* Antigene an T-Helfer-Zellen (CD4+) in immunologischen Geweben (Lymphknoten, Milz), wodurch T-Helfer-Zellen mit Hilfe des durch IL-12 geprägten Zytokinmilieus expandieren und induziert werden (Yarovinsky et al., 2006). Aktive T-Helfer-Zellen sezernieren große Mengen des essentiellen IFN- $\gamma$  und sind von großer Bedeutung für den Aufbau der spezifischen B-Zellantwort (Gazzinelli et al., 1994). So wird durch eine Infektion mit *T. gondii* auch eine starke humorale Immunantwort induziert (Johnson and Sayles, 2002). Nach der Aktivierung von B-Zellen durch CD4+ T-Zellen differenzieren diese zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen (Johnson and Sayles, 2002). Die ausgeschütteten spezifischen Antikörper (z.B. IgM) führen zu einer

Opcionisierung von *T. gondii* und schließlich zu der Eliminierung der Parasiten (Dupont et al., 2012). So besitzen Mäuse mit einer Depletion von B-Zellen keinen Antikörpertiter, weisen hohe Parasitenzahlen in den Gehirnen auf und versterben bereits 3 – 4 Wochen nach der Infektion (Kang et al., 2000).

Zytotoxische T-Zellen (CD8+) erfüllen wichtige Funktionen während der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene (Denkers et al., 1997). Nach einer Infektion von *T. gondii* präsentieren APZ spezifische Antigene ebenfalls über MHC I Moleküle (Dupont et al., 2012). Durch das Zusammenspiel der MHC-Antigen-T-Zell-Bindung und dem hohen IL-12 Spiegel werden zytotoxische T-Zellen aktiviert und expandieren (Dupont et al., 2012). Neben der Sekretion von großen Mengen an IFN- $\gamma$  wirken CD8+ T-Zellen zytotoxisch auf infizierte Zellen (Denkers et al., 1997). Verschiedene Studien konnten bereits beweisen, dass CD8+ T-Zellen gezielt *T. gondii*-infizierte Zellen abtöten und dabei verschiedene Antigen-Spezifitäten besitzen können (Denkers et al., 1997; Scharon-Kersten et al., 1996a; Yarovinsky, 2014).

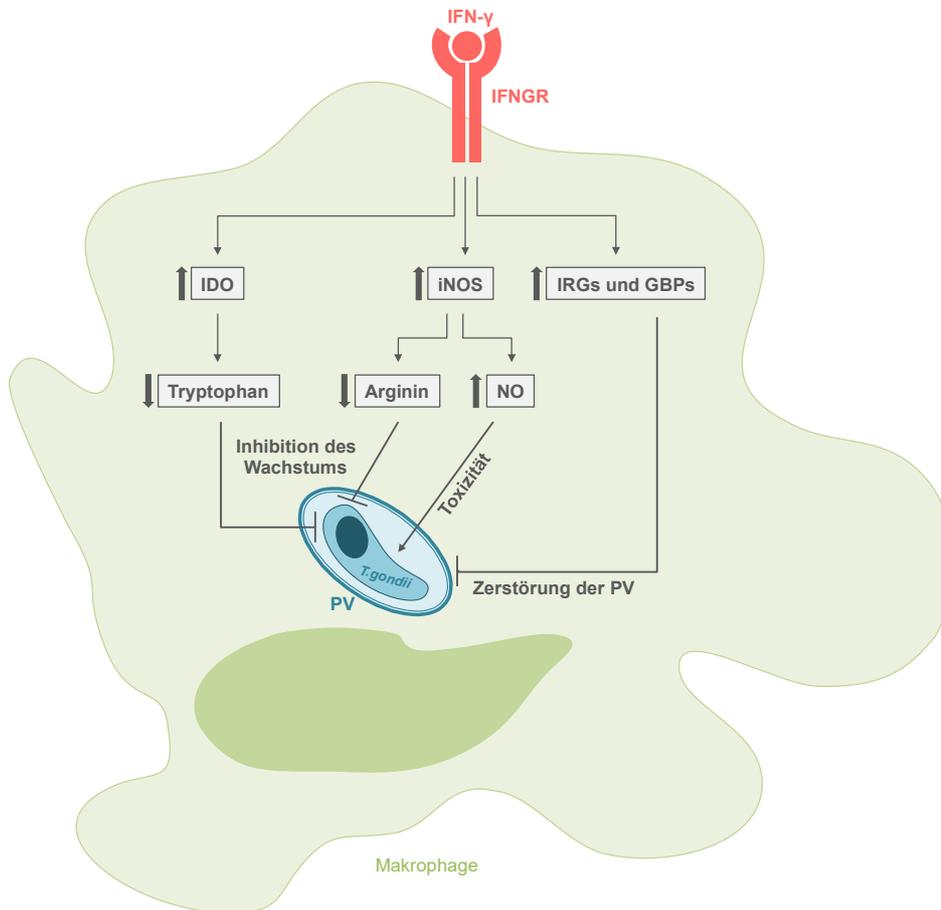
Das durch NK-Zellen, T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen produzierte und sezernierte IFN- $\gamma$  ist eines der zentralen Zytokine während des Ablaufes einer Immunantwort gegen *T. gondii*. So zeigen IFNGR<sup>-/-</sup>-und IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *T. gondii* Infektion (Deckert-Schluter et al., 1996; Scharon-Kersten et al., 1996b). Durch die starke Produktion von IFN- $\gamma$  wird die Migration und Induktion immunologischer Effektorzellen eingeleitet.



**Abb. 1.7 Immunantwort auf eine Infektion mit *T. gondii*.** Nach Detektion von *T. gondii* produzieren DCs und Makrophagen IL-12 und TNF. Durch sezerniertes IL-12 und TNF werden T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen sowie NK-Zellen aktiviert. Die darauf folgende Ausschüttung von IFN-γ induziert in Makrophagen und Monozyten starke anti-parasitäre Mechanismen, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Guanyl-nitrosyltransferase-ähnliche Proteine (GBPs) und „Immunity-related“ GTPasen (IRGs). Gleichzeitig aktivieren T-Helfer-Zellen *T. gondii*-spezifische B-Zellen, die zu Plasma-Zellen differenzieren und *T. gondii*-spezifische Antikörper ausschütten. Die Sekretion von Chemokinen (CXC) aktivierter Makrophagen rekrutiert und induziert neutrophile Granulozyten, die IL-12 produzieren und *T. gondii* durch ROS, anti-mikrobielle Peptide und NETose eliminieren. Dargestellt nach (Dupont et al., 2012; Yarovinsky, 2014) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank (www.servier.com).

Als Haupteffektorzellen, die nach einer Infektion mit *T. gondii* durch IFN-γ aktiviert werden, gelten Makrophagen und Monozyten (Nathan et al., 1983). Die Bindung von IFN-γ an den IFNGR induziert in Makrophagen und Monozyten verschiedene starke anti-parasitäre Mechanismen (Abb. 1.7) (Dupont et al., 2012; Yarovinsky, 2014). Die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase katalysiert den Abbau von Tryptophan zu *N*-Formylkynurenin (Pfefferkorn, 1984). Da *T. gondii* ein für Tryptophan auxotropher Organismus ist, inhibiert der Abbau von Tryptophan das intrazelluläre Parasitenwachstum (Sibley et al., 1994). Das Wachstum von *T. gondii* ist zudem durch „Nitric-Oxide“-Synthase (iNOS) induzierte Abbauprozesse hemmbar (Adams et al., 1990). iNOS synthetisiert nach Aktivierung durch IFN-γ „Nitric-Oxide“ (NO). Während der Katalyse zu NO entsteht simultan eine Depletion von Arginin (Adams et al., 1990). Der strikt Arginin-auxotrophe *T. gondii* wird durch das fehlende Arginin im Zytosol der Makrophagen in der

Replikation gehemmt, konvertiert in die überdauernden Bradyzoiten oder kann gezielt aufgrund der Schwächung eliminiert werden (Fox et al., 2004). Das durch iNOS katalysierte NO diffundiert durch die Membran in das Innere der parasitophoren Vakuole (PV) und besitzt durch die direkte Inhibition parasitärer Enzyme einen zytostatischen Effekt (Yarovinsky, 2014).



**Abb. 1.8 IFN- $\gamma$ -induzierte Effektormechanismen.** Die Bindung von IFN- $\gamma$  an den IFNGR von Makrophagen induziert verschiedene anti-parasitäre Effektor-Mechanismen. Die gesteigerte Aktivität der Enzyme IDO und iNOS induziert den Abbau von Tryptophan bzw. Arginin wodurch das Wachstum intrazellulärer Parasiten gehemmt wird. Die Produktion von toxischem NO durch iNOS trägt zur Eliminierung von *T. gondii* bei, da der Parasit gleichzeitig durch die Induktion von GBPs und IRGs und die Zerstörung der PV in das Zytoplasma entlassen wird. Dargestellt nach (Yarovinsky, 2014) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank ([www.servier.com](http://www.servier.com)).

Neben IDO und iNOS ist eine dritte Gruppe IFN- $\gamma$ -induzierter Proteine für die Abwehr von *T. gondii* essentiell: die GTPasen. Durch IFN- $\gamma$  werden zwei große Familien von GTPasen aktiviert: die „Immunity-related“-GTPasen (IRGs) und die p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) (Yarovinsky, 2014). IRGs sind auf die verschiedenen Kompartimente der Zellen, wie den Golgi-Apparat, das ER oder auch das Zytosol, verteilt. Hervorgerufen durch eine Infektion mit *T. gondii* verändert sich die Lokalisation der IRGs und GBPs zu einer Translokation an die gebildete PV (Degrandi et al., 2007; Martens et al., 2005). Eine induzierte Vesikel-Formation und die anschließende Disruption der PV-Membran führt zu einem Verlust des Schutzes und dem lysosomalen Abbau des Parasiten (Dupont et al., 2012). Weniger bekannt sind die Effektormechanismen der GBPs. Einige Mitglieder der GBP-Familie lokalisieren ebenfalls an der PV weshalb vermutet wird, dass GBPs wesentlich zu den *T. gondii* Abwehrmechanismen beitragen (Degrandi et al., 2013). So

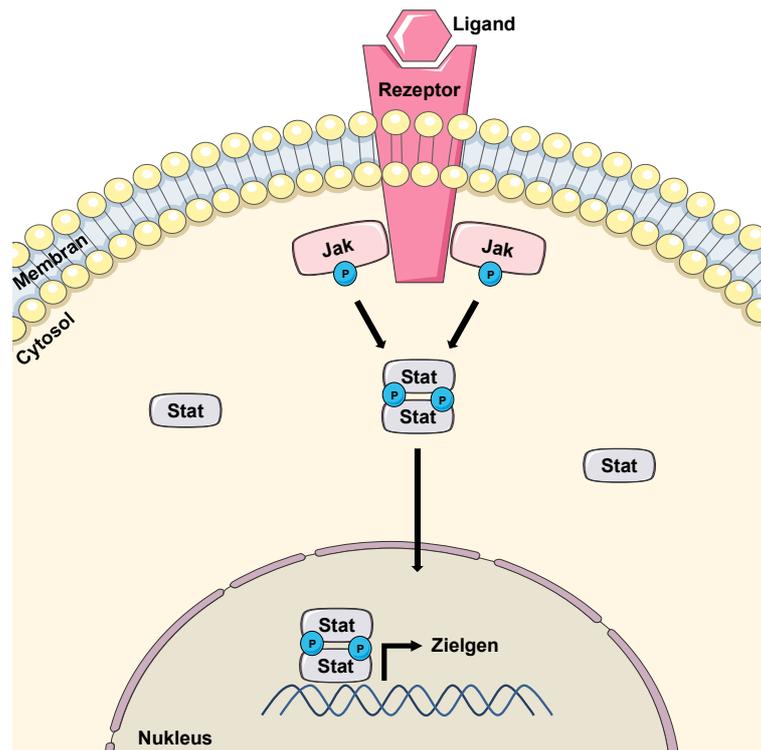
zeigen mGBP-Knockout Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* (Degrandi et al., 2013).

### **1.3 Janus Kinasen und „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (Stats)**

Eine Fehlregulation der Kommunikation zwischen oder innerhalb von Zellen ist häufig mit der Entstehung von malignen Zellen oder einer Fehlfunktion des Immunsystems assoziiert, wodurch die Signifikanz zellulärer Signalmechanismen innerhalb von Geweben, der Homöostase und der Immunabwehr verdeutlicht wird (O'Shea et al., 2015). Die Umsetzung und die Antwort auf Umwelteinflüsse regulieren diverse zelluläre Mechanismen wie das Zellwachstum und die Differenzierung (O'Shea et al., 2015). Die Regulation der zellulären Antworten und Kommunikation wird durch verschiedene Signaltransduktionen vermittelt. Eine der simpelsten Signalkaskaden ist der evolutionär hoch konservierte Jak-Stat-Signalweg (O'Shea et al., 2015; Wang and Levy, 2012). Verschiedene Untersuchungen zu IFN-vermittelten Signalen führten seit den 1980er Jahren zu der Entdeckung der Janus Kinasen (Jak) und der „Signal-Transducer-and-Activators-of-Transcription“ (Stats) (Stark and Darnell, 2012). Bisher beschreibt eine große Anzahl an Studien, dass Zytokine, Interferone, Wachstumsfaktoren (Hormone) und verwandte Moleküle über den Jak-Stat-Signalweg Informationen in das Innere von Zellen weitertragen, um eine für die Zell-Kommunikation essentielle Antwort zu induzieren (Villarino et al., 2015). Dabei beruht das Prinzip des Jak-Stat-Signalweges auf der direkten Kommunikation von aktivierten Transmembranrezeptoren und der Expression von Genen innerhalb des Nukleus (O'Shea et al., 2015).

#### **1.3.1 Die Jak-Stat Signaltransduktion**

Die Bindung eines Liganden an seinen kognaten Rezeptor führt zur Induktion des Jak-Stat-Signalweges (Abb. 1.8) (O'Shea et al., 2015). Gezielte Änderungen der Rezeptorkonformation induzieren eine räumliche Annäherung der zytoplasmatischen Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen - den Jaks (Villarino et al., 2015). Durch die Konformationsänderung auftretende Trennung der für die Jak-Funktion essentiellen Kinasedomäne von der inhibierenden Pseudokinasedomäne, wird dessen aktivierende trans-Phosphorylierung ermöglicht (Brooks et al., 2014). Die gegenseitige Phosphorylierung der Jaks sowie die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptorketten führt zu einer Generierung von Stat-Bindestellen (Villarino et al., 2015). Rekrutierte und gebundene Stats werden durch eine Jak-vermittelte Phosphorylierung aktiviert (O'Shea et al., 2015). Die aktiven Stat-Moleküle formen Homo- oder Heterodimere und translozieren durch die Nukleusmembran in den Zellkern (O'Shea et al., 2015). Im Nukleus binden Stats als Transkriptionsfaktoren an die DNA und initiieren und regulieren die Transkription der relevanten Zielgene (O'Shea et al., 2015).



**Abb. 1.9 Modell der Jak-Stat Signaltransduktion.** Nach Bindung eines Liganden an seinen kognaten Rezeptor werden prä-assoziierte Jaks aktiviert und auto-phosphoryliert. Die Bindung und Phosphorylierung von Stats ermöglicht deren Translokation in den Nucleus und die Induktion der Expression der relevanten Zielgene. Dargestellt nach (O'Shea et al., 2015) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank ([www.servier.com](http://www.servier.com)).

In Säugetieren sind vier Jaks (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) und sieben Stats (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6) bekannt (O'Shea et al., 2002; O'Shea et al., 2015; Villarino et al., 2015).

Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorassoziationen erfüllen Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 Funktionen, welche zu divergenten Signalkaskaden *in vivo* führen. Jak1 wird nahezu ubiquitär exprimiert und ist an IFN-Rezeptoren, gp130-abhängigen-Rezeptoren sowie  $\gamma$ c-abhängigen-Rezeptoren assoziiert (O'Shea et al., 2002). Durch auftretende neuronale Schäden sind Jak1-Knockout-Mäuse perinatal letal und entwickeln einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID: „severe combined immune defect“) (O'Shea et al., 2002; Rodig et al., 1998). Jak2 ist ebenfalls in geradezu allen Körperzellen präsent (O'Shea et al., 2002). Neben einer Assoziation mit Hormonrezeptoren nimmt Jak2 essentielle Funktionen innerhalb der Signalwege verschiedener Typ II Zytokin-Rezeptoren ein (O'Shea et al., 2002). Ein konventioneller Jak2-Knockout führt zu einer embryonalen Letalität an Tag 12.5, die auf eine unvollständige Erythropoese zurückzuführen ist (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998). Des Weiteren wird Jak2 in Abschnitt 1.3.3 eingehend beschrieben. Anders als Jak1 und Jak2 wird Jak3 ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und bindet an  $\gamma$ c-abhängige Zytokinrezeptoren (O'Shea et al., 2002). Jak3-defiziente Mäuse besitzen eine defekte Entwicklung von B- und T-Zellen, die zu SCID führt (Nosaka et al., 1995; Park et al., 1995; Thomis et al., 1995). Anders als Jak1, Jak2 und Tyk2 ist Jak3 in Menschen nicht vorhanden (O'Shea et al., 2002). Die ubiquitär präsente Tyrosin-Kinase 2 (Tyk2) ist essentiell für die Signaltransduktion der Typ I Interferone sowie der Zytokine IL-12 und IL-23 (O'Shea et al., 2002). Hervorzuheben ist, dass Tyk2-Knockout-Mäuse gegenüber den übrigen Jaks einen

milden Phänotyp besitzen (O'Shea et al., 2002). So induzieren Tyk2-Knockout-Mäuse eine schwächere Typ I IFN und IL-12 Antwort auf eine Infektion (O'Shea et al., 2002).

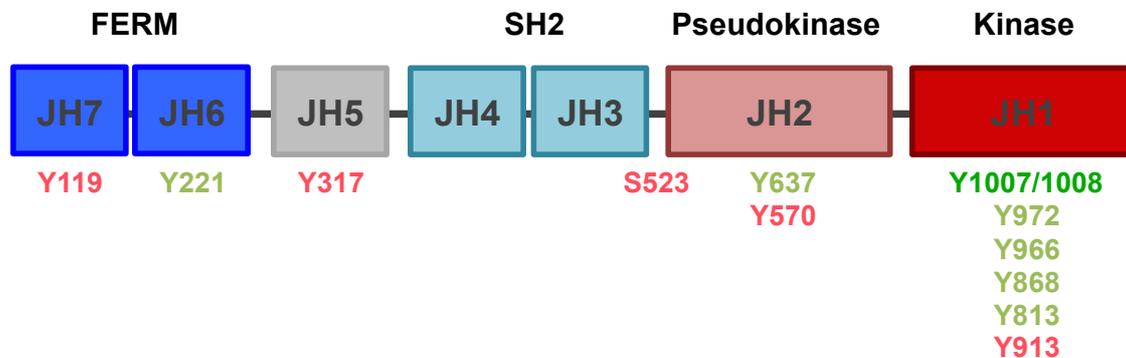
Ähnlich zu Jaks induzieren unterschiedliche Zytokinrezeptoren ebenfalls differentielle Stats, die wiederum tausende Gene aktivieren können (O'Shea et al., 2015). Stat1 und Stat2 induzieren Typ II IFN- bzw. Typ I IFN-abhängige Gene und Knockout-Mäuse sind gegenüber viralen Infektionen hoch suszeptibel (O'Shea et al., 2015). Demgegenüber ist ein Stat3 Knockout an Tag 7.5 embryonal letal und Teil des IL-6 sowie anderen gp130-assoziierten Signalwegen (O'Shea et al., 2015). Stat4-Aktivität wird ausschließlich nach einer Stimulation des IL-12R, IL-23R oder des Typ I IFNR induziert und ein Stat4-Knockout ist mit Defekten der Zell-vermittelten Immunität assoziiert (O'Shea et al., 2015). Stat5a und Stat5b führen hauptsächlich zur Transkription Hormonrezeptor-abhängige Gene (O'Shea et al., 2015). Ein konditionaler Knockout von Stat5 ist mit Defekten der Hämatopoese verknüpft, welche u.a. zu Autoimmunität und Zwergenwuchs führen (O'Shea et al., 2015). Stat6 transloziert nach Aktivierung von IL-4R und IL-13R in den Nukleus und ist für die T-Helfer-Zelldifferenzierung essentiell (O'Shea et al., 2015). Daher ist eine Stat6-Defizienz mit einer fehlenden T-Helfer-Zelldifferenzierung und Symptomen wie Asthma assoziiert (O'Shea et al., 2015).

Die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Jaks und Stats verdeutlichen, dass die Jak-Stat-Signalwege kritisch für diverse ablaufende Prozesse des Immunsystems (Infektionsabwehr sowie immunologische Toleranz), der Hämatopoese, des Zell-Überlebens und der Entwicklung sind (O'Shea et al., 2015).

### **1.3.2 Der strukturelle Aufbau der Jaks**

Janus Kinasen haben eine molekulare Masse von 120 kDa bis zu 140 kDa (Yamaoka et al., 2004). Der strukturelle Aufbau der Jaks wird durch hochkonservierte Jak Homologie-Domänen (JH) bestimmt (Yamaoka et al., 2004). Alle Jaks gliedern sich in sieben JH Domänen, die wiederum unterschiedliche funktionelle Domänen bilden (Imada and Leonard, 2000). Dabei treten die Jak-namensgebenden, Kinase-ähnlichen Domänen in den Vordergrund: die Kinase und die Pseudokinase-Domäne, deren Bezeichnung in Anlehnung an den doppelgesichtigen römischen Gott der Dualität, Janus, gewählt wurde (Imada and Leonard, 2000). Die am C-Terminus liegende JH1-Domäne bildet die funktionelle Kinase-Domäne und enthält das katalytische Zentrum sowie den Aktivierungs-„Loop“ (Abb. 1.9) (Imada and Leonard, 2000). Die Kinase-Domäne wird durch die Phosphorylierung verschiedener Tyrosine aktiviert oder inhibiert (Feng et al., 1997; LaFave and Levine, 2012). Hier sind die aktivierende Phosphorylierung der Tyrosine 1007 und 1008 des Aktivierungs-„Loops“ von besonderer Bedeutung (Feng et al., 1997). Auf die Kinase-Domäne folgt die regulierende Pseudokinase-Domäne (JH2), die einen nicht-aktivierbaren Aktivierungs-Loop besitzt (LaFave and Levine, 2012). Zahlreiche Studien beschreiben eine Kinase-inhibierende Funktion der Pseudokinase-Domäne, andere vermuten innerhalb dieser Domäne liegende Bindestellen für Stats (Frank et al., 1994; Fujitani et al., 1997). Auch die Pseudokinase-Domäne weist sowohl ein Jak-aktivierendes, als auch ein inhibierendes Tyrosin auf (Abb. 1.9) (LaFave and Levine, 2012). JH3 und JH4 formen die SH2-Domäne, die für Proteininteraktionen von Jak-aktivierenden Interaktionspartnern essentiell ist (Filippakopoulos et al., 2009). Eine zusätzliche bedeutende Domäne befindet sich am N-Terminus des Proteins: die FERM-

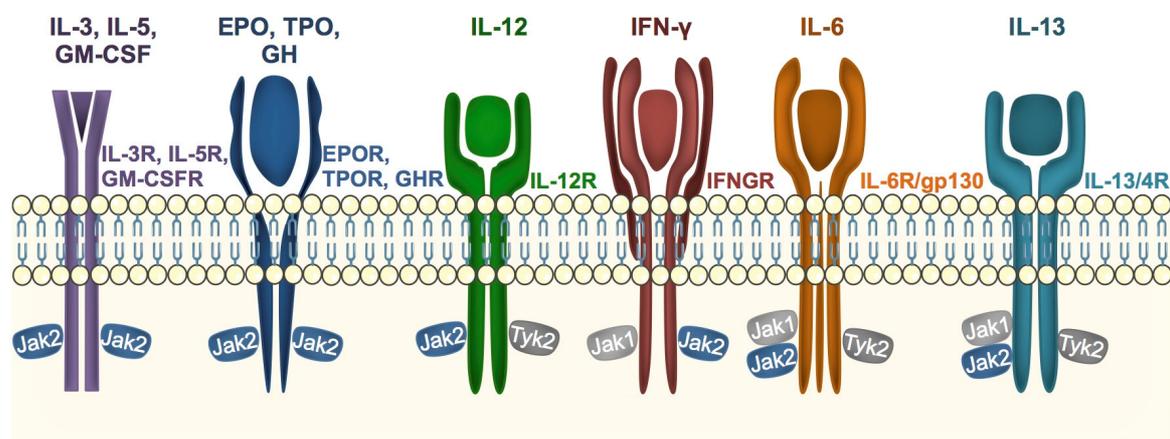
Domäne (O'Shea et al., 2002). Gegliedert durch JH6 und JH7, vermittelt die FERM-Domäne die Rezeptorbindung und reguliert zudem durch Bindung an die Kinase-Domäne die katalytische Aktivität (Hilkens et al., 2001; Zhou et al., 2001). Hierbei ist eine aktivierende Tyrosin-Phosphorylierung essentiell, während eine inhibierende Phosphorylierung eines Tyrosins der JH7 Domäne für die Blockade der Rezeptorbindung verantwortlich ist (Abb. 1.9) (LaFave and Levine, 2012).



**Abb. 1.10 Die Domänen-Struktur der Janus Kinasen.** Jaks werden durch sieben Jak-Homologie-Domänen gegliedert, die verschiedene funktionelle Domänen formen: Kinase-Domäne, Pseudokinase-Domäne, SH2-Domäne und FERM-Domäne. Die Domänen können an unterschiedlichen Positionen stehenden Tyrosinen phosphoryliert werden. Diese besitzen entweder eine aktivierende (grün) oder eine inhibierende (rot) Wirkung. Dargestellt nach (LaFave and Levine, 2012).

### 1.3.3 Die Janus Kinase 2 (Jak2)

Die Janus Kinase 2 erfüllt verschiedene essentielle Funktionen während der Entwicklung, der Immunabwehr und der Hämatopoese, welche durch die Assoziation verschiedener Rezeptoren charakterisiert werden (O'Shea et al., 2015). So bindet Jak2 an die zytoplasmatischen Untereinheiten folgender Rezeptoren: Interleukin-3 Rezeptor (IL-3R), Interleukin-5 Rezeptor (IL-5R), „granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor“ Rezeptor (GM-CSFR), Erythropoetin Rezeptor (EPOR), Thrombopoetin Rezeptor (TPOR), „growth-hormone“ Rezeptor (GHR), Interleukin-12 Rezeptor (IL-12R), Interferon- $\gamma$  Rezeptor (IFNGR), Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) und Interleukin-13 Rezeptor (IL-13R) (Abb. 1.10) (O'Shea et al., 2015).



**Abb. 1.11 Jak2-abhängige Rezeptoren.** Jak2 ist an folgenden Rezeptoren und deren Signalkaskaden assoziiert: IL-3R, IL-5R, GM-CSFR, EPOR, TPOR, GHR, IL-12R, IFNGR, IL-6R und IL-13R. Dargestellt nach (O'Shea et al., 2015) mit Hilfe der Servier Medical Art Datenbank (www.servier.com).

Divergent zum IL-6R, an welchem neben Jak2 die Tyrosinkinase Tyk2 und Jak1 assoziiert sind, bindet der EPOR ausschließlich Jak2 (Giordano et al., 1997; Witthuhn et al., 1993). Durch die Stimulation des EPOR werden für das Zell-Überleben bestimmende Signale, z.B. durch die Induktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-XL, weitergeleitet, wodurch die weitere Differenzierung von Vorläuferzellen während der Erythropoese stattfinden kann (Rhodes et al., 2005; Testa, 2004). Ein konventioneller Knockout von Jak2 in Mäusen führt so zu einer unvollständigen Erythropoese und daraus folgend zu einer embryonalen Letalität an Tag 12.5 (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998).

Um dennoch komplexe Jak2-abhängige Mechanismen *in vivo* zu untersuchen, wurden bereits mittels konditionalen Gene-Targeting (Cre/loxP-System) verschiedene konditionale Knockout Mäuse generiert. Ein konditionaler Knockout beschreibt einen Zelltyp-spezifischen Knockout (Orban et al., 1992). Durch die Kreuzung von Mäusen, die über einen von loxP Sequenzen flankierten Jak2-Genlocus (Jak2<sup>fl/fl</sup>) verfügen mit Mäusen, die eine Cre-Rekombinase unter dem Zelltyp-spezifischen Promotor besitzen, wird so ein konditionaler Knockout generiert (Krempler et al., 2004). Die Zelltyp-spezifische Expression der Cre-Rekombinase führt zur Erkennung der Cre-spezifischen loxP-Sequenzen und der darauf folgenden Entfernung des Gens aus dem Genom (Gu et al., 1993; Orban et al., 1992). So konnte für einen konditionalen Jak2 Knockout in adulten Mäusen, generiert durch die Kreuzung von Jak2<sup>fl/fl</sup> und Cre-ERT2 (Promotor: humanes Ubiquitin C; Cre kann durch Tamoxifen induziert werden), ein Defekt der DC Differenzierung beschrieben werden (Zhong et al., 2010). Ebenso wie der EPOR signalisiert der GM-CSFR ausschließlich über gebundene Jak2 Moleküle. Das Fehlen der durch GM-CSF-vermittelten Überlebens- und Differenzierungssignale resultiert in einem Abbruch der DC Generierung und hoher Suszeptibilität gegenüber eindringenden Pathogenen (van de Laar et al., 2012; Zhong et al., 2010). Weitere Studien des Jak2-Knockouts postulieren, dass auch eine Beeinträchtigung der Jak2-vermittelten Signale in adulten Tieren über lang anhaltende Perioden zu einer erhöhten Mortalität führt (Park et al., 2013).

Auch der GHR vermittelt Signale über Jak2 (Argetsinger et al., 1993). Die kritische Funktion von Jak2 innerhalb des GHR Signalweges konnte bereits durch die Analyse eines Hepatozyten-spezifischen Jak2 Knockouts beschrieben werden (Jak2<sup>fl/fl</sup> Albcre) (Shi et al., 2012). Aufgrund eines Mangels der GHR-induzierten Signalwege entsteht ein dramatischer Anstieg der Lipogenese. Weiter entwickeln diese Mäuse pathologisch betrachtet eine Fettleber, die durch massive eine Lipideinlagerung des Lebergewebes gekennzeichnet ist (Shi et al., 2012).

Durch *in vitro* durchgeführte Zellkultur-basierte Studien wurde bewiesen, dass IFN- $\gamma$ - sowie IL-12-induzierte Mechanismen von Jak2 abhängig sind (Neubauer et al., 1998; Villarino et al., 2015). Ein Abbruch der IFN- $\gamma$  induzierten Signale (z.B. anti-mikrobielle Mechanismen) führt zu einem verminderten Schutz gegenüber Pathogenen (Villarino et al., 2015).

Neben den immunmodulatorischen und metabolischen Eigenschaften von Jak2 über Zytokin- bzw. Hormonrezeptoren ist unterdessen eine Hyperaktivität von Jak2 in der Entstehung von malignen Zellen von Interesse (LaFave and Levine, 2012). Diverse Studien ergaben, dass Patienten mit Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) (bösartige Erkrankungen des Knochenmarks durch eine Überproduktion myeloider Zellen) in über 70% der Fälle eine Mutation des Jak2-Lokus aufweisen (Vakil and Tefferi, 2011). Die

Mutation entsteht mittels eines Aminosäureaustausches an der an der Position 617 (Valin zu Phenylalanin), wodurch Jak2 eine konstitutiv aktive Konformation einnimmt (Baxter et al., 2005; Levine et al., 2005; Quentmeier et al., 2006). Die daraus resultierenden kontinuierlichen Überlebens- und Differenzierungssignale sind für eine Überproduktion von myelodien Zellen verantwortlich (Baxter et al., 2005; Levine et al., 2005) (LaFave and Levine, 2012). Therapeutische Ansätze durch die Entwicklung und Synthese Jak2-spezifischer Inhibitoren zeigten bereits vielversprechende anti-proliferative Eigenschaften (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Jak2-Inhibitoren, wie NVP-BSK805 und der Jak2-Inhibitor V Z3, verhindern die Bindung von ATP in seine Bindetasche innerhalb der Pseudokinasedomäne und blockieren so die Phosphorylierung der Kinase-aktivierenden Tyrosine 1007/1008 (Baffert et al., 2010; Hammaren et al., 2015; Sayyah et al., 2008).

## 1.4 Zielsetzung

Janus Kinasen sind für die Ausbildung einer Immunantwort, für das Zell-Überleben, für Vorgänge während der Entwicklung und für den Ablauf der Hämatopoese essentiell (O'Shea et al., 2002; O'Shea and Plenge, 2012; Stark and Darnell, 2012). Besonders Jak2-abhängige Mechanismen treten durch die Assoziation einer konstitutiv aktiven Mutante mit der Entstehung von myeloproliferativen Neoplasien (MPN) in den Vordergrund des klinischen Interesses (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Unter Berücksichtigung, dass ein Hauptcharakteristikum maligner Zellen die Inhibition von Apoptose ist, ist ein Verständnis sowohl der anti- als auch der pro-apoptotischen Funktion von Jak2 für die Entwicklung von Inhibitoren von großer Bedeutung.

Bisherige Studien beschreiben Jak2-abhängige anti-apoptotische Mechanismen ausschließlich über die Wirkung von Wachstumsfaktoren (z.B. Epo) (Argetsinger et al., 1993; Testa, 2004). Im Gegensatz dazu stehende pro-apoptotische Funktionen konnten mittels einer IFN- $\gamma$ -abhängigen Sensibilisierung von Zellen durch die Hochregulation des Fas-Rezeptors beschrieben werden (Rosner et al., 2006). Ein direkter Einfluss von Jak2 auf apoptotische Signalwege wurde bisher nicht beschrieben und soll in dieser Dissertation untersucht werden. Dazu soll zunächst die Quantifizierung apoptotischer Zellen nach Stimulation von extrinsischer und intrinsischer Apoptose in wt und Jak2-Knockout Zellen eine potentielle Funktion von Jak2 beim programmierten Zelltod aufklären. Detaillierte Studien zur Lokalisation von Jak2 sollten hierbei erste Hinweise auf eine Rezeptor-assoziierte oder eine potentielle Rezeptor-unabhängige Funktion gewähren. Weitere Untersuchungen des apoptotischen Signalweges in wt und Jak2-Knockout Zellen sollten schließlich über mögliche Verknüpfungen und Interaktion von Jak2 mit Apoptose vermittelnden sowie anti-apoptotischen Molekülen aufklären. Die Übertragung einer potentiellen Funktion von Jak2 auf humane Zellsysteme sowie auf *in vivo* Modellsysteme (Maus) ist zudem von Bedeutung und sollte in der Dissertation untersucht werden

In einem zweiten Teilprojekt dieser Dissertation steht die Funktion von Jak2 während parasitärer Infektionen im Vordergrund. Erste klinische Studien von Jak2-Inhibitoren beschreiben eine höhere Sensitivität von Patienten gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen (Hopman et al., 2014; O'Shea et al., 2015; Vannucchi et al., 2015). Da ein konventioneller Jak2-Knockout embryonal letal ist, ist die direkte Aufklärung der Funktionen von Jak2 *in vivo* während Infektionen kaum beschrieben. Daher soll eine Infektion eines konditionalen Knockouts von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen durch den Parasiten *T. gondii* untersucht werden. Die Untersuchung der Mortalität sowie verschiedener immunologischer Mechanismen sollen außerdem Einblicke der Jak2-vermittelten Signaltransduktion während der Immunantwort geben.

## 2 Material

### 2.1 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Abbocath-T 24G*19mm	Venisystems, Abbott (IE)
Cellometer Cell Counting Chambers	Nexcelom, Bramsche (DE)
Chromatographiepapiere (Filterpapiere)	Whatman, Dassel (DE)
Deckgläschen (Ø 13mm)	VWR, Darmstadt (DE)
Dispenser-Tips (diverse Größen)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Einfrierröhrchen	NUNC GmbH, Wiesbaden (DE)
Einmalspritzen (1-50 ml)	B. Braun, Melsungen (DE)
Einwegpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Corning Incorporated, Tewksbury (US)
FACS-Tubes	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Glaspipetten (5, 10, 20 ml)	Hirschmann Techcolor, Eberstadt (DE)
Kanülen Sterican® (diverse Größen)	B. Braun, Melsungen (DE)
Mehrfach-Loch-Platten (6, 12, 24, 96-Loch)	Corning Incorporated, Tewksbury (US)
Mikrotomklingen	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Nitrocellulosemembran Whatman™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde (DE)
Objektträger Super Frost	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Pipettenspitzen TipOne®	StarLab, Hamburg (DE)
Precellys Ceramic Kit 2,8 mm, 2 ml	Peqlab, Erlangen (DE)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE) Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Röntgenfilme Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Freiburg (DE)
Sterilfilter (0,2 µM)	Millipore, Eschborn (DE)
Tear-A-Way™ PCR-Platten	4titude, Berlin (DE)
Tissue-Tek Cryomold®	Sakura, Alphen aan Rijn (NL)
Zellkulturflaschen (25, 75, 165 cm <sup>2</sup> )	Corning Incorporated, Tewksbury (US)
Zellkulturplatten (5, 10, 15 cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Zellsieb (70 µM)	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen (DE) Sarstedt, Nümbrecht (DE)

## 2.2 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Abzug	WRT-Laborbau, Stadtlohn (DE)
Analysewaage Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf (DE)
Axiovert 11 Mikroskop	Zeiss, Jena (DE)
Biofuge fresco (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau (DE)
Brutschrank (Heracell 240)	Heraeus, Hanau (DE)
Cellometer Auto T4	Nexcelom, Bramsche (DE)
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg (DE)
Cryotom (HM 650)	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Digitalkamera Lumix DMC-TZ7	Panasonic, Kadoma (JP)
Drehrad Model L28	Labinco BV, Breda (NL)
Ein- und Multikanalpipetten	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Eismaschine SPR 165	Nordkap, München (DE)
Elektrophoresekammer (Agarosegele DNA)	Hoefer, Amsterdam (NL)
Elektrophoresekammer X sure Lock (SDS-PAGE)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln (DE)
FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Geldokumentationssystem (BioDocAnalyze)	Bio-Rad, München (DE)
Heizrührer MR3001 K	Heidolph, Schwabach (DE)
IQ-5 iCycler	Bio-Rad, München (DE)
Konfokales Fluoreszenzmikroskop (Zeiss LSM 780)	Zeiss, Jena (DE)
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau (DE)
Millipore Anlage (Synthesis A10, Elix advantage 3)	Millipore, Schwalbach (DE)
Multipipette	Eppendorf, Hamburg (DE)
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen (DE)
PCR-Geräte, Thermocycler	Biometra, Göttingen (DE)
Pipettierhilfe (PIPETBOY acu 2)	Ibs/tecnomara GmbH, Fernwald (DE)
pH Meter MP 225	Mettler-Toledo, Gießen (DE)
Photometer Tecan Sunrise	Tecan, Männedorf (CH)
Precellys Homogenisator	VWR International, Erlangen (DE)
Proteintransfer-Kammer (semi-dry)	Peqlab, Erlangen (DE)
Schlauchpumpe, peristaltic	Ismatec, Wertheim (DE)
Schüttler für Bakterienkulturen, Ecotron	Infors HT, Bottmingen (DE)
Spannungsquelle peqPOWER 250	Peqlab, Erlangen (DE)

Sterilbank (HLB 2472 GS)	Heraeus, Hanau (DE)
Thermoblock	Techne, Jahnsdorf (DE)
ThermoMixer compact	Eppendorf, Hamburg (DE)
Vortex Schüttler	VWR, Darmstadt (DE)
Waage Precisa 600c	Oehmen Labortechnik, Essen (DE)
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach (DE)
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen (DE)

### 2.3 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Merck, Darmstadt (DE)
Agarose	Lonza, Rockland (US)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen (DE)
$\beta$ -Mercaptoethanol (Zellkultur)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
$\beta$ -Mercaptoethanol (Proteinanalysen)	Roth, Karlsruhe (DE)
BAY 11-7085	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg (DE)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt (DE)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Chloroform	Roth, Karlsruhe (DE)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim (DE)
Cycloheximid In-Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DAPI	Roche, Mannheim (DE)
Destilliertes Wasser	Life technologies, Darmstadt (DE)
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dithiothreitol (DTT)	Life technologies, Darmstadt (DE)
DMEM Medium	Life technologies, Darmstadt (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt (DE)
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
Entellan™	Merck, Darmstadt (DE)
Eisessig (Essigsäure 96%)	Merck, Darmstadt (DE)
Entwickler-Lösung	Agfa, Köln (DE)
Eosin G	Merck, Darmstadt (DE)

## Material

---

Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt/Main (DE)
Ethanol	VWR chemicals, Langenfeld (DE)
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie AG, St. Gallen (CH)
Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt (DE)
FACS Clean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
FACS Flow Lösung	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
FACS Shutdown Lösung	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Ficoll Paque™ Plus	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (GB)
Fixierer-Lösung	Agfa, Köln (DE)
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham (US)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt (DE)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach (DE)
Gelatin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Geneticin (G418®)	Life technologies, Darmstadt (DE)
Giemsas Azur Eosin-Methylenblau Lösung	Merck, Darmstadt (DE)
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Glycerol	Merck, Darmstadt (DE)
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt (DE)
Hepes	Merck, Darmstadt (DE)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (DE)
Jak2 Inhibitor V, Z3	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (DE)
KP-CryoCompound Einbettmedium	Klinipath BV, Duiven (NL)
L-Glutamin	Biochrom, Berlin (DE)
Loading Dye Solution orange (DNA- Ladepuffer)	Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
Magermilchpulver	Oxoid, Hampshire (GB)
Massruler DNA-Ladder Mix	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Methanol	Merck, Darmstadt (DE)
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
MitoSOX™ Red	Life technologies, Darmstadt (DE)
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Narketan	Vetoquinol, Ravensburg (DE)
Natriumazid	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)

---

---

Natriumchlorid-Lösung (physiologisch)	DeltaSelect, Dreireich (DE)
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (DE)
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
NVP-BSK805	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching (DE)
Oligo-(dT)-Primer	Life technologies, Darmstadt (DE)
Page-Ruler (Protein Größenstandard)	ThermoScientific, Dreieich (DE)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin (DE)
Phenol	Roth, Karlsruhe (DE)
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe (DE)
Phosphat gepufferte Saline (PBS), Pulver	Merck, Darmstadt (DE)
Phosphat gepufferte Saline (PBS), Zellkultur	Life technologies, Darmstadt (DE)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
qPCR™ Mastermix No ROX	Eurogentec, Köln (DE)
Q-VD-OPh	Merck, Darmstadt (DE)
Re-Blot Plus (Strong Antibody Stripping Solution)	Merck, Darmstadt (DE)
RNase Zap	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt (DE)
Roti®-Histol (Xylol)	Roth, Karlsruhe (DE)
RPMI 1640 Medium	Life technologies, Darmstadt (DE)
Salzsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
SB 203580	R&D Systems, Minnesota (US)
SP 600125	R&D Systems, Minnesota (US)
Standard für <i>T. gondii</i> Analysen	Diagnostik Institut für Medizinische Mikrobiologie & Krankenhaushygiene, Düsseldorf (DE)
Stopplösung (ELISA)	R&D Systems, Minnesota (US)
Streptavidin-APC-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Streptavidin-PE-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Substratlösung (ELISA)	R&D Systems, Minnesota (US)
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE)	Life technologies, Darmstadt (DE)
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tris	Roth, Karlsruhe (DE)

---

Triton X 100	Biochrom, Berlin (DE)
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tween 20	Merck, Darmstadt (DE)
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt (DE)
Williams E Medium	Biochrom, Berlin (DE)
Xylapan	Vetoquinol, Ravensburg (DE)
YC 137	Merck, Darmstadt (DE)
Ziege-Normal Serum	Dako, Glostrup (DK)
Z-VAD (Ome)-FMK	Merck, Darmstadt (DE)

## 2.4 Primer, Sonden und Plasmide

Alle verwendeten Primer-Paare wurden von der Firma Metabion (Martinsried (DE)) synthetisiert. Die Sonden stammen aus Universal ProbeLibrary der Firma Roche (Mannheim (DE)) oder wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, (DE)) synthetisiert (*T. gondii* Sonde).

### Primer Genotypisierung

PCR	Bezeichnung	Primer (5' → 3')
Jak2fl/fl	Jak2fl-1743-fw	ATT CTG AGA TTC AGG TCT GAG C
	Jak2fl-1743-rv	CTC ACA ACC ATC TGT ATC TCA C
LysMcre	LysMcre mut	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG
	LysMcre com	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC
	LysMcre wt	TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC
Albcre	Albumin-cre sense	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
	Albumin-cre antisense	CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC

### Primer qRT-PCR

Gen	Primer (5' → 3')	Sonde
β-Aktin	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA CGC TCA GGA GGA GCA ATG	# 106
Bcl-2	TGT AGC TTT GCT CCC CTG AC CAC AGT GTT GGC AGG GTG T	# 6
Bax	GTG AGC GGC TGC TTG TCT GGT CCC GAA GTA GGA GAG GA	# 83
Bid	CCC AAA TAG GCG ATG AGA TG CGG CTA GCT GTC TCA CCA GT	# 42
Bim	TCC ACT TGG ATT CAC ACC AC CAG ACA TTG GGT GGA CGA G	# 32
c-FLIP	GCA GAA GCT CTC CCA GCA	# 51

	TTT GTC CAT GAG TTC AAC GTG	
IRF1	GAG CTG GGC CAT TCA CAC TCC ATG TCT TGG GAT CTG G	# 2
IRF7	CTT CAG CAC TTT CTT CCG AGA TGT AGT GTG GTG ACC CTT GC	# 25
p53	ACG CTT CTC CGA AGA CTG G AGG GAG CTC GAG GCT GAT A	# 25
<i>T. gondii</i> B1	GCT AAA GGC GTC ATT GCT GTT GGC GGA ACC AAC GGA AAT	5'-FAM-ATC GCA ACG GAG TTC TTC CCA GAC GT-BBQ-3'
XIAP	GCT TGC AAG AGC TGG ATT TT TGG CTT CCA ATC CGT GAG	# 25

### Plasmide

Name	Eigenschaft	Bezugsquelle
pEF6Jak2-V5	exprimiert ein C-terminales Jak2-V5 Fusionskonstrukt; EF-1 $\alpha$ Promotor	AG Pfeffer, Düsseldorf (DE) (Keil et al., 2014)
pEF6Jak2 $\Delta$ JH1-V5	exprimiert ein C-terminales Jak2 $\Delta$ JH1-V5 Fusionskonstrukt; EF-1 $\alpha$ Promotor	AG Pfeffer, Düsseldorf (DE) (Keil et al., 2014)
pEF6Jak2 $\Delta$ JH1/JH2-V5	exprimiert ein C-terminales Jak2 $\Delta$ JH1/2-V5 Fusionskonstrukt; EF-1 $\alpha$ Promotor	AG Pfeffer, Düsseldorf (DE) (Keil et al., 2014)

## 2.5 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase CLS II	Biochrom, Berlin (DE)
Collagenase Typ VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Collagen-Typ-I	Roche, Mannheim (DE)
DNase I	Roche, Mannheim (DE)
Proteinase K	Roche, Mannheim (DE)
RNase-Out	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Taq-Polymerase	AG Pfeffer Institut für Medizinische Mikrobiologie & Krankenhaushygiene, Düsseldorf (DE)
Trypsin/EDTA 0,25%	Life technologies, Darmstadt (DE)

## 2.6 Zytokine

Zytokin	Bezugsquelle
Flag-FasL	Ingo Schmitz, Braunschweig (Samraj et al., 2006)
TNF (murin)	R&D Systems, Minnesota (US)
TRAIL (human)	Novitec/HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg (Deutschland)
IFN- $\gamma$ (murin)	R&D Systems, Minnesota (US)

## 2.7 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verwendung	Bezugsquelle
Anti- $\beta$ -Aktin	Maus	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Bcl-2	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Bid	Ratte	WB	R&D Systems, Minnesota (US)
Anti-B220-FITC	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-Caspase-3	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Caspase-8	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Cleaved-Caspase-3	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Cleaved-Caspase-8	Maus	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-CD3 $\epsilon$ -PerCP	Hamster	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD4-FITC	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD8-PE-Cy7	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD11b-APC-Cy7	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD11c-APC	Hamster	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD16/32	Ratte	FACS	BioLegend, London (GB)
Anti-CD19-APC	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD19-PerCP	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-CD49b-PE	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-Cytochrom c	Maus	IF	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-ERK	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-GR-1-Biotin	Ratte	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-Jak2	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Maus (IgG2a)-AlexaFluor <sup>®</sup> 488	Ziege	IF	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Anti-Maus (IgG1)-AlexaFluor <sup>®</sup> 488	Ziege	IF	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Anti-Maus-HRP	Pferd	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Na,K-ATPase	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-NK1.1-Biotin	Maus	FACS	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Anti-PARP	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Phospho-Jak2	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)

(Tyr1007/1008) Anti-Phospho-p38- MAPK	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
(Thr180/Tyr182) Anti-Phospho- SAPK/JNK	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
(Thr183/Tyr185) Anti-Phospho-Stat1 (Tyr701)	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Phospho-Stat3 (Tyr705)	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-p38-MAPK	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Rabbit-HRP	Ziege	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Ratte-HRP	Ziege	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-SAPK/JNK	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Stat1	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-Stat3	Kaninchen	WB	Cell Signaling, Boston (US)
Anti-V5	Maus	IF	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, FACS: Durchflusszytometrie

## 2.8 Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BD Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Mouse CXCL-10	R&D Systems, Minnesota (US)
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Mouse IFN- $\gamma$	R&D Systems, Minnesota (US)
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Mouse TNF- $\alpha$	R&D Systems, Minnesota (US)
JetPrime Transfektionsreagenz	Polyplus, New York (US)
M-MLV Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren (DE)
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific, Dreieich (DE)
ProteoExtract <sup>®</sup> Subcellular Proteome Extraction Kit	Merck, Darmstadt (DE)
SuperSignal <sup>™</sup> West Dura Extended Duration Substrate	ThermoScientific, Dreieich (DE)
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden (DE)
Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay	R&D Systems, Minnesota (US)

## 2.9 Medien und Puffer

Medium/Puffer	Bestandteile
FACS-Puffer	1x PBS 2% FCS 2 mM EDTA
DISC-Lyse-Puffer (Proteinlysate)	30 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 10% Glycerol 1% Triton-X-100 2 mM EDTA 10 mM NaF
Eosin-Lösung	180 ml H <sub>2</sub> O 20 ml 0,1% Eosin G 400 µl Eisessig
Hanks Puffer	137 mM NaCl 3 mM KCl 15 mM Hepes 0,33 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,44 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Hanks Puffer I	200 ml Hanks Puffer 2 mM EGTA 0,1% Glucose
Hanks Puffer II	100 ml Hanks Puffer 0,1% Glucose 0,3 mg/ml Collagenase CLS II 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Laemmli-Puffer (5x)	60 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 10% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O pH7; autoklaviert
MOPS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	50 mM MOPS 50mM Tris 1 mM EDTA 0,1% SDS
Nicoletti-Puffer	0,1% Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> 50 µg/ml Propidiumiodid 0,1% Triton-X-100
Organ-Verdaupuffer	93% PBS 6% Collagenase Typ VIII (100 mg/ml) 1% DNase I (300 U/ml)
Stopp-Puffer	1x PBS

	10 mM EDTA
TAE (Elektrophoresepuffer), pH 8	2 M Tris-HCl 1 M Eisessig 0,1 M EDTA
Tail buffer	50 mM Tris-HCl pH 8 100 mM EDTA pH 8 1% SDS 100 mM NaCl
TBS-T	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8 0,1% Tween-20
TE-Puffer	1 M Tris-HCl 0,5 M EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	5% 20x NuPAGE® Transfer Buffer 20% Methanol

## 2.10 Medien für die Zellkultur

Zellen/Zelllinie	Medienbestandteile
murine embryonale Fibroblasten (MEF)	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
primäre murine Hepatozyten	William's Medium E 10% FCS 100 nM Dexamethason 2 mM L-Glutamin % Penicillin/Streptomycin
HT 1080 (2C4 und $\gamma$ 2A)	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 700 $\mu$ g/ml G418
Jurkat A3	RPMI 1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
Set-2	RPMI 1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin

## 2.11 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> TOP10	TOP10 F- mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

## 2.12 Eukaryotische Zellen/Zelllinien

Zellen/Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	Referenz
MEF	Isolierte murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert (SV40 large T antigen)	(Keil et al., 2014)
murine Hepatozyten	Isolierung und Kultivierung aus der Leber adulter Mäuse	(Klingmuller et al., 2006)
HT 1080 (2C4 und γ2A)	Humane Fibrosarkomzellen 2C4: Parentalzelllinie γ2A: Jak2-defiziente Zellen	(Kohlhuber et al., 1997; Watling et al., 1993)
Jurkat A3	Humane T-Lymphomzelllinie	(Schneider et al., 1977)
Set-2	essentielle Thrombozythämie (human) Zellen tragen die Jak2V617F-Mutation	(Quentmeier et al., 2006; Uozumi et al., 2000)

## 2.13 Versuchstiere

Mauslinie	Beschreibung
Jak2 <sup>fl/fl</sup> (Jak2 <sup>fl/fl</sup> )	Mäuse mit <i>loxP</i> -Sequenzen-flankiertem Jak2-Lokus (Krempler et al., 2004)
LysMcre (LysM <sup>cre/+</sup> )	Cre-Rekombinase wird unter dem <i>Lysozym M</i> Promotor exprimiert (Clausen et al., 1999)
Jak2 <sup>fl/fl</sup> LysMcre (Jak2 <sup>fl/fl</sup> x LysM <sup>cre/+</sup> )	Jak2-Knockout in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen
Albcre (+)	Cre-Rekombinase wird unter dem <i>Albumin</i> Promotor exprimiert (Yakar et al., 1999)
Jak2 <sup>fl/fl</sup> Albcre (L-Jak2KO)	Jak2-Knockout in Hepatozyten
IFNGR <sup>-/-</sup>	IFNGR-Knockout Mäuse (Huang et al., 1993)

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in für die Zellkultur behandelten Platten, Flaschen oder Mehrfach-Loch-Platten kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten innerhalb von Sterilbänken mit HEPA-Filtern unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (90%), bei 37 °C und 8% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die adhärenenten Zelllinien (MEFs und HT 1080) wurden alle 2-3 Tage passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Bodenplatte gelöst, die Reaktion mit Medium abgestoppt und nach einer Zentrifugation (5 min, 320 x g, RT) eine adäquate Zellzahl ausgesät.

Suspensionszellen (Jurkat A3 und Set-2) wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen resuspendiert und nach einer Zentrifugation (10 min, 80 x g, RT) in einer adäquaten Zellzahl ausgesät.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde das Cellometer Auto T4 und die dazugehörigen Zählkammern verwendet.

#### 3.1.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Um eukaryotische Zellen langfristig zu lagern, wurden diese kryokonserviert. Dafür wurden 3-5 x 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und bei -80°C über Nacht langsam eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Reaktivierung der konservierten Zellen erfolgte durch zügiges Aufnehmen der Zellen in dem entsprechenden frischen Zellkulturmedium. Nach einer Zentrifugation (5 min, 320 x g, 4 °C) wurden die Zellen in Medium aufgenommen und ausplattiert.

#### 3.1.3 Präparation primärer muriner Hepatozyten

Vor der Präparation der primären murinen Hepatozyten wurden Zellkulturplatten und 6-Loch-Platten mit einer Collagen-I-Lösung für 30 min bei RT beschichtet. Die Collagen-I-Lösung wurde anschließend abgenommen, die beschichteten Platten getrocknet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Isolierung der Hepatozyten aus Kontroll (Jak2fl/fl) und L-Jak2KO (Jak2fl/flxAlbcre) Mäusen erfolgte durch eine 2-Schritt *in situ* Perfusion der Leber. Durch eine *i.p.* Injektion von Xylazin und Ketamin (1 mg/ml; 10 mg/ml in 0,9% NaCl) wurden die Tiere narkotisiert. Nach Eintritt der tiefen Narkose wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Pfortader (*Vena portae*) sowie die Leber freigelegt. Anschließend wurde die Pfortader kanüliert und die

*Vena cava inferior* zur Entlastung durchtrennt. Mittels einer Schlauchpumpe wurde die Leber bei einem Volumenstrom von 8 ml/min mit HANKS-Puffer I für 2-5 min gespült. Um die Hepatozyten aus dem Zellverbund zu lösen, wurde die blutleere Leber mit dem Collagenase-haltigen HANKS-Puffer II für 2-5 min perfundiert. Nun konnte die Leber entnommen und in Williams E Medium überführt werden. Alle weiteren Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Öffnung der Leberkapsel wurden die Hepatozyten vorsichtig ausgeschüttelt und anschließend über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugation-Röhrchen überführt. Nach 3 Waschschrritten mit Williams E Medium (3 min, 50 x g, RT) wurden die isolierten Hepatozyten auf Collagen-I-beschichtete Platten ausgesät. Die toten Zellen wurden nach 3 h Inkubation im Brutschrank durch 3 maliges Überspülen mit PBS entfernt und ü.N. in frischem Medium kultiviert. 3 h vor Stimulation wurde das Medium nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS ersetzt.

### 3.1.4 Induktion von Apoptose

Um Apoptose in den verschiedenen verwendeten Ziellinien zu induzieren, wurden diese der Analyse entsprechend in einer angemessenen Zellzahl ausgesät. Nach 24 h wurde Apoptose durch folgende Liganden und Chemikalien induziert:

Tab. 3.1 Induktion von extrinsischer und intrinsischer Apoptose

Apoptose	Mediatoren	Konzentration
extrinsisch	FasL	20 ng/ml
	TRAIL + CHX	100 ng/ml + 100 ng/ml
	TNF + CHX	20 ng/ml + 100 ng/ml
intrinsisch	Mitomycin C	1 µg/ml
	Thapsigargin	1 µM

### 3.1.5 Behandlung eukaryontischer Zellen mit Inhibitoren

Es wurden verschiedene Inhibitoren verwendet um Jak2-induzierte Signalmechanismen zu blockieren. Weiterhin wurden pan-Caspase-Inhibitoren und Inhibitoren für NF-κB, Bcl-2, JNK und p38 verwendet. Für die verschiedenen Analysen (Nicoletti-Assay oder Western-Blot) wurden Zellen in der entsprechenden Zellzahl ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit folgenden Inhibitoren vorbehandelt und anschließend Apoptose induziert:

Tab. 3.2 Verwendung der verschiedenen Inhibitoren

Inhibition	Inhibitor	Konzentration	Prä-Inkubation
Jak2	NVP-BSK805	500 nM	24 h
	Jak2 Inhibitor V, Z3	1 µM	24 h
Caspasen	Z-VAD(Ome)-FMK	10 µM	30 min
	Q-VD-OPh	10 µM	30 min
NF-κB	BAY 11-7085	5 µM	20 min
Bcl-2	YC 137	1 µM	24 h
p38	SB 203580	1 µM	1 h
JNK	SP 600125	1 µM	1 h

### 3.1.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die transiente Transfektion der verwendeten Plasmide in murine embryonale Fibroblasten (MEFs) erfolgte mittels JET-Prime (Polyplus) anhand der Angaben des Herstellers. Hierfür wurden  $2 \times 10^4$  Zellen auf Gelatine-vorbehandelte Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät und nach 24 Stunden wurde die Transfektion durchgeführt. Hierbei führte die Vorbehandlung der Deckgläschen mittels einer Gelatine-Lösung (2-3 min bei RT) zu einer besseren Haftung der Zellen auf den Deckgläschen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit den jeweiligen Liganden oder Reagenzien stimuliert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

### 3.1.7 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation von Jak2 nach Induktion des Todesrezeptorsignalweges und die Morphologie der Mitochondrien zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden bereits transient transfizierte MEFs (siehe Abschnitt 3.1.5) eingesetzt (Jak2-Lokalisationsstudien) oder  $3 \times 10^4$  MEFs pro ml auf ein Gelatine-vorbehandeltes Deckgläschen einer 24-Loch-Platte ausgesät (Untersuchung Morphologie der Mitochondrien). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter leichtem Schwenken der 24-Loch-Platten.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen (5 min, RT). Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mittels einer Formaldehyd-haltigen Lösung (4% Formaldehyd, 2% Sucrose in PBS) für 10 min bei RT. Nach zwei weiteren Waschschritten (PBS, 5 min, RT) wurden die Zellen für 10 min bei RT durch die Verwendung einer Triton-X-100-haltigen Lösung (0,1% Triton-X-100 in PBS) permeabilisiert. Danach wurde dreimal mit PBS für 5 min bei RT gewaschen und die Präparate für 1 Stunde (RT) oder ü.N. (4 °C) blockiert (2% Ziegen Serum in PBS). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (1:200; in Blockpuffer) ü.N. bei 4 °C. Nach 3 Waschschritten mit PBS (5 min, RT) folgte die Inkubation der Präparate mit einem Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:500; in Blockpuffer; 1 h, RT) im Dunkeln. Im Anschluss wurde dreimal mit PBS für 5 min bei RT gewaschen (abgedunkelt) und die Nuklei mittels einer DAPI-Lösung angefärbt (1:5000 in PBS; 3 min, RT, im Dunkeln). Nach einem weiteren Waschschriff (PBS, 5 min, RT) wurden die Präparate mit der Hilfe von Fluoromount G auf einem Objektträger eingedeckt. Nach 24 h bei 4 °C konnten die angefärbten Präparate mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM) ausgewertet werden.

### 3.1.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials durch Fluoreszenzmikroskopie

Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) konnten Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials von Zellen mit einem intakten mitochondrialen Membranpotenzial unterschieden werden (Bunting, 1992). TMRE akkumuliert in Zellen mit intaktem Membranpotenzial und zeigt eine Verschiebung des Emissionsmaximums in den längerwelligen Bereich (Bunting, 1992). Dagegen zeigen Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials eine geringere oder teilweise vollständige Abnahme der Fluoreszenzintensität (Bunting, 1992).

Für die Färbung mit TMRE wurden  $3 \times 10^4$  MEFs pro ml auf ein Gelatine-vorbehandeltes Deckgläschen einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit FasL (1 h) oder FCCP (20  $\mu$ M; 5 min) behandelt und anschließend folgte die Färbung mit TMRE (25  $\mu$ M in Medium) für 30 min im Brutschrank. Darauf wurden die Zellen kurz in PBS vorsichtig geschwenkt, mit Fluoromount G auf einem Objektträger eingedeckt und sofort mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert.

### 3.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence-activated-cell-sorter) können Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und nach einer Fluoreszenzmarkierung von extrazellulären und intrazellulären Proteinen quantitativ bestimmt und unterschieden werden. Hierzu werden die Zellen innerhalb eines Flüssigkeitsstroms an einem Laserstrahl mit entsprechender Wellenlänge vorbeigeleitet und einzeln erfasst. Über die hierdurch nach vorne abgelenkten Strahlen (Forwardscatter) wird die Größe der Zellen ermittelt, wohingegen über seitwärts gestreute Strahlen (Sidescatter) die Granularität der Zelle bestimmt wird. Durch die Anregung der Fluorophore der Fluoreszenzmarkierten intrazellulären oder extrazellulären Proteine und deren unterschiedlichen Emissionsspektren können Zellpopulationen voneinander unterschieden und die Anzahl der Zellen bestimmt werden. Für alle FACS-Analysen wurde ein FACSCanto™ II von BD Biosciences verwendet.

#### 3.2.1 Bestimmung von Apoptose nach Nicoletti

Die Methode nach Nicoletti *et al.* ermöglicht die quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen einer Zellpopulation (Nicoletti *et al.*, 1991). Durch die Verwendung eines Propidiumiodid-haltigen hypotonen Puffers wird die Zellmembran der Zellen aufgebrochen (Nicoletti *et al.*, 1991). Dies ermöglicht Propidiumiodid in die DNA der verbliebenen Nuklei zu interkalieren (Nicoletti *et al.*, 1991). Die Nuklei apoptotischer Zellen können anschließend im Durchflusszytometer anhand ihrer DNA Fragmentation, die durch einen breiten hypodiploiden Höchstwert (Sub-G1-Peak) gekennzeichnet ist, identifiziert werden.

Um die Apoptoserate innerhalb einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen auf 12-Loch-Platten ausgesät und Apoptose induziert (s. Abschnitt 3.1.4). Dem folgend wurden die Zellen abgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 500 x *g*, RT). Nach einem Waschschrift mit 2 ml PBS und einer erneuten Zentrifugation (5 min, 500 x *g*, RT) wurde das Zellpellet in 250  $\mu$ l Nicoletti-Puffer (s. Abschnitt 2.9) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Proben sofort im FACSCanto™ II gemessen.

#### 3.2.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Durch eine Färbung von Zellen mit TMRE (s. Abschnitt 3.1.8) und anschließender Analyse der Zellpopulationen im Durchflusszytometer konnten ebenfalls Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials quantitativ bestimmt werden.

Um die Anzahl von Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials innerhalb einer Population zu bestimmen, wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen auf 12-Loch-Platten ausgesät und Apoptose induziert (s. Abschnitt 3.1.4). Zusätzlich wurden die Zellen mit FCCP als Positiv-Kontrolle behandelt (s. Abschnitt 3.1.8). Anschließend wurden die Zellen mit TMRE (25  $\mu$ M in Medium) für 30 min im Brutschrank angefärbt. Dem folgend wurden die Zellen abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Nachdem die Zellen in 2 ml PBS gewaschen und zentrifugiert wurden (5 min, 500 x g, RT), wurden die Proben in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen und sofort im FACSCanto™ II gemessen.

### 3.2.3 Messung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (mROS)

Um die Generierung von mROS während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde mROS der Zellen mit Hilfe des MitoSOX™ Farbstoffes angefärbt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Für die Färbung der Zellen mit MitoSOX™ wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät und Apoptose induziert (s. Abschnitt 3.1.4). Anschließend wurde MitoSOX™ in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M (in Medium) für die Färbung eingesetzt und die Zellen bei 37°C im Brutschrank für 30 min inkubiert. Nach der Überführung in FACS-Röhrchen und einem Waschschrift mit 2 ml PBS (5 min, 500 x g, RT) wurden die Proben sofort im FACSCanto™ II gemessen.

### 3.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmarkern

Für die FACS-Analyse immunologischer Zellpopulationen wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entsprechend Abschnitt 3.7.7.2 aufbereitet. Es wurden zwischen  $2-5 \times 10^6$  Zellen pro Färbung eingesetzt und durch einen Gaze-Filter in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Fc-Rezeptoren mit Hilfe einer CD16/CD32 Antikörper-Lösung blockiert (1:100 in FACS-Puffer, 10 min, 4 °C). Darauf wurden die Proben mit einem Gemisch bestehend aus Fluorophor- oder Biotin-gekoppelten Antikörpern für 10 min bei 4 °C inkubiert (Verdünnung Antikörper: 1:100 in FACS-Puffer). Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer und ggf. für die Färbung mit Biotin-gekoppelten Antikörpern eine Inkubation mit einem Gemisch aus Fluorophor-markiertem Streptavidin (1:300 in FACS-Puffer; 10 min 4 °C). Nach erneutem Waschen in 2 ml PBS und einem Zentrifugationsschrift (5 min, 320 x g, 4 °C) wurden die Zellpellets in einer DAPI-Lösung (1:200 in FACS-Puffer) aufgenommen, um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Schließlich konnten die Proben im FACSCanto™ II gemessen werden.

## 3.3 Histologische Analysen

Um pathologische Veränderungen von verschiedenen Organen der Versuchstiere zu untersuchen, wurden diese histologischen Analysen unterzogen.

### **3.3.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Nach Entnahme von Milz, Leber, inguinalen Lymphknoten oder Gehirn aus den Versuchstieren (s. Abschnitt 3.7.2) wurden diese in Kryomolds mit einem Einbettmedium (TissueTek) auf Trockeneis langsam gefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Giemsa-Färbung (s. Abschnitt 3.3.4) wurden die entnommenen Gehirne in 4% Paraformaldehyd ü.N. bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Gehirne 3 mal mit PBS für jeweils 10 min gewaschen. Zur Kryoprotektion folgte eine Inkubation der Gehirne in einer 30%igen Sucrose-Lösung (in PBS) ü.N. bei 4 °C. Nach vorsichtigem Abtupfen wurden die Gehirne in Kryomolds mit Einbettmedium langsam auf Trockeneis gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Anfertigung der 8 µM dicken Organschnitte erfolgte mittels eines Kryotoms (ThermoFisher). Die Schnitte wurden bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

### **3.3.2 TUNEL-Färbung („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“)**

Für den Nachweis von apoptotischen Zellen in den Organen wurde eine TUNEL-Färbung angewendet. Hierbei wird die für Apoptose charakteristische fragmentierte DNA angefärbt. Die Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Bindung von Peroxidase-gekoppelten Nukleotiden an freie OH-Gruppen der Doppel- oder Einzelstrangbrüche, welche nach Zugabe eines Substrates visualisiert werden können (Gavrieli et al., 1992).

Die TUNEL-Färbung wurde mit Hilfe des In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.3.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde verwendet, um morphologische und strukturelle Veränderungen der verschiedenen Organe zu untersuchen. Hierbei färbt Hämatoxylin basophile Strukturen wie die Zellkerne blau. Dagegen werden durch eine Färbung mit Eosin azidophile Bestandteile von Zellen, vor allem Bestandteile des Zytosols und kollagenhaltige Strukturen, rötlich gefärbt.

Alle Schritte der HE-Färbung erfolgten bei RT. Für die HE-Färbung wurden die aufgetauten Gefrierschnitte (s. Abschnitt 3.3.2) für 10 min in eiskaltem Aceton (-20 °C) fixiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach der Färbung mit einer Hämatoxylin-Lösung für 10 min wurden die Präparate in einer Lösung aus 70% Ethanol mit 1% HCl differenziert und anschließend für mindestens 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgte die Färbung mit einer Eosin-haltigen Lösung für 15 min und eine Differenzierung der Färbung in H<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die gefärbten Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (2 x 2 min 70%; 1 x 2 min 96%; 2 x 2 min 100%) und nach einer 5 minütigen Inkubation in Xylol mit Entellan eingedeckt. Nachdem die Präparate ü.N. abgedampft waren, konnten die Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikroskops analysiert und photographisch dokumentiert werden.

### 3.3.4 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung wurde als alternative Färbemethode für die Gehirne angewendet. Hierbei färbt die Azur Eosin-Methylenblau Lösung die Zellkerne blau und azidophile Bestandteile Orange bis Rot.

Alle folgenden Schritte der Färbeprozedur erfolgten bei RT. Für die Giemsa-Färbung wurden die Gehirnschnitte für 5 min in eiskaltem Methanol fixiert. Auf einen Waschschrift mit H<sub>2</sub>O folgte die Färbung mit der Giemsa-Lösung (1:25 in H<sub>2</sub>O) ü.N.. Anschließend wurde mit einer Lösung aus 95%igem Ethanol und 0,5%iger Essigsäure differenziert. Nachdem die Präparate für 2 min in 100% Ethanol entwässert wurden, erfolgte eine 5 minütige Inkubation in Xylol. Schließlich konnten die Schnitte mit Entellan eingedeckt werden. Nachdem die Präparate ü.N. abgedampft waren, konnten die Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikroskops analysiert und photographisch dokumentiert werden.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Isolierung von DNA aus Gewebeproben

Um die Parasiten-Last in den verschiedenen Organen zu bestimmen, wurde zunächst die DNA aus den entnommenen Gewebeproben (s. Abschnitt 3.7.2) isoliert. Dafür wurden 50-300 mg Organ in einem Reaktionsgefäß mit 650 µl tail-buffer (Lysepuffer) und 35 µl Proteinase K versehen. Nach der Homogenisierung der Gewebe mit Hilfe eines Pistills wurden die Proben ü.N. bei 55 °C schüttelnd (600 rpm) verdaut. Durch mehrmaliges Vortexen der Proben wurde sichergestellt, dass das Gewebe komplett verdaut war. Anschließend wurde 600 µl Phenol zu den Proben pipettiert, gut vermischt und für 10 min bei 14000 x g zentrifugiert (RT). Die entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Phenol/Chloroform durch Vortexen gut gemischt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 14000 x g, RT) wurde die obere Phase erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Chloroform gut homogenisiert und die Proben zentrifugiert (10 min, 14000 x g, RT). Zu dem Überstand (neues Reaktionsgefäß) wurde das 0,7 x Volumen an Isopropanol pipettiert und das Reaktionsgefäß bis zu der Fällung der DNA invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 x g, RT) wurde der Überstand vollständig entfernt und die pelletierte DNA mit 200 µl Ethanol (70%) gewaschen (5 min, 14000 x g, RT). Der Ethanol-haltige Überstand wurde vollständig entfernt und die DNA-Pellets getrocknet. Die getrocknete, pelletierte DNA wurde in 50-200 µl TE-Puffer aufgenommen und nach dem Lösen der DNA bei 4 °C gelagert.

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien (1-3 mm) isoliert. Hierfür wurden die Biopsien mit 500 µl tail-buffer und 7,5 µl Proteinase K bei 55 °C schüttelnd (600 rpm) ü.N. verdaut. Durch mehrmaliges vortexen der Proben wurde sichergestellt, dass die Biopsien vollständig verdaut waren. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14000 x g zentrifugiert (RT). Zu dem Überstand (neues Reaktionsgefäß) wurde 500 µl Isopropanol pipettiert und das Reaktionsgefäß bis zu der Fällung der DNA invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 x g, RT) wurde der Überstand vollständig entfernt und die pelletierte DNA mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen (5 min, 14000 x g, RT). Der Ethanol-haltige Überstand wurde

vollständig entfernt und die DNA-Pellets getrocknet. Die getrocknete, pelletierte DNA wurde in 30-100 µl TE-Puffer aufgenommen, gelöst und bei 4 °C gelagert.

### 3.4.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Isolierung der RNA basiert auf dem Prinzip der Guanidiniumthiocyanat-Methode und einer anschließenden Reinigung der Nukleinsäuren über eine Silica-Membran.

### 3.4.3 cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA

Im Verlauf der cDNA-Synthese wird die isolierte mRNA (s. Abschnitt 3.4.2) mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase in DNA umgeschrieben.

Für die Synthese der cDNA wurde folgender Ansatz verwendet:

---

3 µg RNA in 10 µl RNase freiem H <sub>2</sub> O	
+ 1 µl Oligo-dT-Primer (10 µM, Invitrogen)	
<hr/>	
2 min bei 70 °C im Heizblock, dann auf Eis abkühlen	
<hr/>	
+ 9 µl Master-Mix:	4 µl 5 x First-Strand-Buffer (Invitrogen)
	2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
	1 µl 10 mM dNTP Mix
	1 µl RNaseOut (Invitrogen)
	1 µl M-MLV RT (Invitrogen)
<hr/>	
1 h bei 37 °C im Heizblock inkubieren	
<hr/>	
5 min bei 95 °C im Heizblock Reaktion inaktivieren	
<hr/>	
+ 80 µl H <sub>2</sub> O (DNase, RNase frei)	

---

### 3.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt. Hierbei werden definierte Bereiche der genomischen DNA amplifiziert, die sich innerhalb der verschiedenen Genotypen unterscheiden, und anhand des entstandenen Produktes kann der Genotyp der Mäuse bestimmt werden.

Es wurden folgende PCRs zur Genotypisierung durchgeführt:

Genotypisierung:	Jak2fl/fl
<b>PCR-Master-Mix (1x):</b>	5 µl 20 mM MgCl <sub>2</sub> -Puffer
	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 50 pMol Jak2fl-1743-fw
	1 µl 50 pMol Jak2fl-1743-rv
	2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
	1 µl genomische DNA
	39 µl H <sub>2</sub> O

---

<b>PCR-Programm:</b>	95 °C	5 min	
	95 °C	1 min	
	55 °C	30 sec	30 x
	72 °C	30 sec	
	72 °C	2 min	
	4 °C	∞	

<b>Genotypisierung:</b>	<b>LysMcre</b>
-------------------------	----------------

<b>PCR-Master-Mix (1x):</b>	<b>Wildtyp-PCR</b>	<b>Knock-In-PCR</b>
	5 µl 20 mM MgCl <sub>2</sub> -Puffer	5 µl 20 mM MgCl <sub>2</sub> -Puffer
	1 µl 10 mM dNTPs	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 10 pMol LysMcre com	1 µl 10 pMol LysMcre com
	1 µl 10 pMol LysM wt	1 µl 10 pMol LysM mut
	2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)	2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
	1 µl genomische DNA	1 µl genomische DNA
	39 µl H <sub>2</sub> O	39 µl H <sub>2</sub> O

<b>PCR-Programm:</b>	95 °C	3 min	
	95 °C	1 min	
	55 °C	1 min	35 x
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

<b>Genotypisierung:</b>	<b>Albcre</b>
-------------------------	---------------

<b>PCR-Master-Mix (1x):</b>	5 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Puffer
	1 µl 10 mM dNTPs
	1 µl 10 pMol Albcre s
	1 µl 10 pMol Albcre as
	2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
	1 µl genomische DNA
	39 µl H <sub>2</sub> O

<b>PCR-Programm:</b>	95 °C	3 min	
	95 °C	30 sec	
	55 °C	30 sec	30 x
	72 °C	30 sec	
	72 °C	3 min	
	4 °C	∞	

Nach Beendigung der PCR wurden die einzelnen Reaktionen mit einem 5 x DNA-Ladepuffer versehen und jeweils 30-40 µl in die Taschen eines 2%igen Agarosegels (+ 1 µg/ml Ethidiumbromid) pipettiert. Anschließend wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe der Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Durch ein Geldokumentationssystem (UV-Beleuchtung) wurden die einzelnen DNA-Banden anhand eines mitgeführten DNA-Größenstandards (MassRuler™) identifiziert.

### 3.4.5 quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt die Amplifikation von DNA und zugleich dessen Quantifizierung. Durch die Verwendung von Gen-spezifischen Fluoreszenz-markierten (FAM) Sonden, bei denen das Fluorophor zunächst gequencht vorliegt, werden Fluorophore während der Amplifikation freigesetzt (Quencher wird abgebaut) und erfasst. Da die Fluoreszenz proportional zu der amplifizierten DNA zunimmt, kann so die Transkriptionsmenge (siehe auch Abschnitt 3.4.3) quantitativ erfasst werden.

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte nach folgendem Ansatz:

<b>PCR-Master-Mix (1x):</b>	12,5 µl qPCR Mastermix-NoROX (Eurogentec)	
	0,3 µl Primer fw (20µM)	
	0,3 µl Primer rv (20µM)	
	0,5 µl Sonde (10 µM)	
	6,4 µl H <sub>2</sub> O	
	5 µl cDNA (s. Abschnitt 3.4.3)	
<b>PCR-Programm:</b>	95 °C	7 min
	94 °C	20 sec
	60 °C	1 min
	22 °C	∞
		40 x

Die anschließende Auswertung der PCR erfolgte nach der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001). Hierbei wurden die Transkriptionsmengen der untersuchten Gene anhand eines Referenzgens ( $\beta$ -Aktin) analysiert.

### 3.4.6 quantitative-PCR zur Analyse der *T. gondii*-Last

Die Methode der qPCR wurde zur Analyse der Parasiten-Last innerhalb der verschiedenen entnommenen Organe eingesetzt. Hierbei wird das *T. gondii*-spezifische *b1* Gen amplifiziert. Durch das Mitführen eines Standards, der aus einer definierten Menge an Parasiten besteht, können somit Rückschlüsse auf die Last der Parasiten in den einzelnen Organen getroffen werden (Burg et al., 1989).

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte nach folgendem Ansatz:

<b>PCR-Master-Mix (1x):</b>	12,5 µl qPCR Mastermix-NoROX (Eurogentec)	
	0,3 µl Primer fw (20 µM)	
	0,3 µl Primer rv (20 µM)	
	0,5 µl Sonde (20 µM)	
	10,4 µl H <sub>2</sub> O	
	1 µl genomische DNA (s. Abschnitt 3.4.1)	
<b>PCR-Programm:</b>	95 °C	7 min
	94 °C	20 sec
	60 °C	1 min
	22 °C	∞
		40 x

Die Auswertung der PCR erfolgte mit Hilfe der iQ5-Software.

### 3.4.7 Transformation von *E. coli* Top10

Um die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide zu vervielfältigen, wurden diese zunächst in *E. coli* Top10 (Invitrogen) transformiert. Hierbei kann die Plasmid-DNA durch einen Hitzeschock in die CaCl<sub>2</sub>-behandelten chemokompetenten Bakterien eingebracht werden (Cohen et al., 1972).

Für die Transformation wurde jeweils 1 Röhrchen *E. coli* Top10 auf Eis aufgetaut und 1 µg Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C. Nachdem die transformierten Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt wurden, wurde 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1h bei 37 °C schüttelnd (700 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C unter Selektionsdruck kultiviert.

### 3.4.8 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung wurde 2 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie der ü.N. inkubierten Bakterien-Platten (s. Abschnitt 3.4.7) angeimpft. Nach 6-7 stündiger Inkubation bei 37 °C (schüttelnd) wurde die 2 ml Bakterienkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium (+ Ampicillin) überführt. Es folgte eine weitere Inkubation ü.N. bei 37 °C (schüttelnd). Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Maxi-Kits von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 3.5 Proteinanalytische Methoden

### 3.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Zur Analyse von Proteinen wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und Apoptose induziert (s. Abschnitt 3.1.4). Es folgte die Ernte der Zellen und die Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS sowie einer Zentrifugation (5 min, 380 x g, 4 °C) wurden das Zellpellet in 50-100 µl DISC-Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Protein-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration der Proteine durch einen BCA-Assay (s. Abschnitt 3.5.4) bestimmt. Nach Zugabe von 5 x Laemmli-Puffer wurden die hergestellten Proteinlysate unter denaturierenden Bedingungen bei 95 °C aufgekocht. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.5.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Organen

Zur Analyse von Proteinen aus Organen wurde der „Precellys homogeniser“ verwendet. Hierfür wurde 100-200 mg Organ in ein Homogenisations-Gefäß überführt. Anschließend wurde die 3-fache Menge an PBS zugegeben und die Organe bei 5000 Schüttelbewegungen pro Minute für 20 sec homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden anschließend in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit 0,1% Triton in PBS (+ Proteinase-Inhibitor-Tablette/10 ml) auf 2 ml aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 30

min bei 4 °C (schwenkend). Die Proben wurden nun für 15 min bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Protein-haltige Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Konzentration der Proteine durch einen BCA-Assay (s. Abschnitt 3.5.4) bestimmt. Nach Zugabe von 5 x Laemmli-Puffer wurden die hergestellten Proteinlysate unter denaturierenden Bedingungen bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

### **3.5.3 Fraktionierte Zellyse**

Die fraktionierte Lyse von Zellen erlaubt die Isolierung von Proteinen in ihren verschiedenen Fraktionen (Membran, Zytosol, Zytoskellekt und Nukleus). Das Prinzip basiert auf der Löslichkeit der subzellulären Kompartimente in verschiedenen Puffer-Systemen.

Für die fraktionierte Zellyse wurden  $2 \times 10^6$  Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät und anschließend Apoptose durch FasL induziert (s. Abschnitt 3.1.4). Die nachfolgende Lyse der Zellen wurde mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde durch einen BCA-Assay (s. Abschnitt 3.5.4) bestimmt. Die isolierten Fraktionen wurden nach Zugabe von 5 x Laemmli-Puffer unter denaturierenden Bedingungen bei 95 °C aufgeköcht und bei -20 °C gelagert.

### **3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay**

Die Proteinkonzentrationen der hergestellten Proteinlysate wurden über einen BCA (Bicinchoninsäure)-Test kolorimetrisch bestimmt (Smith et al., 1985). Der Nachweis der Proteine beruht auf der Biuret-Reaktion. Durch die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  binden die reduzierten Kupferatome an zwei Moleküle BCA und bilden einen Farbstoffkomplex aus. Der Farbumschlag kann durch eine photometrische Messung bei 562 nm (Absorptionsmaximum) ermittelt werden. Hierbei erlaubt ein mitgeführter Protein-Standard die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand einer erstellten Eichkurve.

Der BCA-Test wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (ThermoScientific) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine der angefertigten Lysate erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Durch die Komplexbildung von SDS und den Proteinen wird die Eigenladung der Proteine von der negativen Ladung des SDS überdeckt. Innerhalb eines diskontinuierlichen Gelsystems ermöglicht so die Anlegung einer Spannung die Wanderung der negativen SDS-Protein-Komplexe in Richtung der Anode. Die Auftrennung der Proteine erfolgt anhand ihres Molekulargewichtes. Durch einen mitgeführten Größenstandard können die Proteine anschließend identifiziert werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden 4-12%ige Bis-Tris-Gradientengele (Invitrogen) verwendet. Es wurden 40 oder 80 µg der Proteinproben in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 120-170 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretische

Auftrennung erfolgte solange, bis das Bromphenolblau des Ladepuffers (Laemmli-Puffer) die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

### 3.5.6 Western-Blot

Der Übertrag der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran ermöglicht den genauen Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.

Im Anschluss an die durchgeführte SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.5.5) wurden die Proteine innerhalb einer Semi-Dry-Proteintransferkammer auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, GE Healthcare) übertragen. Zunächst wurden zugeschnittene Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in Transferpuffer getränkt. Schließlich folgte der Aufbau innerhalb der Semi-Dry-Proteintransferkammer. Auf drei Filterpapiere wurde die Membran aus Nitrozellulose gelegt. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde direkt auf die Membran platziert und eine weitere Lage aus drei Filterpapieren bildete den Abschluss. Nachdem entstandene Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt wurden, erfolgte der Transfer der Proteine für 2 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> pro Gel.

Anschließend an das Blot-Verfahren wurde die Membran mit den nun übertragenen Proteinen für 1 h bei RT in TBS-T mit 5% Magermilchpulver blockiert. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primär-Antikörper (in TBS-T + 3% BSA) bei 4 °C ü.N.. Durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T für jeweils 10 min wurde überschüssiger und nicht gebundener Primär-Antikörper entfernt. Es folgte die Inkubation mit einem HRP (Horse-Raddish-Peroxidase)-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 1h bei RT. Abermals wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des ECL (enhanced chemoluminescence)-Systems SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher). Die in dem Kit enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert und für 1-2 min inkubiert. Die erzeugte Chemolumineszenz wurde durch das Auflegen von Röntgenfilmen (ECL Hyperfilm, GE Healthcare) festgehalten und die Filme anschließend durch die Verwendung einer Entwicklermaschine entwickelt. Für den Nachweis der verschiedenen Proteine wurden die Röntgenfilme unterschiedlich lange aufgelegt. Die detektierten Protein-Banden konnten durch den mitgeführten Größenstandard analysiert und identifiziert werden. Um weitere auf die Membran übertragene Proteine zu detektieren, wurden die gebundenen Antikörper auf der Membran durch die Verwendung der Re-Blot-Plus Lösung (Merck-Millipore) gelöst. Die genaue Prozedur erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 3.5.7 Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA)

Der Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) wurde verwendet, um Zytokine innerhalb des Serums der untersuchten Tiere nachzuweisen. Bei dem verwendeten Test-Prinzip des Sandwich-ELISA werden Zytokin-spezifische Antikörper auf 96-Loch-Platten aufgebracht und binden an die Plattenoberfläche. Anschließend werden die zu analysierenden Proben dazugegeben und die Zytokine in den Proben binden an die Platten-gebundenen spezifischen Antikörper. Dann wird ein Biotin-gekoppelter Antikörper verwendet, der wiederum nach Bindung an das spezifische Zytokin immobilisiert wird. Ein Streptavidin-HRP Konjugat bindet an den biotinylierten Antikörper und die konjugierte Peroxidase katalysiert die enzymatische Umsetzung nach Zugabe eines Substrates. Der

entstandene Farbumschlag kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Da die Farbtintensität proportional zu der Menge der gebundenen Zytokine steigt, können die untersuchten Zytokine anhand eines mitgeführten Standards quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISAs für den Nachweis von murinem IFN- $\gamma$ , TNF und CXCL-10 (alle: R&D Systems) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **3.6 Nachweis von RNI (reactive nitrogen intermediates)-Metaboliten**

Der Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay (R&D Systems) detektiert die RNI-Metabolite Nitrat und Nitrit über ein Zwei-Stufen-System. In einem ersten Schritt wird das in den Proben enthaltene Nitrat durch die Nitrat-Reduktase zu Nitrit enzymatisch umgesetzt. Das endogene Nitrit sowie das konvertierte Nitrit werden in einem zweiten Schritt durch die Griess-Reaktion kolorimetrisch detektiert. Der entstandene Farbumschlag kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Die gemeinsame Konzentration von Nitrat und Nitrit wird anschließend anhand einer Eichkurve (erstellt durch einen mitgeführten Standard) bestimmt.

Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

### **3.7 Tierversuche**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten mit der nach § 8 Tierschutzgesetz erforderlichen Genehmigung durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf. Die Tiere wurden unter sterilen und standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) gehalten. (Aktenzeichen: 84-02.05.40.13.131, 84-02.04.2014.A247)

#### **3.7.1 Infektion mit *Toxoplasma gondii* Zysten**

Für die Infektion mit *T. gondii* (Stamm ME49) wurden Zysten aus den Gehirnen von latent infizierten CD1-Mäusen isoliert. Hierfür wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn entnommen. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS, wurde das Gehirn in 5 ml PBS mit Hilfe einer Schere grob zerkleinert. Das zerkleinerte Gehirn wurde durch die Verwendung von sukzessiv kleiner werdenden Kanülen (18, 20, 22 Gauge) weiter homogenisiert. Nach einer vollständigen Homogenisierung wurde das Gehirnlysat in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 800 x g, RT). Es folgte eine Resuspension des Pellets in 15 ml PBS sowie die Unterschichtung des Lysats mit 10 ml Ficoll. Die Proben wurden anschließend für 25 min bei 1000 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Das sichtbare Zysten-enthaltene Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen (15min, 1000 x g, RT) und schließlich in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die isolierten Zysten wurden unter dem Mikroskop gezählt. Die für die Infektion gewünschte Anzahl an Zysten wurde in eine 24-Loch-Platte überführt und die in den Zysten enthaltenen Bradyzoiten durch die Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung freigesetzt. Nachdem die Reaktion mit FCS abgestoppt wurde, erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS (15 min, 1000 x g, RT). Schließlich wurden das Pellet in der entsprechenden Menge an PBS aufgenommen und die Mäuse mit 20 Zysten pro 200  $\mu$ l PBS *i.p.* infiziert.

Der Zustand der Tiere wurde täglich während des Versuches überprüft und bei schweren Krankheitssymptomen wurden die Tiere schmerzfrei getötet.

### **3.7.2 Entnahme von Versuchsmaterial**

Die Entnahme von Versuchsmaterial erfolgte nach dem Töten der Tiere durch Entbluten über die *Vena cava inferior*. Das Entbluten erfolgte unter einer tiefen Narkose durch die Injektion (*i.p.*) von Ketamin und Xylazin (Ketamin 100 mg/kg; Xylazin 5 mg/kg).

Aus dem über die *Vena cava inferior* entnommenen Vollblut wurde anschließend Serum aufbereitet (s. Abschnitt 3.7.2.1).

Zusätzlich zu Serum wurden verschiedene Organe zur weiteren Analyse entnommen. Für die FACS-Analyse wurden Milz und inguinale Lymphknoten weiter aufbereitet (s. 3.7.2.2). Leber, Lunge, Milz und Gehirn wurden für eine Isolation von DNA (s. Abschnitt 3.4.1) und eine anschließende Bestimmung der Parasiten-Last (s. Abschnitt 3.4.6) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde Gehirn, Leber, Milz und inguinale Lymphknoten entnommen und nach Abschnitt 3.3 eingebettet und gelagert.

#### **3.7.2.1 Aufbereitung von Serum**

Für die Aufbereitung des Serums wurde das entnommene Vollblut (s. Abschnitt 3.7.2) zunächst bei 8000 x *g* für 10 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 8000 x *g* für 10 min und RT zentrifugiert. Das gewonnene Serum (Überstand) wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.7.2.2 Aufbereitung der Organe für die FACS-Analyse**

Für die FACS-Analyse wurden Milz und inguinale Lymphknoten in 6-Loch-Platten mit PBS überführt und bis zum Kollagenase-Verdau auf Eis gelagert. Nach der Überführung der Organe in 6-Loch-Platten in denen bereits 2-3 ml des kollagenhaltigen Verdau-Puffers vorgelegt waren, wurden die Organe mit Hilfe zweier Pinzetten zerkleinert. Anschließend wurden die Organe für 30 min bei 37 °C verdaut und mit einer 5 ml Pipette vollständig homogenisiert. Durch die Zugabe von 5 ml Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet und die Suspension durch die Verwendung eines 70 µm Zellsiebes in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 320 x *g* und 4 °C wurden die Erythrozyten der Milzproben lysiert. Hierfür wurden 3 ml Erylyse-Puffer zu den Proben gegeben und für 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml FACS-Puffer abgestoppt und die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 320 x *g*, 4 °C). Die isolierten Zellen wurden in 5-10 ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde eine Färbung der Oberflächenmarker durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.4)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der Funktion von Jak2 während des programmierten Zelltodes (Apoptose)

Die gezielte Einleitung von Zelltod (Apoptose) ist sowohl ein essentieller als auch ein regulierender Bestandteil während der Entwicklung und der Homöostase adulter Gewebe (Favaloro et al., 2012; Knight and Melino, 2011). Eine Dys- oder Fehlregulation von Apoptose führt zu einer anhaltenden Proliferation und somit zur Entstehung maligner Zellen (Favaloro et al., 2012; Kerr et al., 1994; Knight and Melino, 2011). Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass eine Dysregulation und konstitutive Aktivierung der Janus Kinase 2 (Jak2) für die Entwicklung myeloproliferativer Neoplasien verantwortlich ist (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Levine et al., 2005). Eine Analyse, welche Signalwege der Apoptose von Jak2 beeinflusst werden, ist daher essentiell um Jak2-vermittelte Signale in malignen Zellen aufzuklären.

#### 4.1.1 Untersuchung des Einflusses von Jak2 auf den Fas-vermittelten Signalweg der Apoptose

Fas (CD95/APO1) ist ein Todesrezeptor der TNFR (Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor) Superfamilie, der nach Bindung und Aktivierung durch seinen spezifischen Todesliganden (FasL) für die Induktion von Apoptose in Zielzellen verantwortlich ist (Itoh et al., 1991; Nagata, 1997; Oehm et al., 1992; Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989). Die Identifizierung der beteiligten Faktoren, ebenso wie deren Interaktionen, ist von großem Interesse. Trotz der zahlreichen Untersuchungen und Publikationen ist eine Funktion von Jak2 innerhalb des Fas-induzierten Signalweges bisher unbekannt.

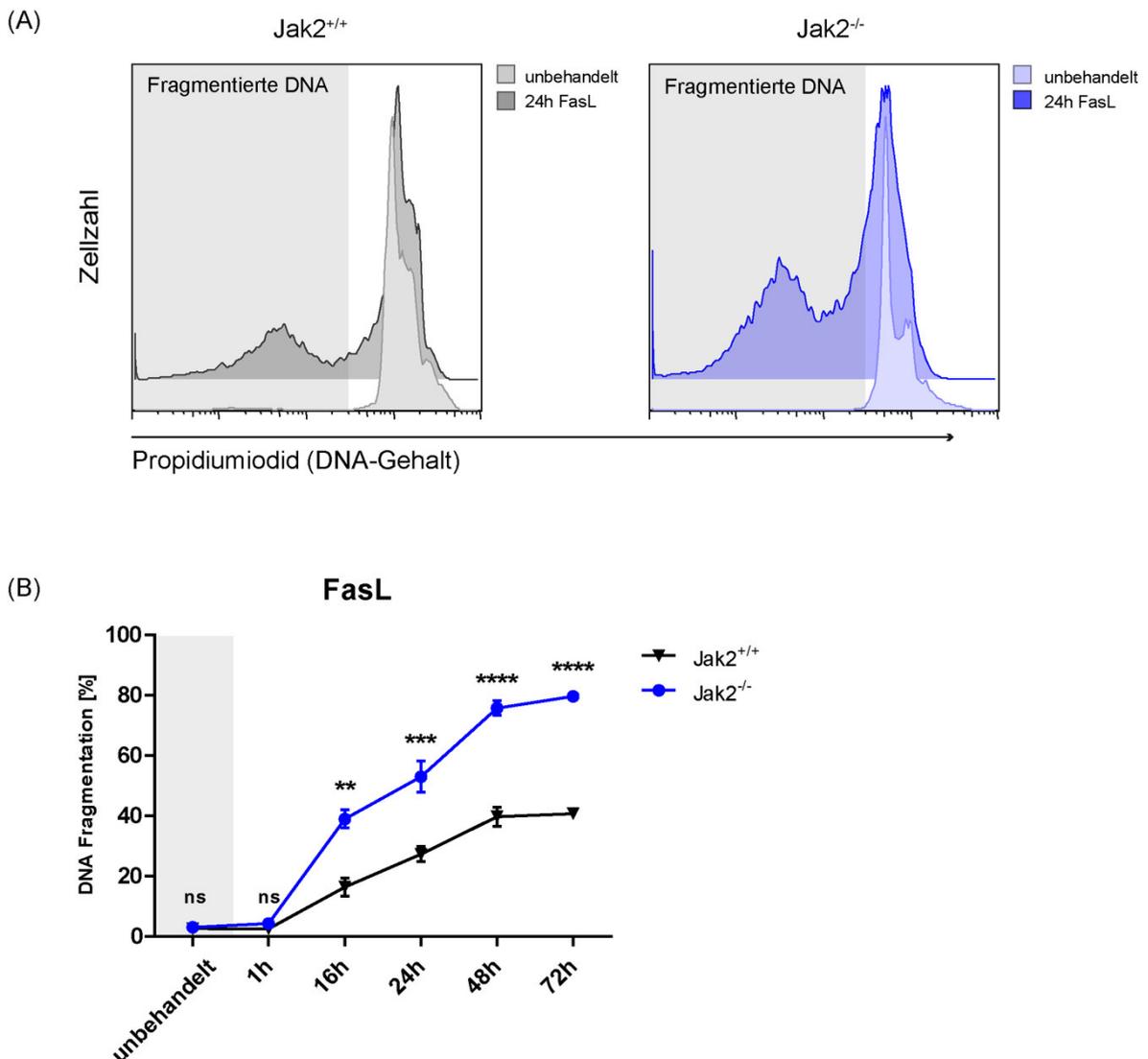
##### 4.1.1.1 Induktion von Apoptose durch FasL-Stimulation

Um aufzuklären, inwiefern Jak2 einen Einfluss auf die Fas-vermittelte Apoptose ausübt, wurden zunächst murine embryonale Fibroblasten (MEF) und Jak2-defiziente MEFs mit FasL stimuliert um Apoptose in den Zellen zu induzieren. Ein Unterschied der induzierten Apoptose-Rate wurde anhand des Grades der DNA Fragmentation ermittelt.

In die DNA lebender Zellen wird Propidiumiodid interkaliert, wodurch die Nuklei von Zellen angefärbt und quantifiziert werden können. Ohne Todes Stimulus zeigten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs ausschließlich mit Propidiumiodid angefärbte Nuklei und somit einen hohen DNA-Gehalt (Abb. 4.1 (A)). Eine Zugabe des FasL induzierte bereits nach 24 h eine Fragmentation der DNA, die durch eine Abnahme der angefärbten Nuklei und folglich einem niedrigeren DNA-Gehalt gekennzeichnet war (Abb. 4.1 (A)). Zudem wiesen Jak2-defiziente MEFs, vergleichend zu Jak2<sup>+/+</sup> Kontroll-MEFs, bereits nach 24 h Apoptose-Induktion eine deutliche Zunahme an Zellen mit fragmentierter DNA auf.

Um die Differenz der Apoptose-Rate zwischen basaler und defizienter Jak2-Expression an weiteren Zeitpunkten zu charakterisieren, wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach FasL-Stimulation die DNA Fragmentation bestimmt (Abb. 4.1 (B)). Wie zuvor zeigten sowohl Jak2<sup>+/+</sup> als auch Jak2<sup>-/-</sup> MEFs keine Induktion von Apoptose ohne Stimulation. Auch 1 h nach FasL Zugabe wurde in beiden Zelltypen keine Apoptose eingeleitet, jedoch wiesen nach 16 h sowohl Jak2<sup>+/+</sup> als auch Jak2<sup>-/-</sup> MEFs eine deutliche Zunahme an Apoptose (ca. 15% gegenüber ca. 40% der gesamten Zellen) auf. Ein signifikanter

Unterschied zwischen Jak2-Knockout vs. Wildtyp war erkennbar. Nach 24 h war die Anzahl apoptotischer Zellen in Jak2-defizienten auf ca. 55% und in Wildtyp-Zellen auf ca. 25% gestiegen, wobei die Anzahl apoptotischer Jak2<sup>-/-</sup> MEFs gegenüber apoptotischer Jak2<sup>+/+</sup> MEFs signifikant erhöht war. Nach 48 h nahm die Zahl der gemessenen apoptotischen Zellen weiterhin zu. Deutlich erkennbar war, dass auch der Anteil in Jak2-defizienten (ca. 75%) gegenüber Wildtyp- (ca. 40%) Zellen zusätzlich angestiegen war. Aufgrund dessen konnte eine höhere Signifikanz ermittelt werden. Des Weiteren erreichten Zellen mit endogener Jak2-Expression ein Plateau an apoptotischen Zellen. Es wurde keine zusätzliche Apoptose nach 48 h und 72 h eingeleitet. Interessanterweise zeigten Jak2-defiziente MEFs auch nach 72 h eine Steigerung auf ca. 80% an apoptotischen Zellen.

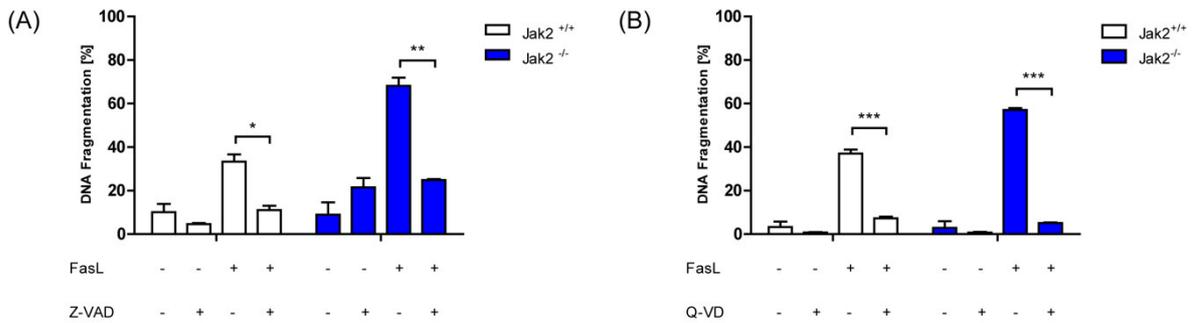


**Abb. 4.1: Induktion von Apoptose in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach FasL-Stimulation.** Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit FasL (20 ng/ml) für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. (A) Histogramme von Jak2<sup>+/+</sup> (links, grau) und Jak2<sup>-/-</sup> (rechts, blau) MEFs unbehandelt (hellgrau/hellblau) und 24 h FasL (grau/blau) Stimulation. Gezeigt sind der DNA-Gehalt (Einbau von Propidiumiodid) auf der Abzisse und die Anzahl der Zellen (Nuclei) auf der Ordinate. (B) Kinetik nach FasL (20 ng/ml) Stimulation in Jak2<sup>+/+</sup> (schwarz) und Jak2<sup>-/-</sup> (blau) MEFs; \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005, \*\*\*\*p<0,00005

Zusammenfassend ist unverkennbar, dass nach einer Stimulation mit FasL eine fehlende Expression von Jak2, im Gegensatz zu einer basalen Jak2 Expression, in murinen Fibroblasten zu einer signifikant gesteigerten Induktion von Apoptose über einen Zeitraum von 72h führt. Demnach konnte ein Einfluss von Jak2 auf den Fas-induzierten Signalweg nachgewiesen und als eine protektive Funktion für Jak2 identifiziert werden.

### 4.1.1.2 Blockierung von Apoptose durch Caspase-Inhibitoren

Die Zerstörung und der Abbau von DNA sind neben der Apoptose ebenfalls Charakteristika des nicht gerichteten Zelltodes, der Nekrose (Fiers et al., 1999; Kerr, 1971; Schweichel and Merker, 1973). Abweichend von der Apoptose, wo DNA gezielt durch Endonukleasen in ca. 180 bp große Fragmente gespalten wird, entstehen während der Nekrose zufällige und undefinierte DNA-Segmente (Wyllie, 1980). In nekrotischen Zellen werden Zelltod-fördernde Prozesse, wie die Kondensierung der DNA und die Lyse der Zellmembran, simultan eingeleitet (Kerr, 1972; Majno and Joris, 1995; Trump et al., 1997). Dem gegenüber wird die apoptotische Fragmentierung der DNA gezielt als ein später Vorgang im Zuge des programmierten Zelltodes durch die Familie der Caspasen mediiert (Enari et al., 1998). Aufgrund dessen sollte nun die in 4.1.1.1 bestimmte DNA-Fragmentation als Folge der Caspasen-abhängigen Apoptose nachgewiesen und die protektive Funktion von Jak2 im FasL-vermittelten Signalweg bekräftigt werden. Dazu wurden  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit Caspasen-Inhibitoren (Z-VAD und Q-VD) vorbehandelt und anschließend Apoptose durch die Zugabe von FasL in den Zellen induziert. Wie zu erwarten zeigte der pan-Caspasen-Inhibitor Z-VAD keinen Einfluss auf unbehandelte MEFs ( $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$ ) und ein signifikanter Unterschied in der Fragmentierung der DNA war nicht nachweisbar (Abb. 4.2 (A)). Durch die Zugabe des FasL wurde nach 24 h die induzierte DNA Fragmentation in  $Jak2$ -defizienten sowie Wildtyp-Fibroblasten gemessen, welche erneut in  $Jak2$ -defizienten Fibroblasten erhöht war. Nach einer Vorinkubation beider Fibroblasten mit Z-VAD und anschließender Stimulation mit FasL war sowohl in  $Jak2^{+/+}$  als auch in  $Jak2^{-/-}$  MEFs eine signifikante Abnahme der DNA Fragmentierung erkennbar. Beide Zelllinien waren vor der Apoptose geschützt. Da in vorherigen Studien beschrieben ist, dass Z-VAD neben den Caspasen zusätzlich die zu den Proteasen-gehörenden Calpaine hemmt, sollte ein weiterer Caspasen-Inhibitor verwendet werden um einen sekundären Effekt der Calpaine auszuschließen (Wood and Newcomb, 1999). Daher wurden  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit dem pan-Caspasen-Inhibitor Q-VD vorbehandelt und Apoptose durch FasL induziert. Auch hier zeigte sich keine Differenz in der DNA Fragmentation von nicht und Q-VD behandelten Fibroblasten (Abb. 4.2 (B)). Nach FasL Zugabe war DNA Fragmentation induziert, die in  $Jak2$ -defizienten Fibroblasten ebenfalls gesteigert war. Bedeutend ist, dass eine Vorbehandlung mit Q-VD nahezu die gesamte Zahl der Zellen vor Apoptose schützte.



**Abb. 4.2: Inhibition der FasL-vermittelten Apoptose in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit (A) Z-VAD(Ome)-FMK (10  $\mu$ M) oder (B) Q-VD-OPh (10  $\mu$ M) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit FasL (20 ng/ml) für 24 h stimuliert. Apoptose anhand der der DNA Fragmentation bestimmt; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$

So kann sowohl in Wildtyp Fibroblasten als auch in Jak2-defizienten Fibroblasten eine durch FasL ausgelöste DNA Fragmentierung geblockt werden. Dies ist wiederum auf die durch Z-VAD und Q-VD vermittelte Inhibition der Apoptose-auslösenden Caspasen zurück zuführen.

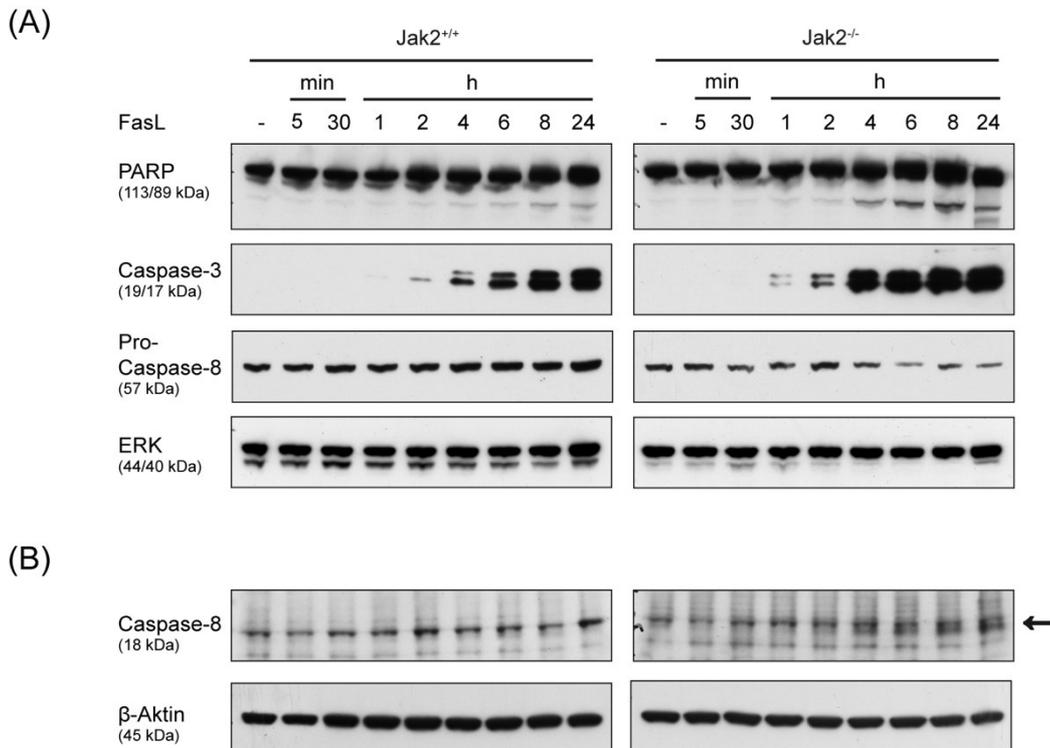
#### 4.1.1.3 Spezifische Aktivierung von Caspasen durch FasL

Die Aktivierung der zur Familie der Zystein-Proteasen gehörenden Caspasen ist ein Hauptcharakteristikum der Apoptose (Alnemri et al., 1996). Durch die Bindung von FasL an seinen spezifischen Todesrezeptor und die Ausbildung des DISC (death inducing complex) wird die als Initiator-Caspase bezeichnete Pro-Caspase-8 in ihre aktive Form gespalten (Caspase-8) (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997). Dem folgend spaltet die Caspase-8 die Pro-Caspase-3 in die Caspase-3, welche nun ihre Funktion als Effektor-Caspase ausüben kann (Faleiro et al., 1997; Stennicke et al., 1998; Takahashi et al., 1996). Dies schließt die Deaktivierung des DNA-reparierenden Enzyms PARP und die darauffolgende Fragmentierung der DNA ein (Takahashi et al., 1996; Woo et al., 1998). Im vorherigen Versuchsteil (4.1.1.2) konnte Apoptose durch die Zugabe von Caspasen-Inhibitoren geblockt werden. Daher sollte im Folgenden die Aktivierung von Caspasen in Jak2-defizienten Zellen nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen wurde in Jak2-defizienten und Wildtyp-MEFs Apoptose durch FasL Zugabe induziert und an verschiedenen Zeitpunkten die Proteine extrahiert. Anschließend konnten die Proteine durch die Western-Blot-Methode detektiert werden. Nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. In Abbildung 4.3 (A) und (B) ist dargestellt, dass während der FasL-induzierten Apoptose die Menge der Pro-Caspase-8 abnahm und dementsprechend die Menge an aktiver Caspase-8 zunahm. Sehr interessant ist, dass Jak2-defiziente MEFs, gegenüber Wildtyp-Fibroblasten, nach 4 h nach Stimulation einen deutlichen Anstieg der gespaltenen Pro-Caspase-8 aufwiesen. Ebenso wurde sowohl in Jak2<sup>+/+</sup> als auch in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach 2 h Caspase-3 aktiviert und deren Menge im Verlauf der Stimulation von 24 h in beiden Zelltypen konstant anstieg. Jedoch war auch die Caspase-3 in Jak2-defizienten MEFs drastisch erhöht (Abb.4.2 (A)). Daraus resultierend wiesen Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach Stimulation mit FasL eine Spaltform der PARP auf, die nach 4 h Stimulation in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs gegenüber Jak2<sup>+/+</sup> MEFs signifikant zunahm.

Die deutlich erkennbare gesteigerte Aktivierung von Initiator-Caspasen sowie Effektor-Caspasen und der daraus resultierenden Akkumulation von Spaltprodukten (PARP) in

Jak2-defizienten Fibroblasten bekräftigt, dass Jak2 während der FasL-vermittelten Apoptose eine essentielle anti-apoptotische Funktion durch eine Regulation der Caspasen-Aktivierung einnimmt.

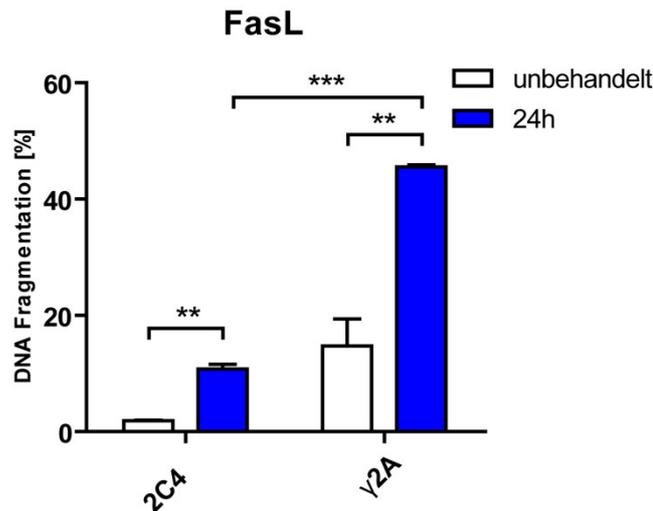


**Abb. 4.3 Aktivierung von Caspasen in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach FasL-Inkubation.** Western-Blot-Analyse mit Gesamt-Zellysaten aus nicht und nach den dargestellten Zeitpunkten mit FasL (20 ng/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Dargestellt sind Western Blots für (A) PARP, Caspase-3, Pro-Caspase-8, ERK (Lade-Kontrolle), sowie (B) Caspase-8 und β-Aktin (Lade-Kontrolle). Der Pfeil markiert die gesplittene aktive Caspase-8 (18kDa).

#### 4.1.1.4 Die anti-apoptotische Funktion von Jak2 in einem humanen Zellsystem

Aufgrund ihrer physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit zu Menschen dienen Mäuse als Modellsystem für die Aufklärung biologischer Prozesse (Ganten and Ruckpaul, 2008). Es konnten Gene identifiziert werden, die ausschließlich dem murinen oder dem humanen Organismus zuzuordnen sind und eine essentielle Funktion einnehmen. Aufgrund dessen sollte anschließend untersucht werden, ob Jak2 auch eine anti-apoptotische Funktion in humanen Zellsystemen ausübt. Diesbezüglich wurden humane Fibrosarkom-Zellen, 2C4 (Jak2<sup>+/+</sup>) sowie γ2A (Jak2<sup>-/-</sup>), ohne oder mit FasL für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit DNA Fragmentation anhand der Nicoletti-Methode ermittelt. Sowohl in 2C4 als auch in γ2A Zellen wurde Apoptose durch die Aktivierung von Fas induziert (Abb. 4.4). Interessanterweise wiesen Jak2-defiziente γ2A Zellen ohne FasL-Stimulus bereits ca. 10% apoptotische Zellen auf. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen 2C4 und γ2A (ca.15% gegenüber ca. 45%) war nach FasL Stimulation deutlich zu erkennen.

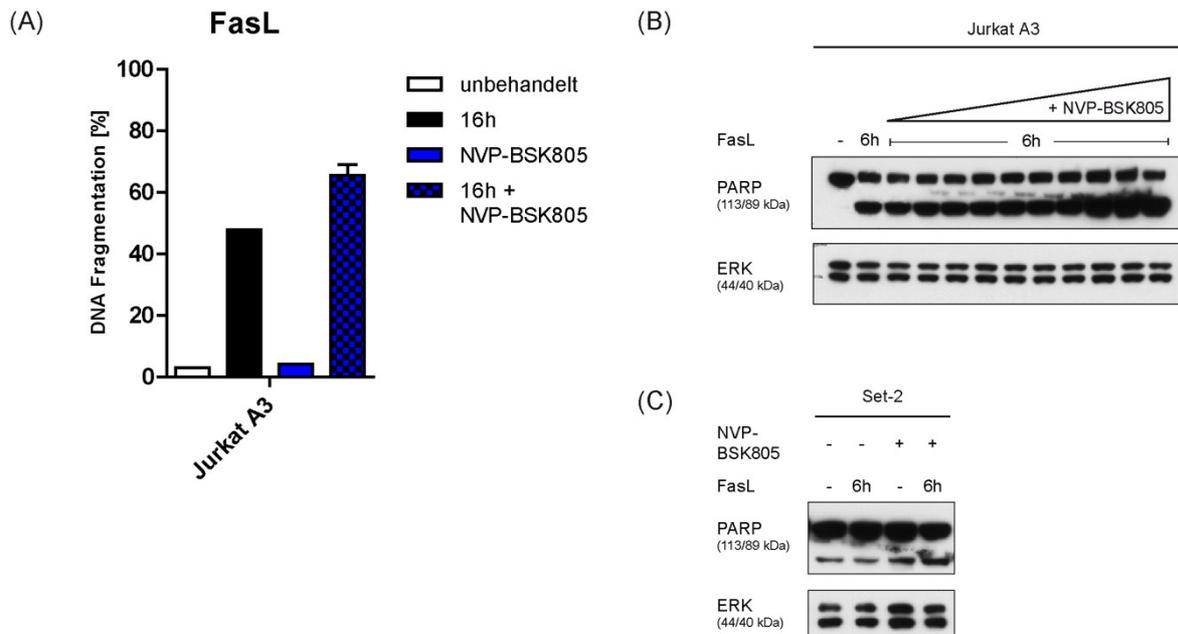
Demzufolge führt Jak2 eine protektive Funktion in der Fas-induzierten Apoptose sowohl in murinen als auch in humanen Zellsystemen aus.



**Abb. 4.4 Induktion von Apoptose in 2C4 und  $\gamma$ 2A nach FasL Stimulation.** Humane Fibroblasten 2C4 ( $Jak2^{+/+}$ ) und  $\gamma$ 2A ( $Jak2^{-/-}$ ) wurden mit FasL (20 ng/ml) für 24 h stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. Nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$

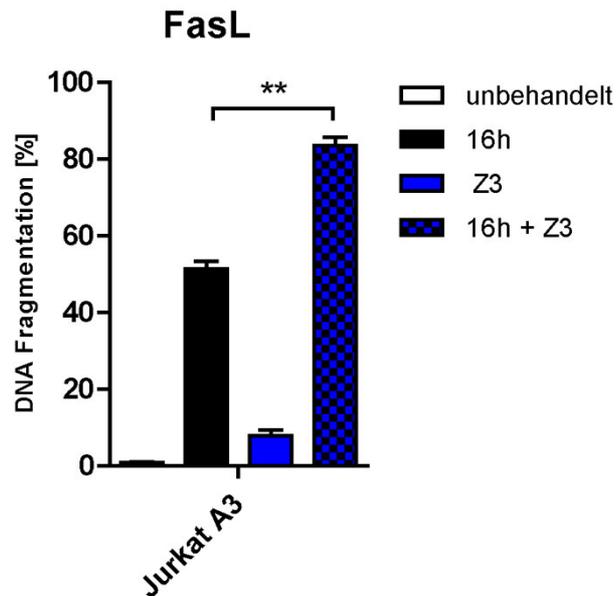
#### 4.1.1.5 Induktion von Apoptose durch Jak2 Inhibitoren

Aufgrund der Identifizierung einer Beteiligung von Jak2 in myeloproliferativen Neoplasien wurden spezifische Inhibitoren entwickelt (O'Shea et al., 2015; Samanta et al., 2006). Diese sollen die Kinase-Aktivität von Jak2 gezielt inhibieren um die Proliferation maligner Zellen zu blockieren (Samanta et al., 2006). Da die Balance zwischen Zell-Überleben und -Tod entscheidend für die Entstehung maligner Zellen ist (Favaloro et al., 2012), sollte nun aufgeklärt werden ob eine Inhibition der Kinase-Domäne von Jak2 FasL-induzierte Apoptose initiieren kann. Hierzu wurden für Apoptose sensitive Jurkat A3 (humane T-Zelllinie), 1 h mit NVP-BSK805 (Jak2-Inhibitor (Baffert et al., 2010)) vorbehandelt und anschließend Apoptose durch die Zugabe von FasL induziert. Nach 16 h erfolgte die Bestimmung apoptotischer Zellen anhand der DNA Fragmentation durch die Nicoletti-Methode. Wie in der Abbildung 4.5 (A) dargestellt, wiesen ca. 50% der Zellen fragmentierte DNA nach FasL Stimulation auf. Auffallend ist, dass durch die Zugabe von NVP-BSK805 und FasL die Anzahl an apoptotischen Zellen um ca. 15% deutlich zunahm. Dagegen zeigten nur mit NVP-BSK805 vorbehandelte Jurkat A3 keinen Anstieg in der Anzahl der apoptotischen Zellen. Um die spezifische Wirkungsweise des Inhibitors auf die FasL-vermittelte Apoptose zu analysieren, sollte ebenfalls eine Aktivierung der Caspasen nachgewiesen werden. Diesbezüglich wurden Jurkat A3 Zellen in aufsteigender Konzentration mit NVP-BSK805 prä-inkubiert und anschließend Apoptose mit FasL induziert. Die Gesamtzellextrakte wurden nach 6 h angefertigt und die Proteine durch die Western-Blot-Methode visualisiert. Unbehandelte Jurkat A3 Zellen und FasL-stimulierte Jurkat A3 Zellen dienten hierbei als Kontrolle. So wurde in NVP-BSK805 behandelten Jurkat A3 Zellen und anschließender Apoptose Induktion eine größere Menge an PARP gespalten, die zusätzlich mit ansteigender Konzentration des Inhibitors zunahm und demnach auf eine Aktivität der Caspase-3 zurück zu führen war (Abb. 4.5 (B)).



**Abb. 4.5 Induktion von Apoptose und Caspase-Aktivität nach Inhibition von Jak2 in humanen Zellsystemen.** (A) Jurkat A3 Zellen wurden mit NVP-BSK805 (500 nM) für 1 h vorinkubiert und mit FasL (20 ng/ml) für 16 h stimuliert. Apoptose wurde anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. Nicht stimulierte und nur mit NVP-BSK805 vorbehandelte Jurkat A3 Zellen dienten als Kontrolle. Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus BSK-NVP805 (bei (B) 5 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 200 nM, 350 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM; (C) 500 nM) vorbehandelten und 6 h FasL (20 ng/ml) stimulierten (B) Jurkat A3 Zellen sowie (C) Set-2 Zellen. Dargestellt sind Western Blots für PARP und ERK (Lade-Kontrolle).

Eine große Zahl der Jak2-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien von Patienten mit MPN getestet (O'Shea et al., 2015). Aufgrund dessen wurden Set-2 Zellen (maligne Zellen mit konstitutiv aktivem Jak2 (Quentmeier et al., 2006; Uozumi et al., 2000)) mit NVP-BSK805 vorbehandelt. Nach Induktion von Apoptose durch FasL wurde mittels der Western-Blot-Methode auf eine Caspase-3 Aktivität überprüft. Da Set-2 Zellen ebenfalls eine gesteigerte Anzahl an inaktivem PARP gegenüber nicht stimulierten Zellen aufwiesen, konnte ebenfalls eine stärkere Aktivität der Caspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 4.5 (C)). Um den Jak2-Inhibitor-Effekt zu bekräftigen (Jak2-Inhibition stoppt Zellvitalität und leitet Apoptose ein) sollte im folgenden Versuchsteil ein weiterer Inhibitor für Jak2 getestet werden. Hierzu wurde der Jak2 Inhibitor V, oder auch Z3 (Sayyah et al., 2008), verwendet. Jurkat A3 wurden mit Z3 vorbehandelt und Apoptose durch eine Stimulation mit FasL induziert. Anschließend wurde Apoptose anhand der DNA Fragmentation bestimmt. Bestätigend zeigt die Abbildung 4.6, dass durch eine Behandlung mit Z3 die Anzahl an apoptotischen Zellen um ca. 25% signifikant anstieg.



**Abb. 4.6 Induktion von Apoptose nach Inhibition von Jak2 in Jurkat A3 Zellen.** (A) Jurkat A3 Zellen wurden mit Z3 (1  $\mu$ M) für 1h vorinkubiert und mit FasL (20 ng/ml) für 16 h stimuliert. Apoptose wurde anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. Nicht stimulierte und nur mit Z3 vorbehandelte Jurkat A3 Zellen dienten als Kontrolle. \*\* $p < 0,005$

Zusammenfassend wird durch eine Inhibition von Jak2 die FasL-induzierte Apoptose gezielt gesteigert. Interessanterweise führt eine kombinierte Gabe von Jak2 Inhibitoren und FasL ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptose in malignen Zellen.

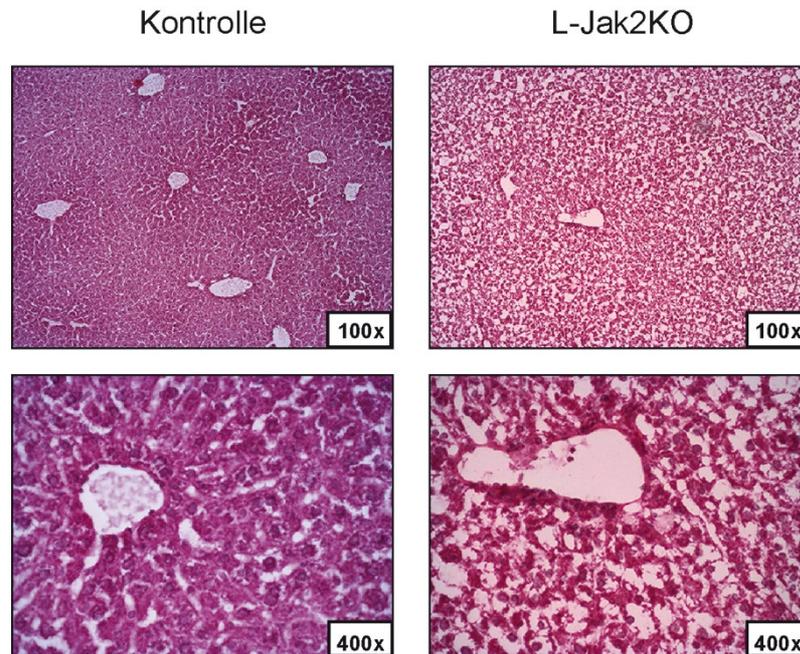
#### 4.1.2 Die anti-apoptotische Funktion von Jak2 in einem Mausmodell

Innerhalb dieser Dissertation konnte bisher für Jak2 eine Zelltod-hemmende Funktion identifiziert und bewiesen werden. Da durch eine Verwendung von Zellsystemen eine Analyse biologischer Prozesse im Gesamtorganismus nicht möglich ist, sollte die protektive Funktion von Jak2 in einem *in vivo* Modell untersucht werden. Aufgrund der embryonalen Letalität eines konventionellen Jak2 Knockouts (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998) wurde ein konditionaler und somit gewebespezifischer Knockout für Jak2 analysiert. Zuvor wurde bereits beschrieben, dass der Todesrezeptor Fas essentielle Funktionen in Hepatozyten besitzt (Ogasawara et al., 1993; Schmich et al., 2011; Tacke et al., 2009). Durch eine Verpaarung von Mäusen mit einem geflochtenen Jak2-Lokus (Jak2 ist flankiert von *loxP*-Sequenzen) (Krempler et al., 2004) mit Albcre (Cre unter einem Hepatozyten-spezifischen Promotor) Mäusen konnte ein Hepatozyten- bzw. Leber-spezifischer Knockout für Jak2 (L-Jak2KO (Shi et al., 2012)) generiert werden.

##### 4.1.2.1 Histopathologie der Leber nach einem konditionalen Jak2-Knockout

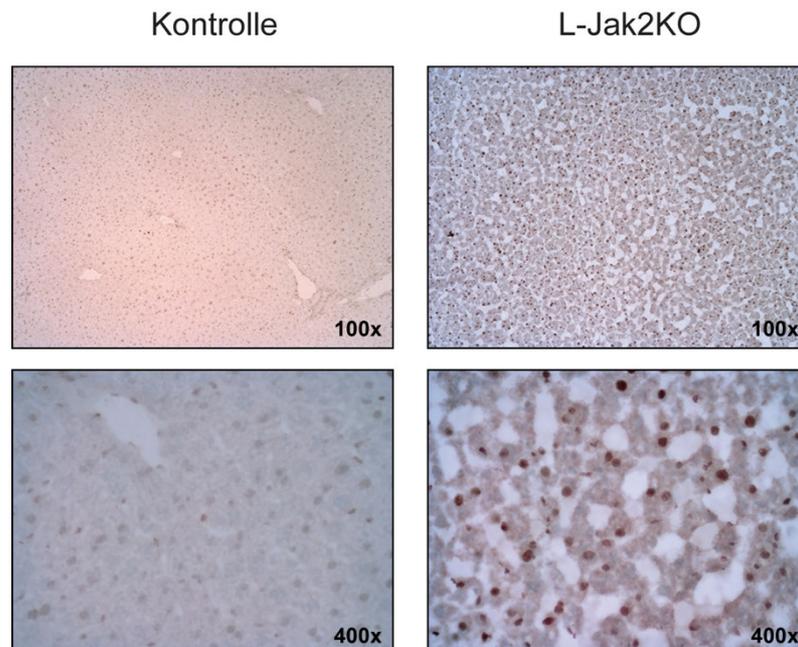
Um eine morphologische Veränderung der Leber von L-Jak2KO Tieren gegenüber der Leber von Kontroll-Tieren ( $Jak2^{fl/fl}$ ) zu untersuchen, wurden Kontroll- und L-Jak2KO Mäusen die Leber entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung sollte schließlich die zuvor durch Shi *et al.* beschriebene Pathologie der Leber bestätigen (Shi et al., 2012). Durch den Hepatozyten-spezifischen Jak2-Knockout war die Mikroarchitektur der Leber von L-Jak2KO Tieren grundsätzlich verändert (Abb. 4.7).

Entgegen der kompakten Anordnung von Zellen in der Leber der Kontrolle zeigte die L-Jak2KO Maus eine diffuse, lückenhafte Morphologie der Leber. Somit ist ein Hepatozyten-spezifischer Knockout von Jak2 für einen pathologischen Phänotyp der Leber verantwortlich.



**Abb. 4.7 Morphologie der Leber nach einem Hepatozyten-spezifischen Jak2-Knockout.** Anfärbung von Gewebeschnitten der Leber von Kontroll ( $Jak2^{fl/fl}$ )- und L-Jak2KO ( $Jak2^{fl/fl}$  x Albcre)- Mäusen durch Hämatoxylin- und Eosin-haltige Lösungen (Vergrößerung der Aufnahmen wie angegeben).

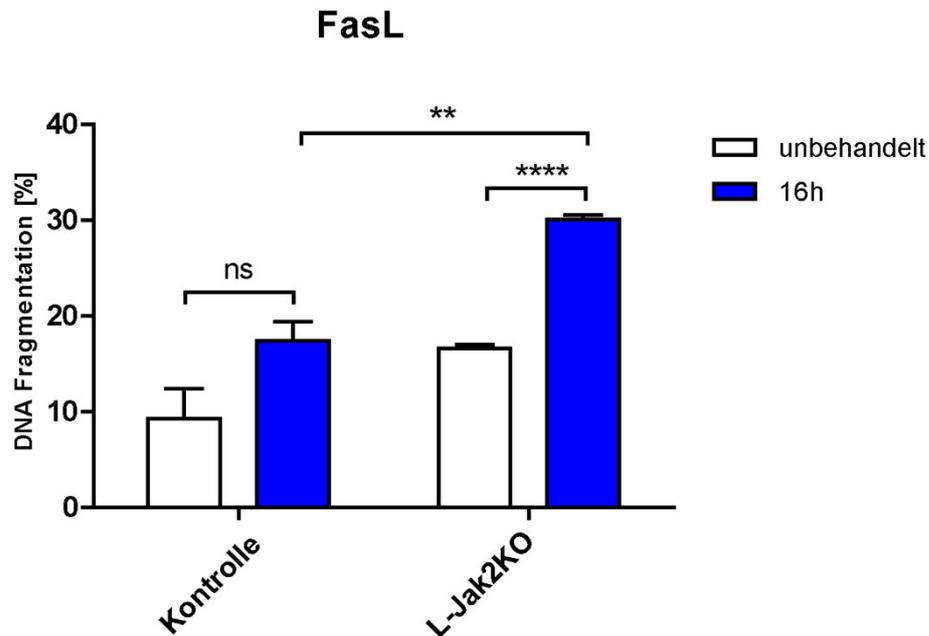
Um den L-Jak2KO-spezifischen Phänotyp der Leber zu charakterisieren, wurde zusätzlich eine TUNEL-Färbung zur Identifizierung apoptotischer Zellen in den Gewebeschnitten durchgeführt. Interessanterweise führte ein konditionaler Knockout von Jak2 zu einer massiven Bildung von TUNEL-positiven (apoptotischen) Zellen (Abb. 4.8). Die Leber der Kontroll-Tiere war demgegenüber TUNEL-negativ. Die große Anzahl apoptotischer Zellen, die durch die TUNEL-Färbung visualisiert werden konnten, weist somit auf eine Schädigung der Leber in L-Jak2KO Tieren hin.



**Abb. 4.8 Visualisierung apoptotischer Zellen der Leber nach einem Hepatozyten-spezifischen Jak2-Knockout.** Gewebeschnitte der Leber von Kontroll ( $Jak2^{fl/fl}$ )- und L-Jak2KO ( $Jak2^{fl/fl} \times Albcre$ )- Mäusen wurden durch die TUNEL-Methode angefärbt (Vergrößerung der Aufnahmen wie angegeben).

#### 4.1.2.2 Induktion von Apoptose in primären Hepatozyten

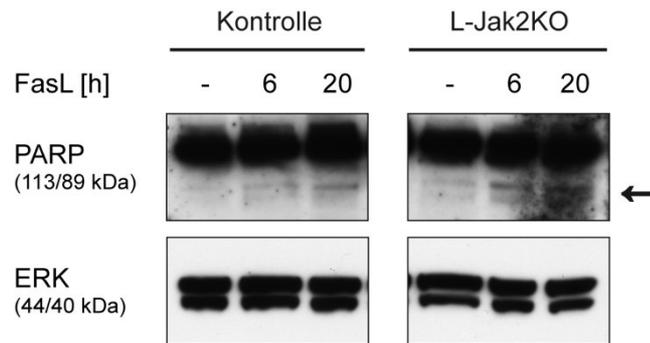
Der konditionale Jak2 Knockout in Hepatozyten zeigte einen pathologischen Phänotyp der Leber, der durch eine große Anzahl von apoptotischen Zellen charakterisiert wird. Dieser Phänotyp sollte zunächst durch eine Isolierung der Jak2-defizienten Hepatozyten in einem Zusammenhang mit der Fas-induzierten Apoptose charakterisiert werden. Die aus perfundierten Lebern (Kontroll-Tiere und L-Jak2KO-Tiere) isolierten Hepatozyten wurden mit FasL für 16 h inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl von unstimulierten und stimulierten Hepatozyten mit fragmentierter DNA anhand der Nicoletti-Methode ermittelt. Sowohl in Kontroll- als auch in L-Jak2KO-Hepatozyten wurde Apoptose durch die Aktivierung von Fas induziert (Abb. 4.9). Interessanterweise wiesen Jak2-defiziente Hepatozyten bereits ohne Todes-Stimulus apoptotische Zellen auf (ca.15%). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen von Kontroll- gegenüber L-Jak2KO Hepatozyten (ca.15% gegenüber ca. 30%) war deutlich zu erkennen.



**Abb. 4.9 Apoptose in FasL stimulierten primären Hepatozyten.** Aus Kontroll ( $Jak2^{fl/fl}$ )- und L-Jak2KO ( $Jak2^{fl/fl}$  x Albcre)- Mäusen isolierte Hepatozyten wurden mit FasL (20ng/ml) für 16h stimuliert. Apoptose wurde anhand der gemessenen DNA Fragmentation bestimmt. Nicht stimulierte Hepatozyten dienen als Kontrolle. \*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,00005$

Aufgrund dieses Befundes sollte die Aktivierung der Todesrezeptor-induzierten Caspasen untersucht werden. Hierfür wurde in  $Jak2$ -defizienten- sowie Kontroll-Hepatozyten Apoptose durch FasL Zugabe induziert und nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Proteine extrahiert. Anschließend konnten die Proteine durch die Western-Blot-Methode analysiert werden. Nicht stimulierte Hepatozyten wurden zusätzlich mitgeführt. Aus der folgenden Abbildung 4.10 ist ersichtlich, dass nach 6 h Inkubation eine Spaltung von PARP in den Hepatozyten beider Primär-Zellkulturen zu erkennen war. Zusätzlich war deutlich, dass nach 20 h die Menge an gespaltenem PARP sichtbar zunahm. Interessanterweise wurde auch in primären Hepatozyten durch einen Mangel an  $Jak2$  eine wesentlich größere Menge an PARP gespalten und so vermutlich durch die Caspase-3 inaktiviert. Somit wäre auch in diesem Experimentalsystem eine schnelle und erhöhte Aktivierung der Caspase-3 in Abwesenheit von  $Jak2$  zu vermuten.

Die Leber von L-Jak2KO Tieren weist einen pathologischen Phänotyp der Leber auf, der bei genauerer Analyse eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen aufweist. Da mit diesem Genotyp isolierte Hepatozyten bereits eine große Population an apoptotischen Zellen beinhalten, ist zu vermuten, dass die TUNEL-positiven Zellen in der Histologie als Hepatozyten zu identifizieren sind. In Übereinstimmung verfügen Hepatozyten aus L-Jak2KO Tieren über einen geringeren Schutz gegen FasL-induzierte Apoptose. Dies lässt den Schluss zu, dass  $Jak2$  auch in einem *in vivo* Modell Zelltod-protective Eigenschaften besitzt.



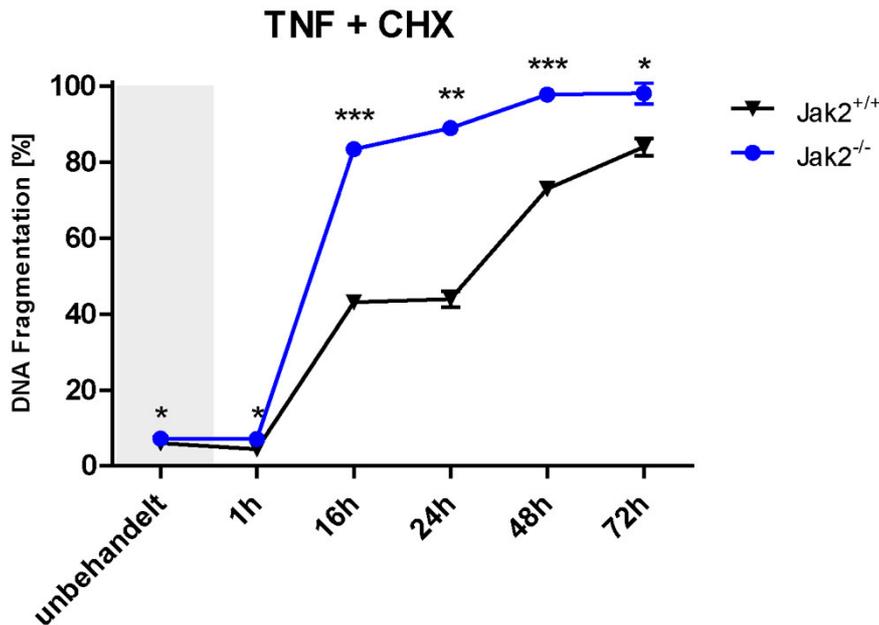
**Abb. 4.10 Aktivierung von Caspasen in FasL stimulierten primären Hepatozyten.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus nicht und nach den dargestellten Zeitpunkten mit FasL (20 ng/ml) stimulierten Kontroll (Jak2<sup>fl/fl</sup>)- und L-Jak2KO (Jak2<sup>fl/fl</sup> x Albcre)- Mäusen isolierten Hepatozyten. Dargestellt sind Western Blots für PARP und ERK (Lade-Kontrolle). Der Pfeil markiert gespaltenes inaktives PARP (89kDa).

### 4.1.3 Der Einfluss von Jak2 auf Signalmechanismen der TNFR-Superfamilie

Neben FasL und dessen spezifischem Rezeptor Fas sind weitere Ligand-Rezeptor Paare der TNF/TNFR-Superfamilie bekannt, die ebenfalls zu der Klasse der Todesrezeptoren gehören (Locksley et al., 2001). So besitzt jeder dieser Todesrezeptoren eine zytoplasmatische Todesdomäne (death domain; DD), die für die Bindung gleicher oder homologer Adapterproteine verantwortlich ist und letztendlich todes-induzierende Signale im Inneren der Zelle weiterleitet (Nagata, 1997). Die hier beschriebene protektive Funktion von Jak2 innerhalb des FasL/Fas-vermittelten Signalweges ist auch für weitere Mitglieder der TNF/TNFR-Familie bisher unbekannt. Daher sollte untersucht werden, ob Jak2 ebenfalls eine schützende Funktion innerhalb des TNF/TNFR-, sowie des TRAIL/DR4/5 Signalweges ausübt.

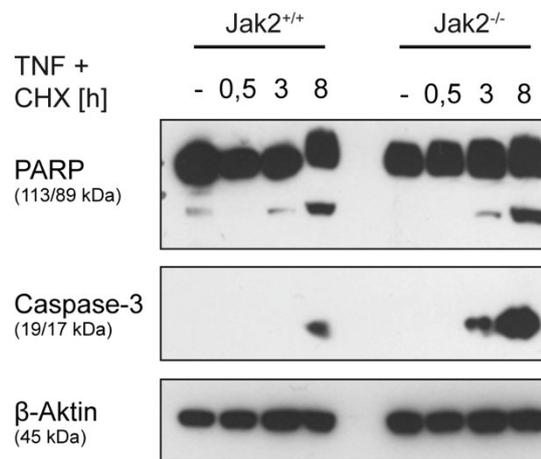
#### 4.1.3.1 Analyse einer protektiven Funktion von Jak2 in der TNF induzierten Apoptose

Der Familien namensgebende Ligand TNF und dessen Rezeptor TNFR zeichnen sich sowohl durch Zelltod-induzierende als auch durch starke Signale, die zu einem Überleben der Zelle beitragen aus (Brenner et al., 2015). Eine Beteiligung von Jak2 an diesen Signalmechanismen wird somit vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in Wildtyp- wie auch Jak2-defizienten MEFs innerhalb einer TNF-Stimulationskinetik über einen Zeitraum von 72 h ermittelt. Die Anwesenheit von Cycloheximid (CHX) ermöglichte hierbei eine Stärkung der Apoptose-einleitenden Signale, da die durch TNF via NF- $\kappa$ B induzierten Überlebenssignale inhibiert werden (Hsu et al., 1996b; Liu et al., 1996). Die Anzahl apoptotischer Zellen in unstimulierten und 1 h TNF-stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> als auch Jak2<sup>-/-</sup> MEFs war gering (Abb. 4.11). Nach 16 h wiesen sowohl Jak2<sup>+/+</sup> als auch Jak2<sup>-/-</sup> MEFs eine Zunahme an apoptotischen Zellen auf. Jedoch waren Wildtyp-MEFs gegenüber Jak2-defizienten MEFs signifikant vor Apoptose geschützt (ca. 40% vs. ca. 80%). So nahm im Verlauf der Stimulationskinetik der Anteil apoptotischer Zellen stetig zu. Ein Mangel an Jak2 führte zudem bis nach 72 h TNF-Behandlung zu einer nahezu vollständigen apoptotischen Zellpopulation (ca. 98%). Demgegenüber bestand durch die Anwesenheit von Jak2 während der TNF-induzierten Apoptose ein signifikanter Schutz gegenüber Apoptose (ca. 80%).



**Abb. 4.11 Apoptose in TNF stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** Jak2<sup>+/+</sup> (schwarz) und Jak2<sup>-/-</sup> (blau) MEFs wurden mit TNF (20 ng/ml) in der Gegenwart von CHX (100 ng/ml) für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. \*p<0,05; \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

Um eine protektive Funktion von Jak2 während des TNF/TNFR-vermittelten Signalmechanismus zu analysieren, sollte zusätzlich Apoptose anhand der Visualisierung von Spaltungen der Caspasen und deren Substrate nachgewiesen werden. In einer Inkubationskinetik von Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit TNF – in der Anwesenheit von Cycloheximid – wurden durch die Extraktion der gesamten Proteine und einer anschließenden Western-Blot Analyse die Spaltung der Caspase-3 und deren Substrat PARP untersucht. Demnach wurde Apoptose sowohl in Wildtyp-MEFs als auch in Jak2-defizienten MEFs induziert (Abb. 4.12). Bereits nach 3 h wurde in Fibroblasten mit einem Mangel an Jak2 die Caspase-3 gespalten, wodurch zusätzlich die gespaltene Form von PARP entstand. Eine Spaltung der Caspase-3 und deren Substrat war in Wildtyp-Fibroblasten nach 8 h TNF-Behandlung nachweisbar. Jak2-defiziente MEFs zeigten eine deutliche Zunahme aktiver Caspase-3 und eine starke Inaktivierung von PARP im Vergleich zu Jak2 wt MEFs.

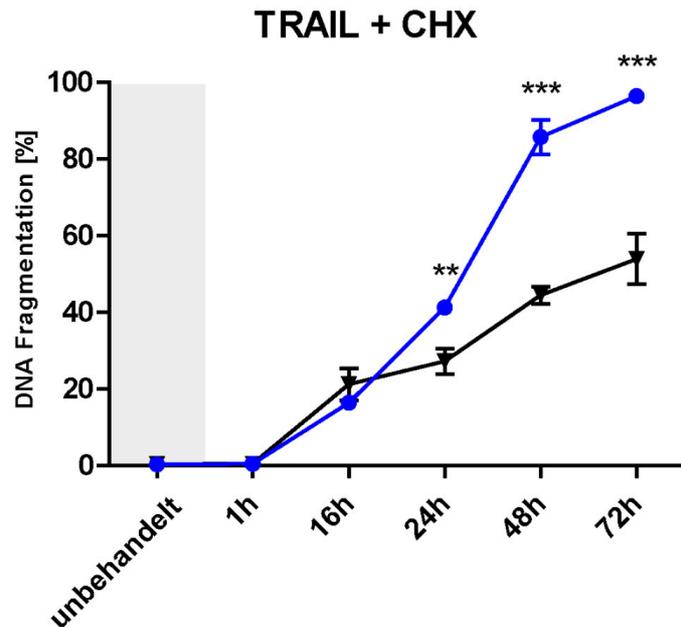


**Abb. 4.12 Aktivierung von Caspasen in TNF stimulierten murinen Fibroblasten.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus TNF (20 ng/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs in der Gegenwart von CHX (100 ng/ml). Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für PARP, Caspase-3 und β-Aktin (Lade-Kontrolle).

Durch einen Mangel an Jak2 wird die Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb einer TNF-behandelten Zellpopulation signifikant gesteigert. Somit übt Jak2 auch innerhalb des TNF/TNFR-induzierten Signalweges eine protektive Funktion aus. Dies konnte durch den Nachweis aktiver Caspase-3 bekräftigt werden.

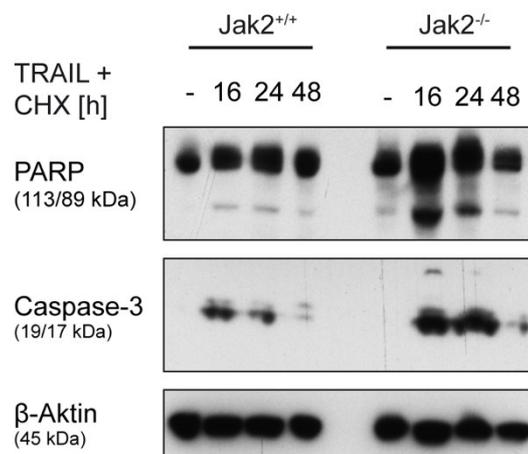
#### 4.1.3.2 Untersuchung einer anti-apoptischen Funktion nach Apoptose Induktion durch TRAIL

Die durch TNF und FasL induzierten Signalmechanismen zeichnen sich durch Gemeinsamkeiten aus, besitzen jedoch auch durch Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen an den Rezeptor gebundenen Adaptermoleküle (Tchikov et al., 2011). So werden zum Teil divergente Mechanismen eingeleitet. Dem gegenüber besitzen Fas und DR4/5 nahezu identische Adaptermoleküle und Signalmechanismen (Schulze-Osthoff et al., 1998). Somit ist eine anti-apoptische Funktion von Jak2 während der TRAIL-vermittelten Signalweiterleitung höchstwahrscheinlich. Aufgrund dessen wurde der Anteil apoptotischer Zellen Wildtyp-MEFs wie auch Jak2-defizienter MEFs innerhalb einer TRAIL Stimulationskinetik über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Die Anwesenheit von Cycloheximid führte zu einer Unterstützung der pro-apoptischen Mechanismen. 1 h nach TRAIL-Zugabe wiesen Jak2<sup>+/+</sup> als auch Jak2<sup>-/-</sup> MEFs keine apoptotischen Zellen auf (Abb. 4.13). Nach 16 h wiesen Wildtyp-Fibroblasten sowie Jak2-defiziente murine Fibroblasten eine in der Anzahl übereinstimmende Population von apoptotischen Zellen auf. Nach 24 h waren Wildtyp-Fibroblasten, im Gegensatz zu Jak2-defizienten Fibroblasten, signifikant vor Apoptose geschützt (ca. 25% vs. ca. 40%). Während des weiteren Verlaufes der Inkubationskinetik stieg der Anteil an apoptotischen Zellen sowie die Differenz der untersuchten Genotypen stetig an. So waren nach 72 h TRAIL Behandlung 50% der Wildtyp-Zellen apoptotisch. Demgegenüber führte ein Mangel an Jak2 zu einer nahezu vollständigen apoptotischen Zellpopulation (ca. 97%).



**Abb. 4.13 Induzierte Apoptose in TRAIL stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** Jak2<sup>+/+</sup> (schwarz) und Jak2<sup>-/-</sup> (blau) MEFs wurden mit TRAIL (100 ng/ml) in der Gegenwart von CHX (100 ng/ml) für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

Ein zusätzlicher Nachweis von Apoptose durch die Visualisierung von Spaltprodukten der Caspasen und deren Substrate sollte schließlich die protektive Funktion von Jak2 während des TRAIL/DR4/5-vermittelten Signalmechanismus bestätigen und den Wirkmechanismus von Jak2 klären. In einer Inkubationskinetik von Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit TRAIL – in der Anwesenheit von Cycloheximid – wurden durch die Extraktion der gesamten Proteine und einer anschließenden Western-Blot-Analyse die Spaltung der Caspase-3 und deren Substrat PARP dargestellt. Demzufolge war in Wildtyp-MEFs und Jak2-defizienten MEFs Apoptose induziert (Abb. 4.14). Nach 16 sowie 24 h wurde in beiden Zelltypen Caspase-3 gespalten, wodurch zusätzlich die gesplattene Form von PARP entstand. Wie zu erwarten waren auch hier Wildtyp-Zellen gegenüber Jak2-defizienten Zellen effizienter vor Apoptose geschützt. Überraschend war nach 48 h die Anzahl aktiver Caspase-3 deutlich reduziert.

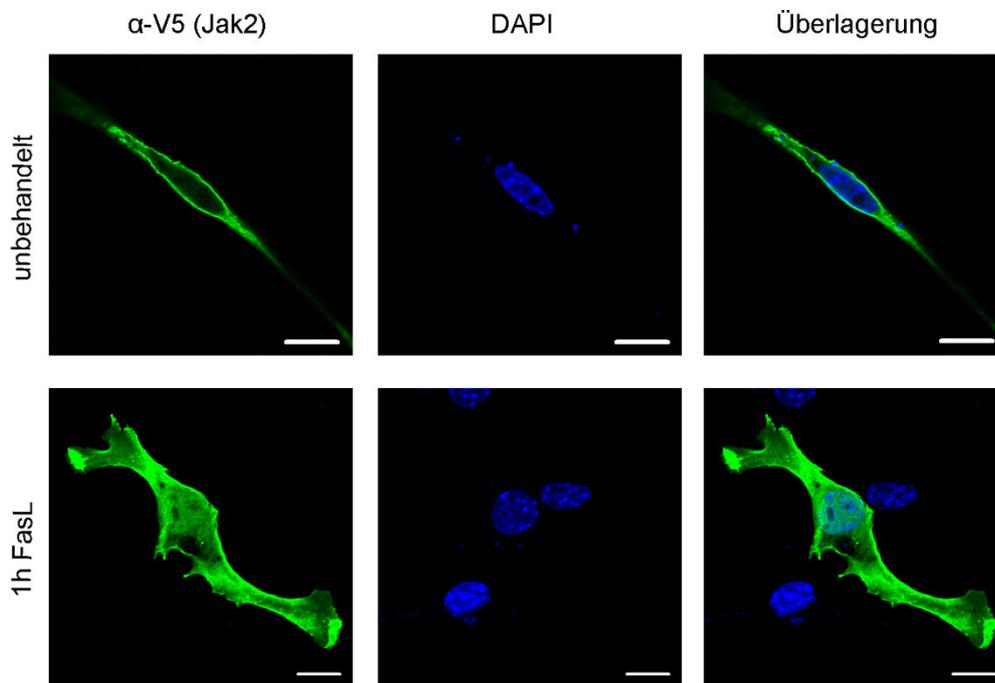


**Abb. 4.14 Aktivierung von Caspasen in TRAIL stimulierten murinen Fibroblasten.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus TRAIL (100 ng/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs in der Gegenwart von CHX (100 ng/ml). Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für PARP, Caspase-3 und β-Aktin (Lade-Kontrolle).

Folglich besitzt Jak2 eine anti-apoptotische Funktion während des TRAIL/DR4/5-induzierten Signalmechanismus. Die identifizierte protektive Funktion von Jak2 ist somit nicht auf den FasL-induzierten Signalmechanismus beschränkt, sondern ist während der Signalweiterleitung der gesamten Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie essentiell.

#### 4.1.4 Die Lokalisation von Jak2 während der Apoptose

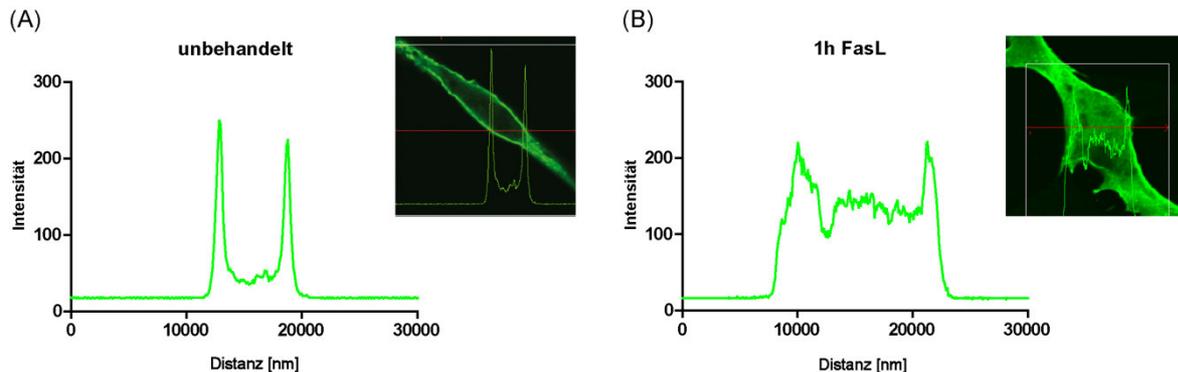
Die als Rezeptor prä-assoziert vorliegende Tyrosin-Kinase Jak2 ist hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert (Keil et al., 2014; Villarino et al., 2015). Dennoch beschrieben Vorherige Publikationen Funktionen von Jak2 in weiteren Kompartimenten der Zelle (Dawson et al., 2009; Takeshita et al., 1997). Dabei sind die Art der Zelle sowie der Jak2-assoziierte und aktivierte Rezeptor von großer Bedeutung. Bisher konnte Jak2 eine Rolle im Nukleus oder im Zytoplasma zugesprochen werden (Dawson et al., 2009). Da zuvor eine protektive Funktion von Jak2 innerhalb der Apoptose noch nicht beschrieben wurde, ist eine Aufklärung der Lokalisation nach Induktion von Apoptose von großem Interesse. Um Jak2 innerhalb einer Zelle zu visualisieren wurden Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit einem V5-Tag-tragenden Jak2 rekonstituiert. Nach Apoptose Induktion durch FasL wurde die subzelluläre Lokalisation analysiert. In unbehandelten murinen Fibroblasten war Jak2 überwiegend an der Zellmembran assoziiert (Abb. 4.15). 1 h nach FasL Zugabe veränderte sich die Lokalisation von Jak2. Durch die zusätzliche Färbung des Nukleus mit DAPI wurde deutlich, dass Jak2 seine ursprüngliche Assoziation der Zellmembran verlässt und zunehmend im Bereich des Nukleus vor zu finden war.



**Abb. 4.15 Änderung der Lokalisation von Jak2 nach FasL Stimulation.** Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit pEF6-Jak2-V5 transfiziert um Jak2-V5 (C-terminales V5-Tag) in den Zielzellen zu exprimieren. 24 h nach der Transfektion und 1 h nach FasL Inkubation erfolgte die Lokalisation von Jak2 durch die Visualisierung von Jak2-V5 (Grün) und DAPI (Blau) (Maßstabsbalken = 10 µm).

Die in Abbildung 4.15 dargestellte Änderung der Lokalisation wurde anschließend genauer analysiert. Ein Querschnitt durch die Aufnahme unbehandelter Fibroblasten

zeigte eine hohe Intensität der Jak2-spezifischen Fluoreszenz in Regionen der Zellmembran und eine Abnahme der Intensität in Bereichen des Nukleus und des Zytosols (Abb. 4.16 (A)). Demgegenüber war nach FasL-Zugabe eine deutliche Änderung erkennbar (Abb. 4.16 (B)). Der Querschnitt einer FasL-behandelten Zelle zeigte eine geringere Fluoreszenz-Intensität in den Bereichen der Plasmamembran. Zu beachten ist die deutliche Zunahme der Fluoreszenz in Regionen des Nukleus wodurch die in Abbildung 4.15 dargestellte Translokation von Jak2 in Bereiche des Nukleus bestätigt wurde.



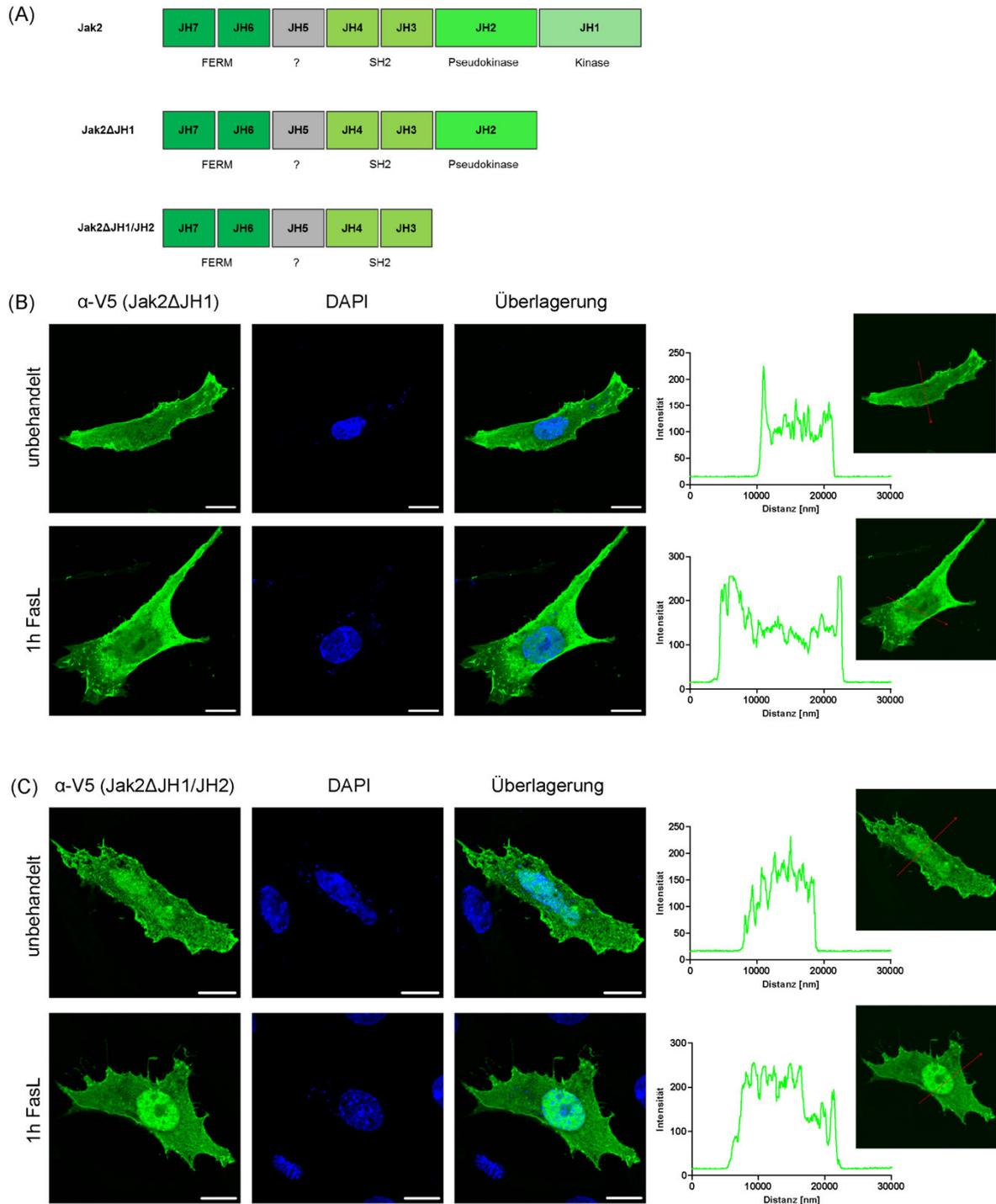
**Abb. 4.16 Analyse der subzellulären der Lokalisation von Jak2.** Die Histogramme repräsentieren die Lokalisation von Jak2 anhand der Querschnitte der dargestellten Aufnahmen (aus Abb. 4.15) (A) ohne Stimulus sowie nach (B) 1 h FasL Stimulation. Dargestellt sind die Intensität der Fluoreszenz auf der Ordinate und die Distanz auf der Abszisse.

Die Zellmembranständige Lokalisation von Jak2 wird primär durch die FERM-Domäne des Proteins bestimmt (Hilkens et al., 2001; Zhou et al., 2001). In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte eine Gerüst-bildende Funktion („scaffold-function“) von Jak2 identifiziert werden, die für die Integrität des IFNGR-Komplexes essentiell ist (Keil et al., 2014). Hier wurde zudem gezeigt, dass die Pseudokinase-Domäne (JH2) bedeutend für die Lokalisation an der Plasmamembran ist. Um Domänen zu identifizieren die zur nukleären Lokalisation von Jak2 beitragen wurde eine Analyse mit Jak2-Trunktionsmutanten durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.17 (A) dargestellt, besteht Jak2 aus der Kinase-, Pseudokinase-, SH2- und der FERM-Domäne, die aus sieben JH-Domänen aufgebaut werden (O’Shea et al., 2002). Der abgebildeten Trunktionsmutante Jak2 $\Delta$ JH1 fehlt die Kinase-Domäne, wohingegen der Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 Mutante die Kinase- sowie die Pseudokinase-Domäne fehlen. Um das Lokalisationsverhalten der Jak2-Trunktionsmutanten zu charakterisieren wurden Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit den kodierenden Plasmiden transfiziert die Expression der Proteine verifiziert und anschließend FasL zugegeben. In unbehandelten Zellen wies Jak2 $\Delta$ JH1 eine partielle subzelluläre Lokalisation an der Plasmamembran auf und lag in größeren Mengen innerhalb des Zytosols vor (Abb. 4.17(B)). Jedoch war die durch FasL-induzierte nukleäre Lokalisation von Jak2 unverändert. Die Färbung des Nukleus verdeutlicht, dass Jak2 in den Bereich des Nukleus translozierte. Demgegenüber war Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 bereits im naiven Zustand der Zelle nukleär lokalisiert. Zudem trat das trunkierte Jak2 im Zytosol auf. Die Plasmamembran-assoziierte Lokalisation von Jak2 war jedoch vollständig aufgehoben. Nach Induktion von Apoptose durch FasL wurde die Lokalisation von Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 im Bereich des Nukleus intensiver. Eine Translokation weiterer Jak2 $\Delta$ JH1/JH2-Moleküle ist demnach vorstellbar.

Folglich unterstützen die Kinase- und die Pseudokinase-Domäne die membranständige

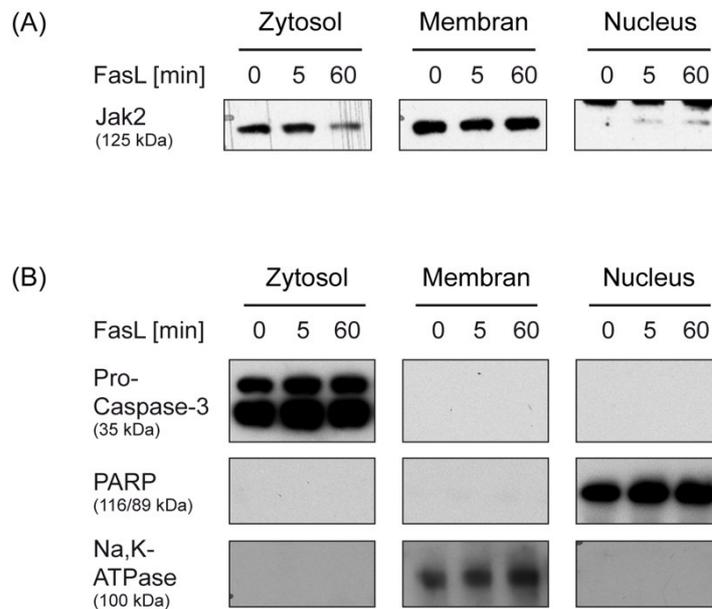
Assoziation von Jak2, besitzen jedoch keinen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation. Hierbei sind vermutlich die FERM- oder die SH2-Domäne essentiell.



**Abb. 4.17 Subzelluläre Lokalisation von Jak2-Trunktionsmutanten.** (A) schematische Darstellung der Domänenstruktur von Jak2 (Oben), Jak2ΔJH1 (Mitte) und Jak2ΔJH1/JH2 (Unten). Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit (B) pEF6-Jak2ΔJH1-V5 oder (C) pEF6-Jak2ΔJH1/JH2-V5 transfiziert um Jak2ΔJH1-V5 bzw. Jak2ΔJH1/JH2-V5 in den Zielzellen zu exprimieren. 24 h nach der Transfektion und 1 h nach FasL Inkubation erfolgte die Lokalisation von Jak2 durch die Visualisierung von Jak2-V5 (Grün) und DAPI (Blau) analysiert; (C-terminales V5-Tag), (Maßstabsbalken = 10 μm).

Um abschließend die nukleäre Translokation von Jak2 zu bestätigen wurde eine zusätzliche Methode angewendet. Proteine aus unbehandelten und FasL stimulierten murinen Fibroblasten wurden durch die fraktionierte Zellyse in nukleäre, membranständige und zytosolische Bestandteile aufgetrennt. Anschließend wurde Jak2

mit Hilfe der Western-Blot-Analyse in den verschiedenen Fraktionen visualisiert. Eine zusätzliche Visualisierung von spezifischen Marker-Proteinen diente als Identifizierung und Nachweis für die Reinheit der einzelnen Fraktionen. So wurde Caspase-3 ausschließlich in der zytosolischen, die Na,K-ATPase in der Fraktion der Membran und PARP in der nukleären Fraktion detektiert (Abb. 4.18 (B)). Jak2 befand sich in unbehandelten Fibroblasten ausschließlich an den Membranen und im Zytosol (Abb. 4.18 (A)). Bereits 5 min nach Zugabe von FasL war Jak2 in der Fraktion des Nukleus detektierbar. Indessen blieb die Lokalisation an der Membran und im Zytosol erhalten. Nach 60 min war die Menge von Jak2 innerhalb der Nukleus-Fraktion signifikant gestiegen. Demgegenüber war eine geringe Reduktion von Jak2 in der zytosolischen Fraktion erkennbar. Dagegen blieb auch nach 60 min eine membranständige Lokalisation von Jak2 erhalten.



**Abb. 4.18 Bestimmung der Jak2 Lokalisation durch subzelluläre Fraktionierung.** Subzelluläre Fraktionen aus nicht behandelten oder für 5 min und 60 min FasL (20 ng/ml) behandelten Jak2<sup>+/+</sup> MEFs. Anschließend erfolgte die Visualisierung spezifischer Proteine anhand der Western-Blot-Methode. Dargestellt sind Western Blots für (A) Jak2, (B) Pro-Caspase-3 (Marker-Zytosol), Na,K-ATPase (Marker-Membran) und PARP (Marker-Nukleus).

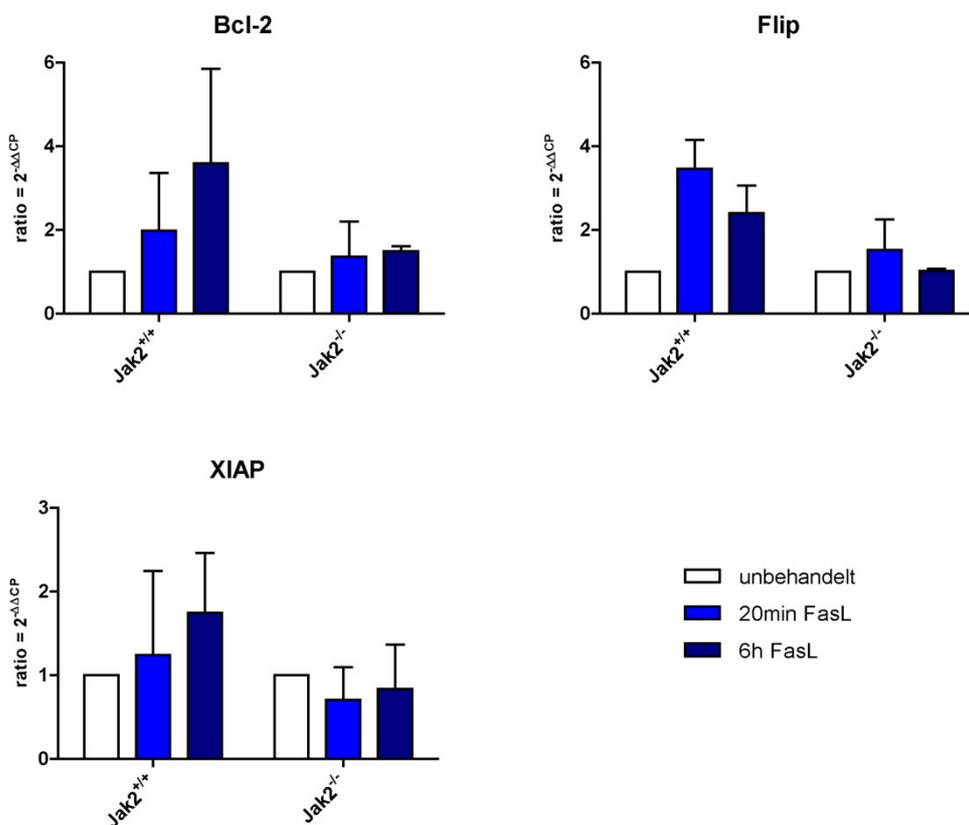
Somit bestätigt die subzelluläre Fraktionierung, dass Jak2 während der FasL-induzierten Apoptose in den Nukleus transloziert und höchstwahrscheinlich eine nukleäre Funktion ausübt.

#### 4.1.5 Die protektive Funktion von Jak2 in Zusammenhang mit der Induktion apoptotisch-relevanter Zielgene

Der regulatorische Einfluss von pro- und anti-apoptotischen Faktoren ist für das homöostatische Gleichgewicht sterbender und lebender Zellen essentiell (Portt et al., 2011). Nach Einleitung des programmierten Zelltods durch Todesliganden ist dieser durch die Induktion anti-apoptotischer Zielgene streng reguliert (Kataoka et al., 2000). Aufgrund der zuvor identifizierten Änderung der Lokalisation von Jak2 in den Nukleus, sollte eine nukleäre Funktion in Zusammenhang mit der Induktion bzw. Transkription von apoptotischen Ziel-Genen genauer untersucht werden.

#### 4.1.5.1 Expression anti-apoptotischer Faktoren

Anti-apoptotische Faktoren sind Regulatoren apoptotischer Initiator-Proteine (Schulze-Osthoff et al., 1998). Bcl-2, Flip und XIAP können während der Signalweiterleitung der Apoptose induziert werden um Bax und die Aktivierung der Caspase-8 bzw. der Caspase-3 zu blockieren (Cheng et al., 2001; Deveraux et al., 1997; Irmeler et al., 1997). Um die Expression der mRNA dieser anti-apoptotischen Faktoren zu untersuchen wurde Apoptose in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit FasL induziert und die gesamte RNA extrahiert. Die Quantifizierung der isolierten mRNA erfolgte anhand der Real-Time-PCR-Methode. Nach Induktion von Apoptose durch FasL wurde in Wildtyp-Zellen die Expression von Bcl-2 hochreguliert (Abb. 4.19). Bereits nach 20 min nahm die Anzahl exprimierter Bcl-2 mRNA um 100% zu und stieg nach 6 h um einen weiteren Faktor an. Demgegenüber zeigten  $Jak2$ -defiziente murine Fibroblasten nach FasL-Zugabe keine Hochregulation der mRNA von Bcl-2. Ebenfalls wurde die mRNA des Caspase-8 antagonisierenden Flip 20 min nach FasL Stimulation in  $Jak2^{+/+}$  MEFs stark induziert. Nach 6 h FasL-Zugabe war die Menge an Flip mRNA jedoch bereits reduziert. Dagegen war in  $Jak2$ -Knockout Fibroblasten wiederum keine zusätzliche Expression der Flip mRNA messbar. Außerdem wurde XIAP in  $Jak2$ -defizienten Fibroblasten nicht hochreguliert, dagegen konnte in Wildtyp-Zellen eine Expression von XIAP nachgewiesen werden. Nach Stimulation des FasL wird mRNA (Bcl-2, Flip und XIAP) neu induziert, welche im Laufe der induzierten Apoptose überdies zunimmt.

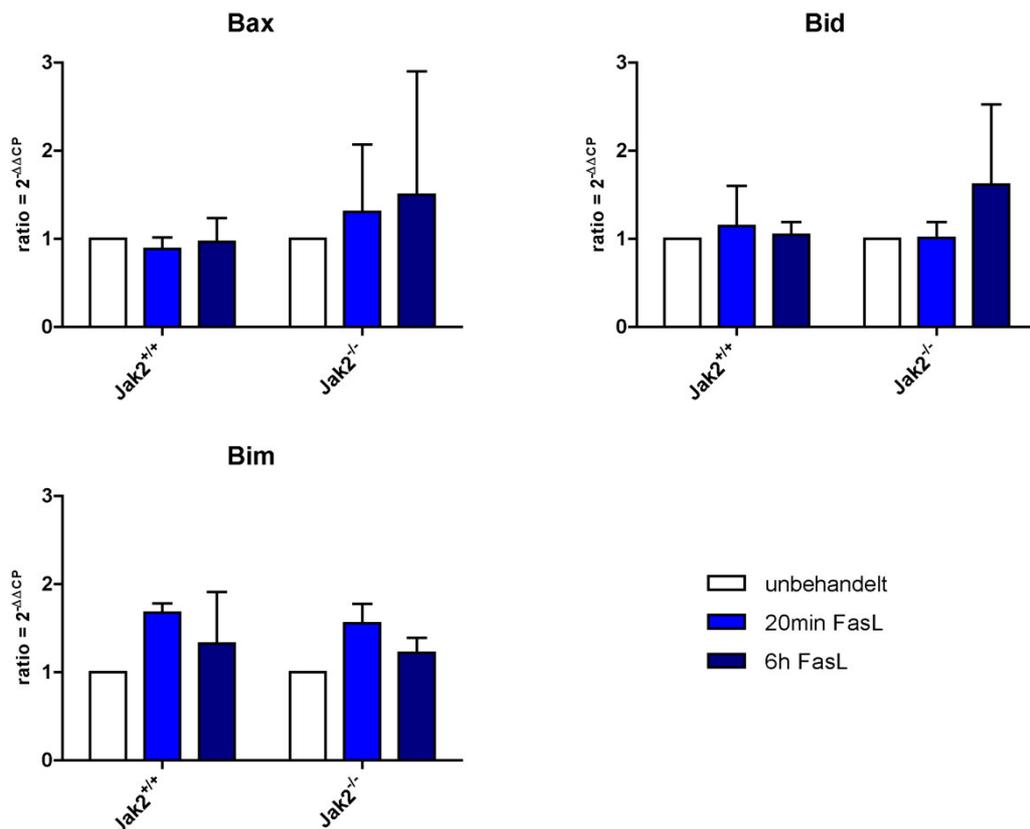


**Abb. 4.19 Expression anti-apoptotischer Faktoren nach FasL Stimulation in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs.**  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden unstimuliert gelassen oder mit FasL (20 ng/ml) für 20 min oder 6 h behandelt. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese, erfolgte die Analyse durch eine Real-Time PCR. Die Quantifizierung und Auswertung wurde anhand der  $2^{-\Delta\Delta CP}$  Methode (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Die Ratio beschreibt das Verhältnis zu nicht behandelten Proben. Alle Werte wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin mRNA normiert.

Zusammenfassend werden mRNAs anti-apoptotischer Faktoren während der FasL-induzierten Apoptose hochreguliert. Durch einen Mangel an Jak2 findet die Induktion der Expression dieser anti-apoptotischen Gene jedoch nicht statt.

#### 4.1.5.2 Expression pro-apoptotischer Faktoren

Pro-apoptische Faktoren sind für die Ausführung des programmierten Zelltodes essentiell. So werden Bax, Bid und Bim während der Signalweiterleitung der Apoptose induziert um anti-apoptotische Faktoren zu hemmen und die Permeabilisation des Mitochondriums einzuleiten (Kaufmann et al., 2012). Um die Expression der mRNAs dieser pro-apoptischen Faktoren zu untersuchen, wurde Apoptose in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit FasL induziert und die gesamte RNA extrahiert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte anhand der Real-Time-PCR-Methode. Interessanterweise zeigten  $Jak2^{-/-}$  MEFs nach 6 h der Apoptose-Induktion eine leichte Zunahme der Expression der mRNA von Bax und Bid, die jedoch gegenüber  $Jak2^{+/+}$  MEFs nicht signifikant war (Abb. 20). Demgegenüber wurde Bim sowohl in Wildtyp-Fibroblasten als auch in  $Jak2$ -defizienten Fibroblasten zu gleichen Expressionsleveln reguliert.

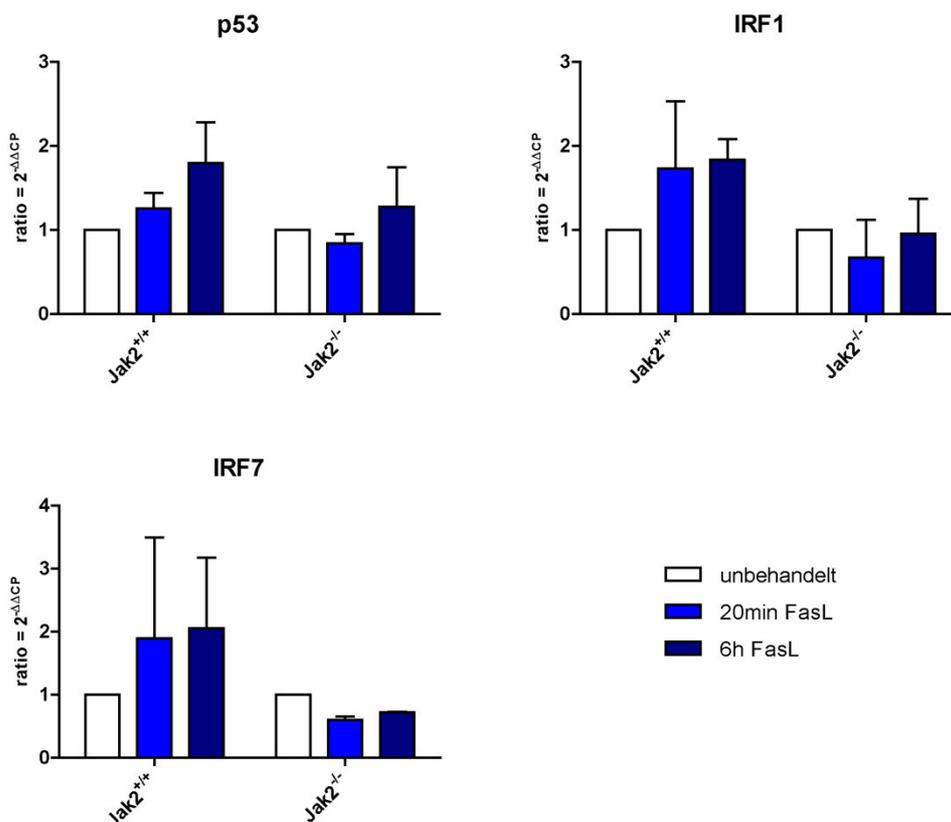


**Abb. 4.20 Expression pro-apoptotischer Faktoren nach FasL Stimulation in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs.**  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden unbehandelt gelassen oder mit FasL (20 ng/ml) für 20 min oder 6 h behandelt. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese, erfolgte die Analyse durch Real-Time PCR. Die Quantifizierung und Auswertung wurde anhand der  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  Methode (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Die Ratio beschreibt das Verhältnis zu nicht behandelten Proben. Alle Werte wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin mRNA normiert.

Somit werden in Fibroblasten zusätzlich zu der basalen Expression durch eine Induktion der FasL-vermittelten Apoptose keine zusätzliche mRNA von pro-apoptischen Faktoren hochreguliert.

#### 4.1.5.3 Expression Transkriptions-regulierender Gene

Neben anti- und pro-apoptischen Faktoren nehmen ebenfalls Transkriptionsfaktoren eine bedeutsame Rolle während der Apoptose ein (Zeiss, 2003). Einige Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression pro-apoptischer Faktoren, andere wiederum die Expression anti-apoptischer Faktoren (Fan et al., 2010; Rudolph et al., 2000). Infolgedessen ist die Regulation der Expression von Transkriptionsfaktoren für die Apoptose von großer Bedeutung. Um die Expression der mRNA der Transkriptionsfaktoren p53, IRF1 und IRF7 zu untersuchen wurde Apoptose in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit FasL induziert und die gesamte RNA extrahiert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte anhand der Real-Time-PCR-Methode. Auffallend war, wie in Abbildung 4.21 dargestellt, dass p53, IRF1 sowie IRF7 dieselben Expressionsmuster aufwiesen. Demnach wurden alle untersuchten Transkriptionsfaktoren während der FasL-induzierten Apoptose in Wildtyp-Zellen kontinuierlich hochreguliert. Obgleich  $Jak2$ -defiziente Zellen keine Induktion der Menge der mRNA von IRF1 und IRF7 zeigten, war eine Hochregulation von p53 zu erkennen, die allerdings gegenüber Wildtyp-Zellen deutlich reduziert war.



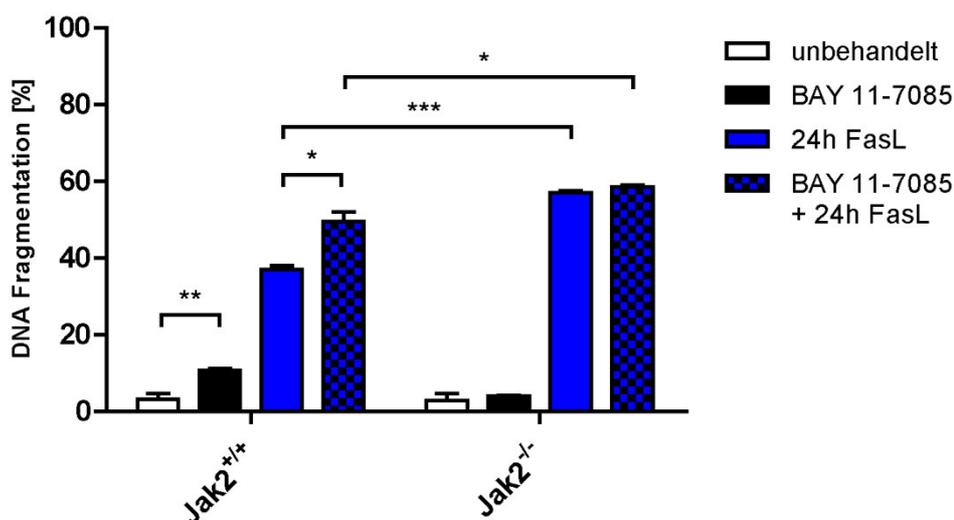
**Abb. 4.21 Expression von Transkriptionsfaktoren nach FasL Stimulation in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs.**  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden unbehandelt gelassen oder mit FasL (20 ng/ml) für 20 min oder 6 h behandelt. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese, erfolgte die Analyse durch die Real-Time-PCR-Methode. Die Quantifizierung und Auswertung wurde anhand der  $2^{-\Delta\Delta CP}$  Methode (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Die Ratio beschreibt das Verhältnis zu nicht behandelten Proben. Alle Werte wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin mRNA normiert.

Dies belegt, dass die Expression transkriptions-regulierender Gene während der FasL-induzierten Apoptose hochreguliert wurde. Ohne Jak2 war jedoch die Induktion der Expression von Transkriptionsfaktoren gehemmt.

Zusammenfassend führt eine Defizienz von Jak2 zu einem Fehlen der Expression anti-apoptotischer und Transkriptions-regulierender Gene. Möglicherweise transloziert Jak2 nach FasL-Stimulation in den Nukleus und reguliert die Expression anti-apoptotischer Gene um Apoptose entgegenzuwirken.

#### 4.1.5.4 Untersuchung einer Interaktion von Jak2 und NF-κB

Neben der Aktivierung der zur Apoptose führenden Signalwege aktivieren einige Todesrezeptoren (z.B. TNFR1) Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, die eine Neusynthese anti-apoptotischer Faktoren bewirken und daher für eine protektive Antwort von großer Bedeutung sind (Liu et al., 1996). Wie innerhalb dieser Dissertation beschrieben, ist Jak2 für die Regulation anti-apoptotischer Gene (Bcl-2, Flip und XIAP) während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose wichtig. Daher sollte im Folgenden eine Verbindung dieser Funktion mit dem anti-apoptotischen NF-κB-Signalweg analysiert werden. Aufgrund dessen wurde der Anteil apoptotischer Zellen von Wildtyp-MEFs und Jak2-defizienter MEFs nach einer Inhibierung des NF-κB-Signalweges durch BAY 11-7085 (Pierce et al., 1997) und zusätzlicher Induktion von Apoptose durch FasL bestimmt. Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, führte die Blockade von NF-κB zu einer signifikanten Zunahme an apoptotischen Zellen in Wildtyp-Zellen jedoch nicht in Jak2-defizienten Zellen. Auch nach Induktion extrinsischer Apoptose durch FasL wurde durch die vorherige Inhibition ausschließlich in Wildtyp-Zellen die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant gesteigert. Dennoch zeigten Jak2-Knockouts nach FasL Stimulation weiterhin eine größere Population an apoptotischen Zellen. Eine Analyse der Expression von NF-κB-abhängigen anti- oder pro-apoptotischen Genen nach einer BAY 11-7085 Behandlung zeigte keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



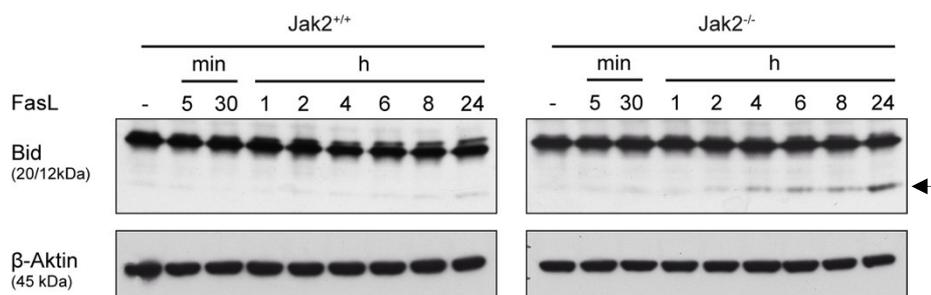
**Abb. 4.22** Inhibition von NF-κB während der FasL vermittelten Apoptose in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit BAY 11-7085 (5 μM) für 20 min vorinkubiert und anschließend mit FasL (20ng/ml) für 24 h stimuliert. Apoptose wurde anhand der DNA Fragmentation bestimmt; \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

#### 4.1.6 Der Einfluss von Jak2 auf die Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie bilden einen Hauptteil der Apoptose-beteiligten Faktoren und umfassen sowohl anti- als auch pro-apoptotische Proteine (Garcia-Saez, 2012). Jak2 ist wichtig für die Genregulation von der Bcl-2 (siehe Abschnitt 4.1.5.1). Eine Auswirkung von Jak2 auf die Expression oder auf post-translationale Modifikationen ist somit anzunehmen.

##### 4.1.6.1 Die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bid

Das pro-apoptotische Bid ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie und verbindet, nach Spaltung in seine aktive Form tBid und die Aktivierung von Bax und Bak die extrinsische mit der intrinsischen Apoptose (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits identifiziert werden, dass Jak2-defiziente MEFs eine höhere Aktivität von Caspase-8 und keine Hochregulation des Caspase-8-inhibierenden Proteins Flip aufweisen. Dadurch wurde deutlich, dass Jak2 einen Einfluss auf diese Signalwege ausübt. Daher ist eine Auswirkung der protektiven Funktion von Jak2 auf die Aktivierung von Bid denkbar. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs Apoptose durch FasL induziert. Durch die Extraktion der gesamten Proteine zu diversen Zeitpunkten und einer anschließenden Western-Blot-Analyse sollte die Aktivierung von Bid durch den Nachweis von tBid untersucht werden. Sowohl in Wildtyp- als auch in Jak2-defizienten MEFs war, wie nach der in Abschnitt 4.1.1.3 nachgewiesenen Spaltung der Caspase-8 zu erwarten, aktives tBid induziert (Abb. 4.23). Nach 8 h und 24 h lag Bid in Wildtyp-Zellen in seiner gespaltenen Form tBid vor. Jedoch zeigte sich, dass Wildtyp- gegenüber Jak2-defizienten Zellen effizienter vor Apoptose geschützt waren. So war tBid in Jak2-defizienten Fibroblasten bereits nach 4 h aktiv, nahm im Verlauf der Inkubationskinetik massiv zu und war nach 24 h FasL-Zugabe signifikant in der Menge zu Wildtyp-Zellen erhöht.

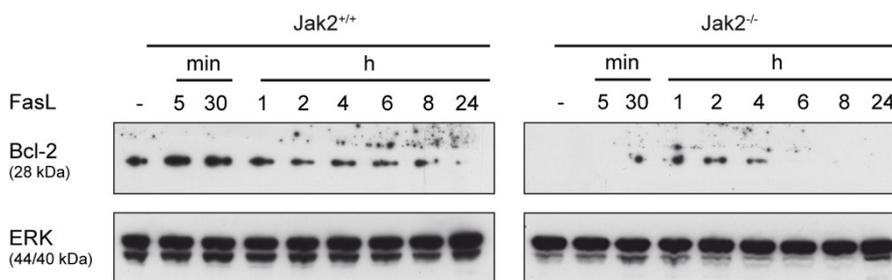


**Abb. 4.23 Aktivierung von Bid in FasL-stimulierten murinen Fibroblasten.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus FasL (20 ng/ml) stimulierten  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für Bid und  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle). Der Pfeil markiert tBid (12kDa).

Somit ist die Funktion von Jak2 für die Regulation der Aktivierung von Bid essentiell.

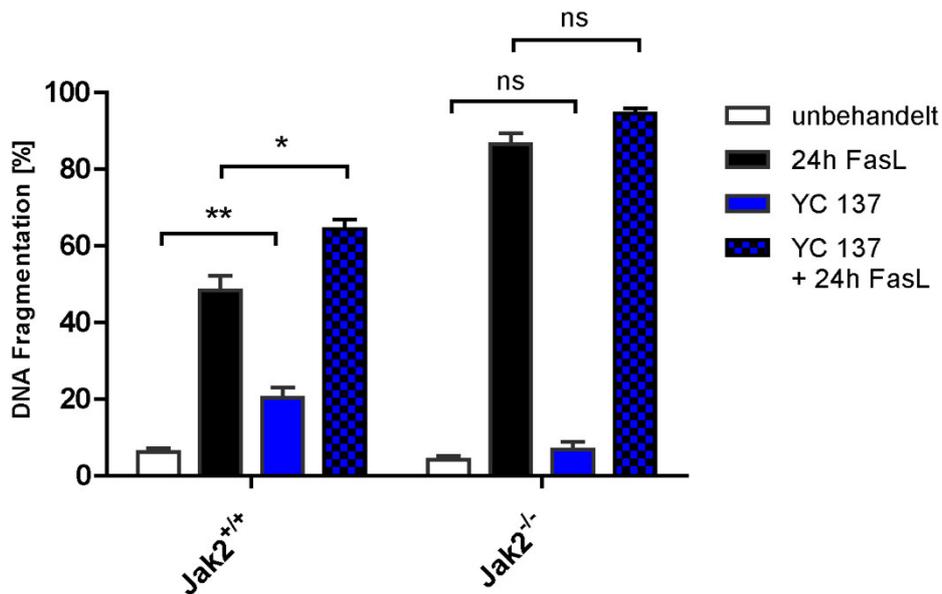
#### 4.1.6.2 Charakterisierung der protektiven Funktion von Jak2 im Zusammenhang mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2

Das Familien-namensgebende anti-apoptotische Protein Bcl-2 ist für die Inhibition der Poren-bildenden Faktoren Bax und Bak und für den Schutz der Mitochondrien verantwortlich (Cheng et al., 2001). Während der FasL-induzierten Apoptose ist in Abwesenheit von Jak2 die Expression von Bcl-2 nicht reguliert. Ein Effekt von Jak2 auf die Protein-Expression von Bcl-2 sollte nachstehend aufgeklärt werden. Hierzu wurde eine Inkubationskinetik mit FasL in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs angefertigt. Durch eine Protein-Extraktion und die nachfolgende Visualisierung von Bcl-2 durch das Western-Blot-Verfahren sollte schließlich Bcl-2 nachgewiesen werden. Durch Einleitung der Apoptose nahm die Menge an Bcl-2 neben der bereits basalen Expression in Wildtyp-Zellen zunächst (bis 1 h nach FasL Zugabe) zu (Abb. 4.24). Im Zuge des fortschreitenden Zelltodes reduzierte sich dennoch die Menge an Bcl-2 kontinuierlich (1 h bis 24 h). Bemerkenswerterweise war die Anzahl an Bcl-2 in Abwesenheit von Jak2 stark reduziert. So zeigten Jak2-defiziente Fibroblasten bereits basal weniger Bcl-2-Expression und im Laufe der Apoptose einen Anstieg von Bcl-2 (30 min bis 4 h). Allerdings war dieser gegenüber Wildtyp-Fibroblasten stark reduziert.



**Abb. 4.24 Bcl-2 Expression im Verlauf einer Inkubationskinetik mit FasL.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus FasL- (20 ng/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für Bcl-2 und  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle).

Die Aktivität von Bcl-2 während der FasL-vermittelten Apoptose sollte durch die Zugabe des Bcl-2 Inhibitors YC 137 genauer charakterisiert werden (Real et al., 2004). Aufgrund dessen wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit YC 137 für 1 h prä-inkubiert und anschließend nicht oder mit FasL für weitere 24 h behandelt. Darauf folgte die Bestimmung der apoptotischen Zellpopulation. Demnach führte die Blockade der durch Bcl-2-vermittelten anti-apoptotischen Antwort zu einer signifikanten Zunahme an apoptotischen Zellen in Wildtyp-Zellen (Abb. 4.25). Die apoptotische Zellpopulation in Jak2-defizienten Zellen blieb jedoch unverändert. Auch während der FasL-induzierten extrinsischen Apoptose wurde die Anzahl apoptotischer Zellen nach Inhibition von Bcl-2 ausschließlich in Wildtyp-Zellen signifikant gesteigert. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass Jak2 Knockout MEFs durch die FasL-induzierte Apoptose einen höheren Anteil apoptotischer Zellen aufwiesen.



**Abb. 4.25 Inhibition von Bcl-2 während der FasL vermittelten Apoptose in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit YC 137 (1 µM) für 24 h vorbehandelt und anschließend mit FasL (20 ng/ml) für 24 h stimuliert. Apoptose wurde anhand der DNA Fragmentation bestimmt; \*p<0,05, \*\*p<0,005

Folglich ist die protektive Funktion von Jak2 mit der anti-apoptotischen Aktivität von Bcl-2 und mit der Regulierung des Zelltod-fördernden tBid eng verknüpft. Schlussfolgernd beeinflusst Jak2 somit das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Faktoren.

#### 4.1.7 Jak2 und Mitochondrien

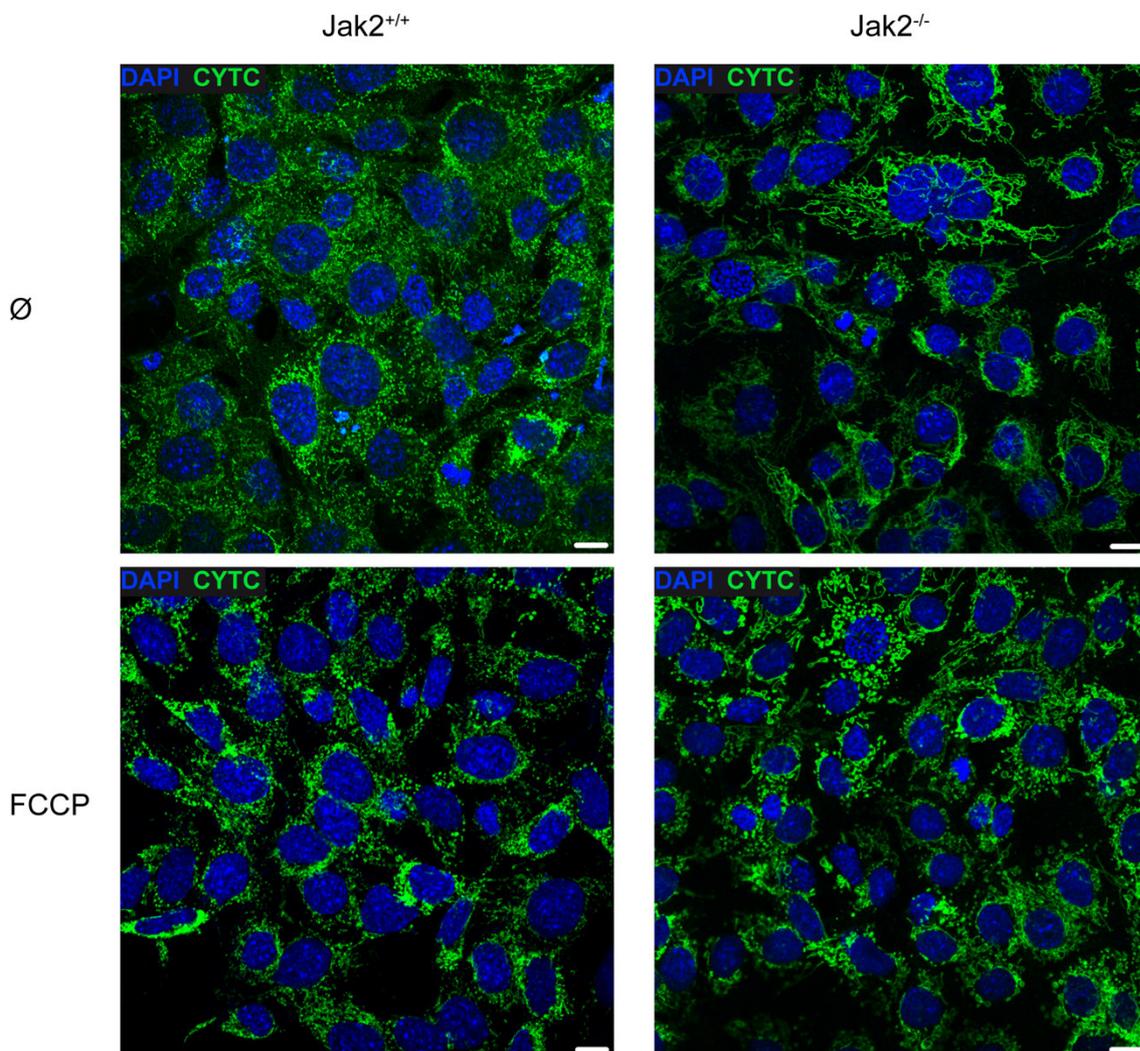
Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Bid und Bcl-2 für die Regulierung und das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Signalen während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose essentiell sind (Chipuk and Green, 2008). Zusätzlich wurden für die Mitglieder der Bcl-2-Familie ebenfalls wichtige Funktionen innerhalb der Fusions- und Fissions-Maschinerie der Mitochondrien beschrieben (Rolland and Conradt, 2010). Der andauernde abwechselnde Prozess von Fusion und Fission der Mitochondrien ist essentiell für den mitochondrialen Metabolismus und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion (Scorrano, 2013). Interessanterweise konnte innerhalb dieser Dissertation bereits bewiesen werden, dass Jak2 einen bedeutenden Einfluss auf die Expression von Bcl-2 und die Aktivierung von Bid ausübt. Ein Einfluss von Jak2 auf die Mitochondrien sowie auf deren Funktionalität ist somit zu vermuten.

##### 4.1.7.1 Darstellung der Morphologie der Mitochondrien

Eine Visualisierung der Mitochondrien in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs sollte zunächst den zuvor identifizierten Einfluss von Jak2 auf die Mitochondrien-assoziierten Faktoren in einem Zusammenhang mit der mitochondrialen Morphologie analysieren. Hierzu wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs fixiert, die Mitochondrien durch die Verwendung eines Cytochrom C-spezifischen Antikörpers visualisiert und durch konfokale Mikroskopie analysiert. Die Mitochondrien-Membran-depolarisierende Eigenschaft von Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) diente nach Zugabe zur Induktion der Fission um additiv die Funktionalität der Mitochondrien zu untersuchen. Die Färbung von Cytochrom C zeigte in Wildtyp-Zellen eine typisch verzweigte polymere Struktur der

Mitochondrien (Abb. 4.26). Die Zugabe von FCCP induzierte die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran was sich in einem Zusammenbruch des Membranpotentials äußerte (Benz and McLaughlin, 1983). So waren in FCCP-behandelten Wildtyp-Fibroblasten überwiegend kurze Mitochondrien-Fragmente zu erkennen. Im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen besaßen Jak2-defiziente Zellen eine außergewöhnliche Morphologie der Mitochondrien. Hier zeigte die Färbung von Cytochrom C weit gestreckte tubuläre mitochondriale Strukturen, was einer sogenannten hyper-fusionierten Morphologie entspricht. Wie zuvor in Wildtyp-Fibroblasten veränderte FCCP die Morphologie der Mitochondrien der Jak2-defizienten Zellen. Andererseits führte hier FCCP weniger zu einer Bildung von kurzen Fragmenten. Durch den Einfluss von FCCP formten hyper-fusionierte mitochondriale Strukturen große „Donut“-ähnliche Ringe, die häufig eine peri-nukleäre Lokalisation aufwiesen.

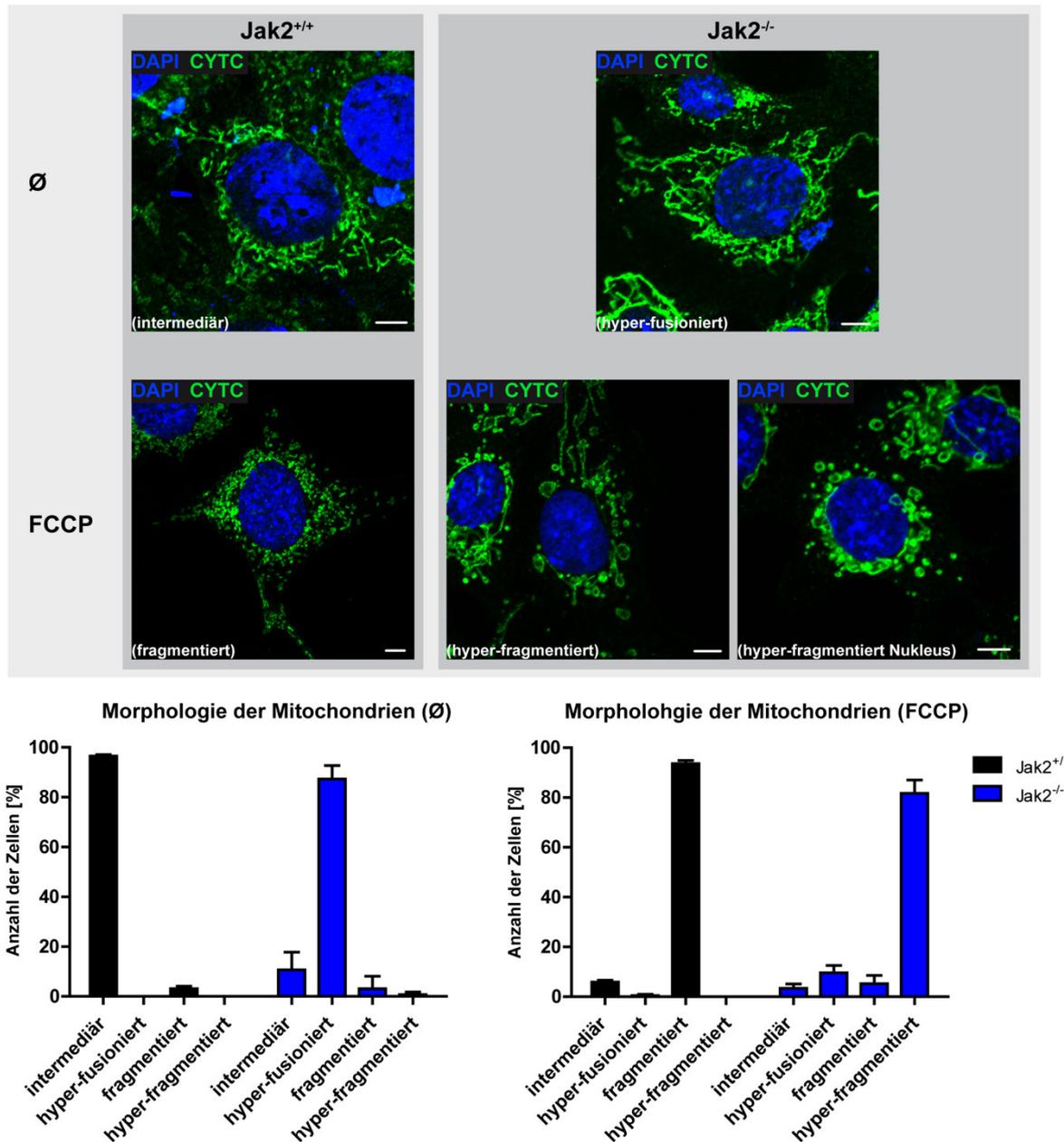
Somit wird die mitochondriale Morphologie durch die Abwesenheit von Jak2 beeinträchtigt. Um die morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp-Fibroblasten und Jak2-Knockout-Fibroblasten präzise zu analysieren, sollten die verschiedenen mitochondrialen Formen quantifiziert werden.



**Abb. 4.26** Darstellung der Mitochondrien in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs.  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden nicht oder mit FCCP (20  $\mu$ M) für 5 min behandelt, anschließend fixiert und die Mitochondrien durch einen spezifischen Cytochrom C (CYTC) Antikörper und einen sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten goat anti-Maus Antikörper visualisiert. Die Präparate wurden durch konfokale Mikroskopie analysiert. Mitochondrien (Grün) und DAPI (Blau); Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m

Hierzu wurden die beschriebenen mitochondrialen Strukturen anhand ihrer Größe in vier Gruppen kategorisiert. Wie in Abbildung 4.27 gezeigt, bildete die anhand einer Wildtyp-Zelle dargestellte „intermediäre“ Struktur eine erste Kategorie, die durch eine Länge von 2-5  $\mu\text{M}$  charakterisiert wurde. Des Weiteren galten Mitochondrien als „hyper-fusioniert“, wenn tubuläre Strukturen deutlich eine Größe von 5  $\mu\text{M}$  überschritten (Bsp. nicht behandelte  $\text{Jak2}^{-/-}$  MEFs). Durch die Behandlung mit FCCP wurden zwei weitere Kategorien gebildet. Bildeten Mitochondrien Strukturen, die geringer als 2  $\mu\text{M}$  lang waren, wie in einer Aufnahme einer FCCP stimulierten Wildtyp-Zelle dargestellt, wurden sie der Kategorie „fragmentiert“ zugeteilt. Eine letzte Gruppe bildeten „hyper-fragmentierte“ Strukturen. Wie Aufnahmen einzelner FCCP behandelter  $\text{Jak2}^{-/-}$  MEFs zeigen, wurden Mitochondrien hier zu übergroßen „Donut“-ähnlichen Formen zusammengeschlossen. Schließlich wurde die Morphologie der Mitochondrien in Zellen aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten unter Berücksichtigung der vier erläuterten Kategorien ausgezählt. Demnach bildeten, neben einem geringen fragmentierten Anteil, annähernd 100% der Wildtyp-Zellen intermediäre mitochondriale Strukturen aus. Beeindruckend hierzu wiesen in ca. 80% der  $\text{Jak2}$ -defizienten Zellen die Mitochondrien eine hyper-fusionierte Morphologie auf und lediglich 17% hatten eine intermediäre Morphologie der Mitochondrien. Durch die Behandlung mit FCCP änderte sich in beiden Zelltypen die mitochondriale Morphologie. Über 90% der Wildtyp-Zellen wiesen eine Fragmentierung der Mitochondrien auf; die Mitochondrien einer kleinen Population von Zellen blieben intermediär. Zudem traten nach FCCP-Behandlung vereinzelt Wildtyp-Zellen mit einer hyper-fusionierten Morphologie der Mitochondrien auf. Wie bereits zu erwarten, zeigten  $\text{Jak2}$ -defiziente gegenüber Wildtyp-Zellen nach Behandlung mit FCCP eine andere Morphologie der Mitochondrien. Die Mitochondrien in  $\text{Jak2}^{-/-}$  Zellen bildeten zuvor überwiegend hyper-fusionierte Strukturen die nun durch die Zugabe von FCCP in 80% der Zellen hyper-fragmentierte „Donut“-ähnliche Ringe formten. Außerdem wurden drei weitere kleine Populationen von Zellen gefunden deren Mitochondrien weiterhin eine hyper-fusionierte (ca.10%), fragmentierte (ca. 8%) oder intermediäre (ca. 2%) Morphologie besaßen.

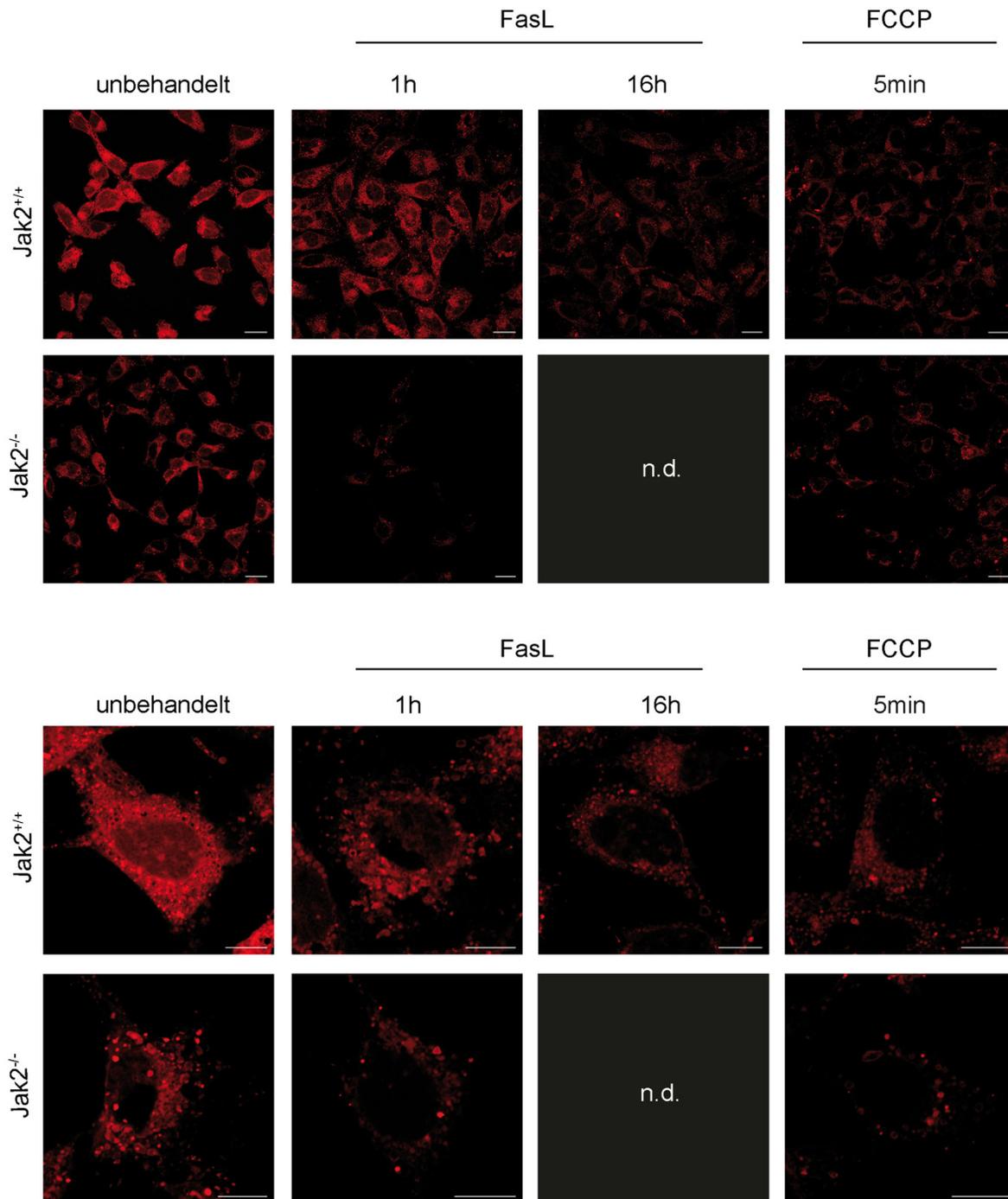
Folglich wurde bewiesen, dass ein Mangel von  $\text{Jak2}$  zu einer außergewöhnlichen Morphologie der Mitochondrien führt. Auch auf eine Behandlung mit FCCP reagieren Mitochondrien beider Genotypen der untersuchten MEFs mit unterschiedlichen Strukturen. Dies demonstriert, dass  $\text{Jak2}$  mit einem Netzwerk – bestehend aus verschiedenen mitochondrialen Faktoren – verbunden ist um so Apoptose und die mitochondriale Morphologie zu beeinflussen.



**Abb. 4.27 Analyse der Mitochondrien-Morphologie in *Jak2*<sup>+/+</sup> und *Jak2*<sup>-/-</sup> MEFs.** *Jak2*<sup>+/+</sup> und *Jak2*<sup>-/-</sup> MEFs wurden nicht oder mit FCCP (20  $\mu$ M) für 5 min behandelt, anschließend fixiert und die Mitochondrien durch einen spezifischen Cytochrom c Antikörper und einen sekundären Alexa Fluor 488-gekoppelten goat anti-Maus Antikörper visualisiert. Die Präparate wurden durch konfokale Mikroskopie analysiert (Mitochondrien (Grün) und DAPI (Blau)); Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m). Hyper-fragmentiert Nukleus = peri-nukleäre Anordnung der Mitochondrien. Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie durch Zählung 4 verschiedener Kategorien: intermediär (2-5  $\mu$ M), hyper-fusioniert ( $\geq$  5  $\mu$ M), fragmentiert ( $\leq$  2  $\mu$ M), hyper-fragmentiert (große „Donut“-Strukturen).

#### 4.1.7.2 Analyse der mitochondrialen Funktionalität

Die Funktionalität der Mitochondrien ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Zellvitalität (Sheridan and Martin, 2010). So führen pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie nach Induktion von Apoptose zu einem Ungleichgewicht der Fusions- und Fissions-Maschinerie, wodurch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran eingeleitet wird (Wasiak et al., 2007). Einen Einfluss von Jak2 auf die Induktion der Mitglieder der Bcl-2 Familie – die pro-apoptotische Faktoren inhibieren (RNA sowie Protein Ebene) – sowie auf die Morphologie der Mitochondrien konnte in den vorherigen Experimenten bereits identifiziert werden. Aufgrund dessen sollten im Folgenden die Konsequenzen der zuvor beschriebenen Phänotypen bestimmt werden. Zunächst wurde das mitochondriale Membranpotential durch eine TMRE-Färbung der Mitochondrien untersucht (Bunting, 1992). Dazu wurden unbehandelte sowie FasL- oder FCCP- (Positiv-Kontrolle) behandelte Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit TMRE angefärbt. Die Analyse der TMRE-Akkumulation erfolgte sofort durch konfokale Mikroskopie. In funktionellen Mitochondrien kann TMRE akkumulieren (Bunting, 1992). Demnach zeigten unbehandelte Wildtyp- und Jak2-defiziente Zellen eine Färbung durch TMRE, wobei letztere bereits erkennbar schwächer gefärbt waren (Abb. 4.28). Bereits innerhalb der ersten Stunde nach Induktion der Apoptose durch FasL konnte eine Abnahme der Fluoreszenz von TMRE beobachtet werden, die in Jak2-defizienten Fibroblasten deutlich schwächer war. Durch den Beginn der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran entsteht im Laufe der Zellapoptose ein niedriges Potential der inneren Mitochondrien-Membran, weshalb TMRE aus den Mitochondrien sowie der gesamten Zelle diffundiert (Bunting, 1992). Folglich nahm die Fluoreszenz-Intensität im Verlauf der fortschreitenden induzierten Apoptose kontinuierlich ab. So konnte TMRE ausschließlich in Wildtyp-Zellen nach 16 h FasL-Stimulation visualisiert werden. Dies bestätigend konnte durch das Membran-depolarisierende Reagenz FCCP ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenz von TMRE in Wildtyp- und Jak2-defizienten Zellen gefunden werden. Zusätzlich war auch hier eine deutlich schwächere Färbung von TMRE in Jak2-Knockout Zellen sichtbar.

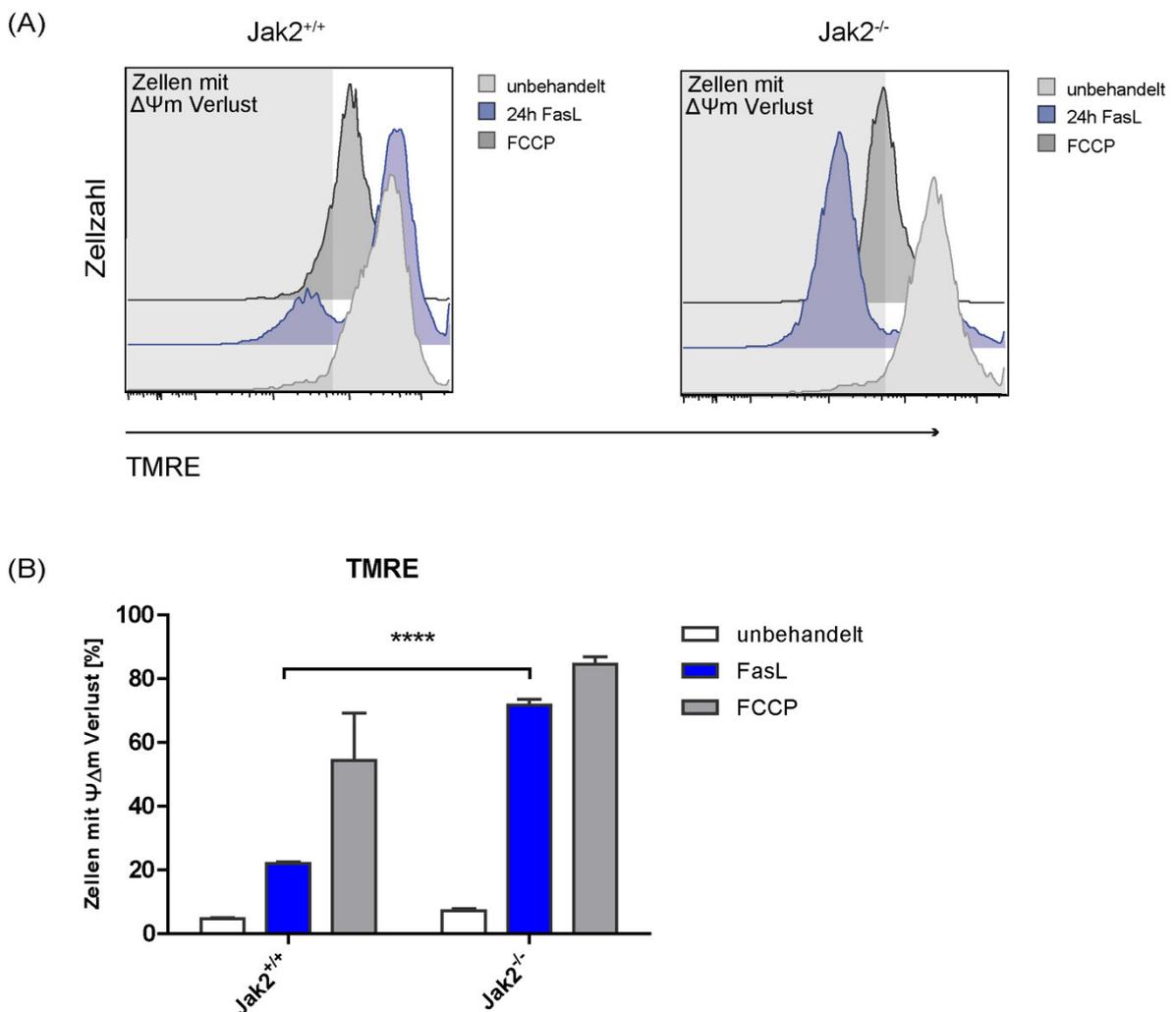


**Abb. 4.28 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials.**  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden nicht, mit FasL (20 ng/ml) oder FCCP (Positiv-Kontrolle; 20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt und anschließend Mitochondrien (Rot) durch die Akkumulation von TMRE gefärbt. Die Analyse der Intensität der roten Fluoreszenz erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m; n.d. = nicht detektierbar.

Um die Beobachtung einer stärkeren Depolarisation der inneren Mitochondrien-Membran in  $Jak2^{-/-}$  MEFs zu bestätigen, sollte die Färbung der Mitochondrien während der FasL-induzierten Apoptose quantifiziert werden. Hierzu wurden erneut nicht, FasL sowie FCCP (Positiv-Kontrolle) behandelte  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs durch eine Inkubation mit TMRE gefärbt. Die Quantifizierung der TMRE-gefärbten Mitochondrien erfolgte sofort mittels Durchflusszytometrie. In nicht beeinträchtigten Mitochondrien wird TMRE akkumuliert, wodurch die Zellen rote Fluoreszenz emittieren und quantifiziert werden können. Ohne Stimulus zeigten  $Jak2^{+/+}$  sowie  $Jak2^{-/-}$  MEFs nahezu ausschließlich TMRE gefärbte

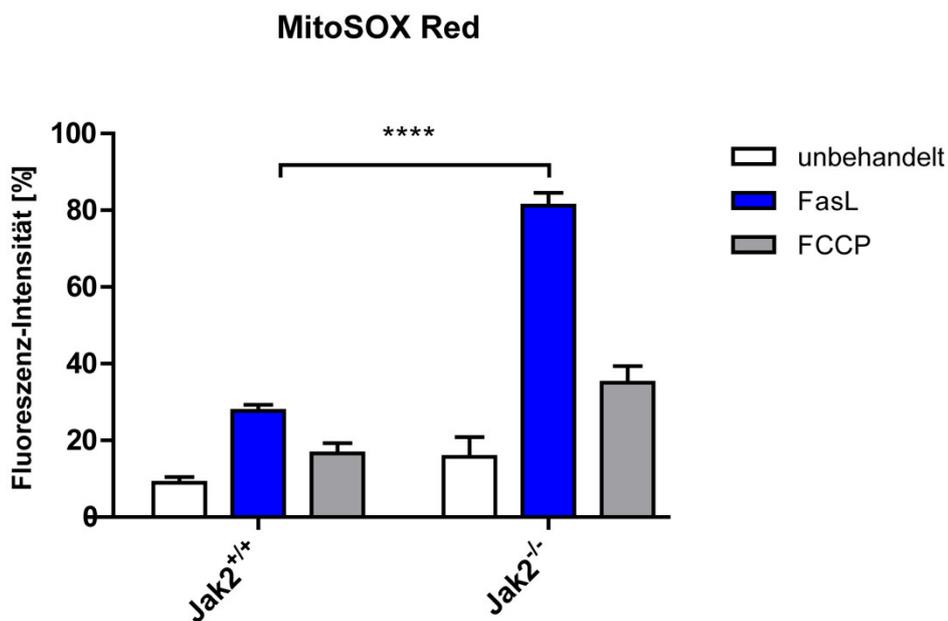
Mitochondrien (Abb. 4.29 (A)). Bereits 24 h nach FasL-Zugabe sind Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials detektierbar die durch eine Abnahme der roten Fluoreszenz gekennzeichnet sind (Abb. 4.29 (A)). Demgemäß nahm auch die Fluoreszenz-Intensität in Zellen ab, die mit dem Membran-depolarisierenden Reagenz FCCP behandelt wurden (Abb. 4.29 (A)). Insgesamt bildeten während der FasL-induzierten Apoptose Jak2-defiziente gegenüber Wildtyp-Fibroblasten eine signifikant größere Population an Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (20% vs. 70%) (Abb. 4.29 (B)). Auch im Vergleich FCCP-behandelter Zellen zeigten Jak2-defiziente MEFs einen deutlich größeren Anteil an Zellen mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (55% vs. 80%).

Zusammenfassend konnte somit bewiesen werden, dass die Anwesenheit von Jak2 von großer Bedeutung ist um Zellen vor einer starken Depolarisation der Mitochondrien während der FasL-induzierten Apoptose zu schützen.



**Abb. 4.29 Quantifizierung der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials.** Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden nicht behandelt oder mit FasL (20 ng/ml) oder FCCP (Positiv-Kontrolle; 20  $\mu$ M) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt und anschließend Mitochondrien (Rot) durch die Akkumulation mit TMRE gefärbt. Die Analyse der Intensität der roten Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflußzytometrie. (A) Histogramme von Jak2<sup>+/+</sup> (links) und Jak2<sup>-/-</sup> (rechts) MEFs unbehandelt (hellgraue Peaks), 24 h FasL (blaue Peaks) und FCCP (dunkelgraue Peaks) Stimulation. Gezeigt die Akkumulation von TMRE auf der Abzisse und die Anzahl der Zellen auf der Ordinate. (B) Balkendiagramm der ermittelten Zellen mit  $\Psi_{\Delta m}$  Verlust; \*\*\*\*p<0,00005

Um nun die Funktionalität der Mitochondrien von Wildtyp- und Jak2-Knockout MEFs während der Fas induzierten Apoptose zu charakterisieren, sollte die Bildung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (mROS) bestimmt werden. Da die Produktion von mROS nach zellulärem Stress in einem engen Verhältnis mit der Dysfunktion und der Depolarisation der Mitochondrien steht (Zamzami et al., 1995), könnte eine Zunahme von mROS in Jak2-defizienten Zellen für den hohen Anteil an Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verantwortlich sein. Daher wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit FasL oder FCCP behandelt und durch eine Inkubation mit dem Reagenz MitoSOX Red gebildete mROS gefärbt (Robinson et al., 2006). Zudem dienten nicht behandelte Zellen als Kontrolle. Die Bestimmung der in den Mitochondrien der Zellen produzierten mROS erfolgte sofort anhand der Zunahme der roten Fluoreszenz-Intensität durch die Durchflusszytometrie. Unerwartet bildeten Jak2-defiziente Fibroblasten bereits ohne Stimulus einen größeren Anteil an mROS (Abb. 4.30). Desweiteren entstand durch die Induktion von Apoptose durch die Zugabe von FasL in Jak2-Knockout MEFs eine dramatische Akkumulation von mROS innerhalb der Zellen (ca. 80%). Vergleichend hierzu bildeten Wildtyp-Zellen einen deutlich geringeren Anteil von ca. 30%. Dagegen induziert FCCP weniger mROS innerhalb der Zellen, wobei Jak2-defiziente Zellen wiederum einen stärkeren Effekt zeigten (ca. 15% zu ca. 30%).



**Abb. 4.30 Quantifizierung gebildeter mROS in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden nicht behandelt oder mit FasL (20 ng/ml) oder FCCP (20  $\mu$ M) für die angezeigten Zeitpunkte stimuliert und anschließend mROS durch Inkubation der Zellen mit MitoSOX Red gefärbt. Die Analyse der Intensität der roten Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflusszytometrie. \*\*\*\*p<0,00005

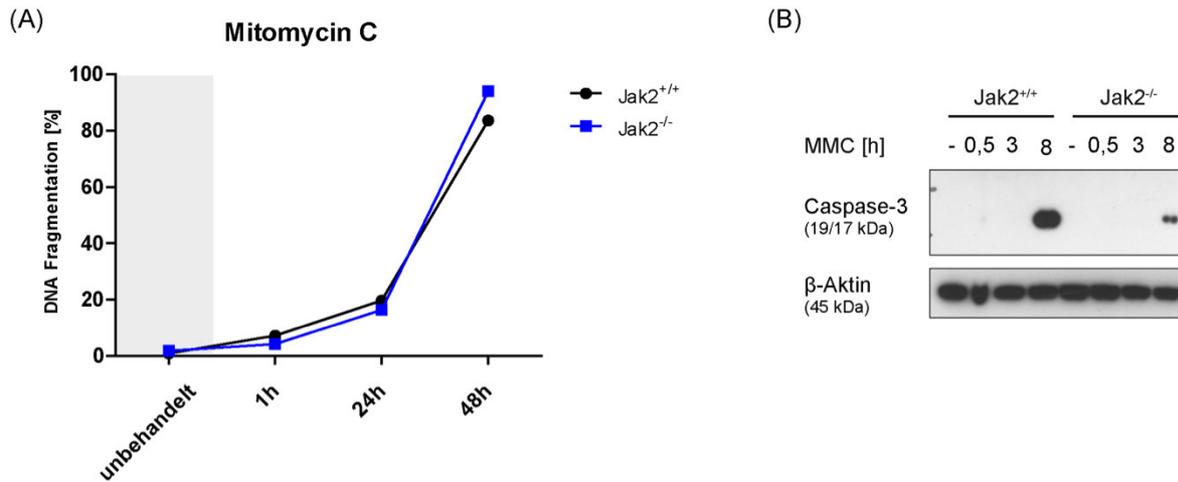
Somit entsteht durch die Abwesenheit von Jak2 eine Akkumulation von mROS innerhalb der Mitochondrien der Zellen. Der Schutz von Wildtyp-Zellen vor einem massiven Anstieg der mitochondrialen Sauerstoffspezies ist somit auf die protektive Funktion von Jak2 während des Todesrezeptor-induzierten Zelltodes zurückzuführen. Daraus folgernd sind weniger Wildtyp-Zellen von einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials betroffen.

#### 4.1.8 Die Charakterisierung der protektiven Funktion von Jak2 innerhalb der intrinsischen Apoptose

Neben dem extrinsischen Todesrezeptor-induzierten programmierten Zelltod kann Apoptose auch durch einen intrinsischen Signalweg eingeleitet werden (Strasser et al., 1995). Hierbei signalisieren nicht membrangebundene Rezeptoren die Aktivierung von Caspasen, sondern Zell-Stress induzierende chemische Substanzen lösen eine direkte Permeabilisierung des Mitochondriums aus, die nachfolgend zu einer Aktivierung der Todes-induzierenden Caspasen führt (Sun et al., 1999). Da eine Beeinträchtigung des Mitochondriums in Jak2-defizienten Zellen während der FasL-induzierten Apoptose identifiziert werden konnte, kann vermutet werden, dass eine protektive Funktion von Jak2 ebenfalls bei der intrinsischen Apoptose besteht. Diese Hypothese sollte im Folgenden durch die Induktion von Apoptose durch verschiedene intrinsische Stimulantien untersucht werden.

##### 4.1.8.1 Induktion von Apoptose durch Mitomycin C

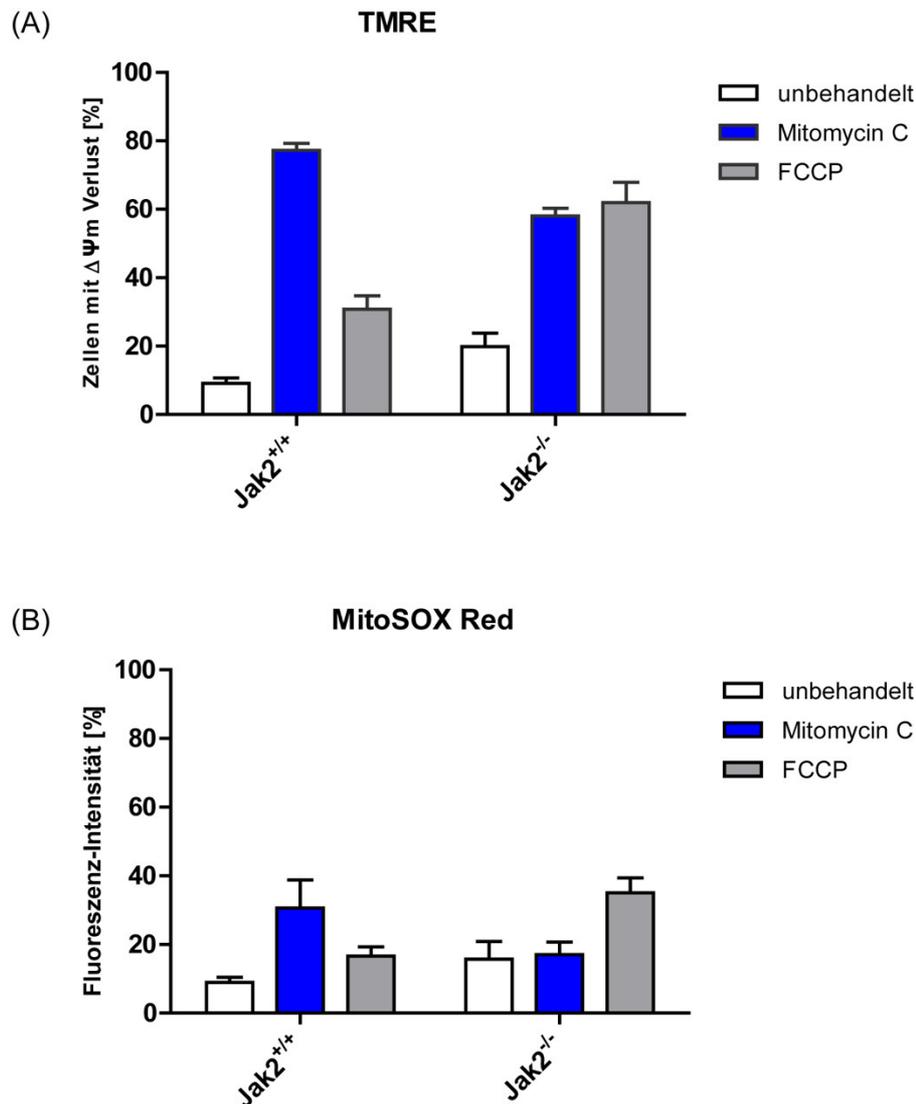
Mitomycin C ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das durch DNA-Interkalation eine Schädigung der DNA der Zellen verursacht (Tomasz, 1995). Durch irreversible Schäden innerhalb der nukleären Matrix wird über eine direkte Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie die Permeabilisierung der Mitochondrien und somit Apoptose eingeleitet (Strasser et al., 2011). Um einen Einfluss von Jak2 auf diesen Signalweg zu untersuchen wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit Mitomycin C behandelt und die induzierte Apoptose an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Erstaunlicherweise wurde Apoptose in Wildtyp- und in Jak2-Knockout Fibroblasten, wie in Abbildung 4.31 (A) dargestellt, durch Mitomycin C zu gleichen Teilen induziert. Bereits nach 1 h Stimulation wurde Apoptose sichtbar eingeleitet. Nach 24 h wuchs die apoptotische Zellpopulation bereits auf 20%, die nach 48 h dramatisch auf ca. 90% anstieg. Ein zusätzlicher Nachweis von Apoptose durch die Visualisierung aktiver Caspasen sollte das unerwartete Resultat bestätigen. Daher wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit Mitomycin C behandelt und anschließend Gesamt-Zelllysate angefertigt. Die dadurch extrahierte Menge an Caspase-3 wurde durch das Western-Blot-Verfahren visualisiert. Interessanterweise wurde durch Mitomycin C erst nach 8 h aktive Caspase-3 gebildet, welche in Wildtyp-Zellen in einem wesentlich größeren Anteil vorlag als in Jak2-defizienten Zellen. Dies bestätigt den zuvor durchgeführten Apoptose-Nachweis (Abb. 4.31 (B)).



**Abb. 4.31 Apoptose in Mitomycin C-stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs.** (A) Jak2<sup>+/+</sup> (schwarz) und Jak2<sup>-/-</sup> (blau) MEFs wurden mit Mitomycin C (1 µg/ml) für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. (B) Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus Mitomycin C (MMC; 1 µg/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für Caspase-3 und β-Aktin (Lade-Kontrolle).

Um zusätzlich eine Beeinträchtigung der Mitochondrien in Jak2-defizienten murinen Fibroblasten innerhalb der durch Mitomycin C-eingeleiteten intrinsischen Apoptose auszuschließen, sollte zusätzlich das Membranpotential und die Funktionalität der Mitochondrien untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Mitochondrien von nicht, Mitomycin C sowie FCCP (Positiv-Kontrolle) behandelten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs durch TMRE gefärbt. Die Bestimmung der TMRE-gefärbten Mitochondrien (Zellen) erfolgte sofort mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Vorherige Ergebnisse bestätigend zeigten nicht und FCCP behandelte Jak2-defiziente murine Fibroblasten gegenüber Wildtyp- Zellen einen deutlich erhöhten Anteil an Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 4.32 (A)). Dagegen reagierten beide Zelltypen auf eine Stimulation mit Mitomycin C gegensätzlich. Wildtyp-Zellen wiesen eine signifikant größere Population an Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auf (ca. 80% zu 60%).

Letztlich erfolgte die Bestimmung gebildeter mROS während der Mitomycin C induzierten Apoptose. Durch die Verwendung von MitoSOX Red wurden in Mitochondrien von nicht, Mitomycin C sowie FCCP (Positiv-Kontrolle) behandelten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs, gebildete mROS gefärbt. Anschließend wurden diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Hier zeigten Wildtyp- und Jak2-defiziente Fibroblasten nach der Induktion durch Mitomycin C ein der TMRE-Färbung ähnliches Muster. Im Gegensatz zu unbehandelten und FCCP behandelten Zellen verfügten Jak2-Knockout MEFs über einen größeren Schutz gegenüber Mitomycin C induzierten mROS (Abb. 4.32 (B)).



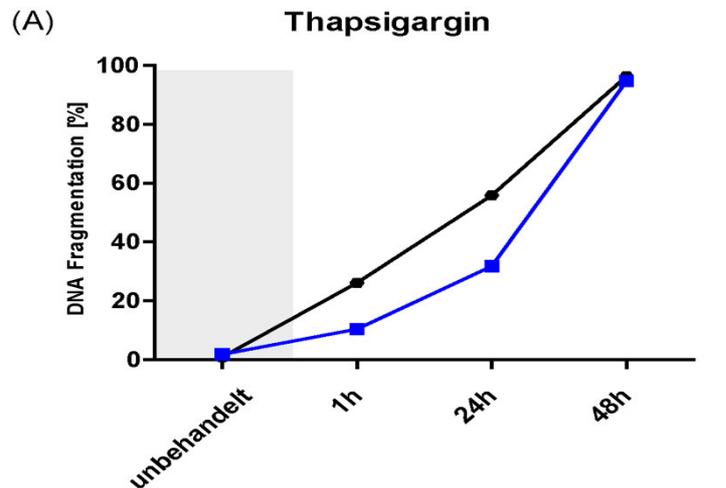
**Abb. 4.32 Analyse der Funktionalität der Mitochondrien in Mitomycin C behandelten Fribroblasten.** (A) Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs wurden nicht behandelt oder mit Mitomycin C (1 µg/ml) oder FCCP (Positiv-Kontrolle; 20 µM) für die angezeigten Zeitpunkte behandelt und anschließend Mitochondrien (A) durch die Akkumulation mit TMRE oder (B) mROS durch Inkubation der Zellen mit MitoSOX Red gefärbt. Die Analyse der Intensität der roten Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Anders als erwartet besitzt Jak2 somit keine protektive Funktion innerhalb der Mitomycin C-induzierten intrinsischen Apoptose. Außerdem führt auch die Defizienz von Jak2 zu keinerlei Beeinträchtigung der Mitochondrien.

#### 4.1.8.2 Induktion von Apoptose durch Thapsigargin

Die chemische Substanz Thapsigargin induziert Apoptose durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Tsukamoto and Kaneko, 1993). Als Inhibitor der Ca<sup>2+</sup>-Pumpe führt Thapsigargin zu einem Ungleichgewicht des zellulären Kalziumspiegels (Tsukamoto and Kaneko, 1993). Durch ein darauf folgendes Zusammenspiel mit dem Mitochondrium oder der Caspase-12 werden Effektor-Caspasen aktiviert und somit der programmierte Zelltod eingeleitet (Breckenridge et al., 2003). Da bereits eine protektive Funktion von Jak2 innerhalb der Mitomycin C-induzierten Apoptose ausgeschlossen werden konnte, sollte im Folgenden ein möglicher Einfluss auf den durch Thapsigargin eingeleiteten Signalweg untersucht werden. Dafür wurde eine Inkubationskinetik mit

Thapsigargin in  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs angefertigt und die Anzahl apoptotischer Zellen durch die Nicoletti-Methode bestimmt. Wie in Abbildung 4.33 (A) dargestellt, war die Anzahl apoptotischer Zellen in  $Jak2$ -defizienten MEFs nicht gegenüber Wildtyp-MEFs erhöht. So wurde in Wildtyp-Zellen nach 1 h und 24 h Stunden Stimulation eine deutlich größere Menge von apoptotischen Zellen gebildet als in  $Jak2$ -defizienten Zellen. Nicht stimulierte und für 48 h stimulierte Fibroblasten wiesen dagegen keinen Unterschied auf.



**Abb. 4.33 Apoptose in Thapsigargin stimulierten  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs.** (A)  $Jak2^{+/+}$  (schwarz) und  $Jak2^{-/-}$  (blau) MEFs wurden mit Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. Dauer der Stimulation wie angegeben, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle.

Zusammenfassend besitzt  $Jak2$  auch während der durch ER-Stress induzierten Apoptose keine anti-apoptotische Funktion, wodurch ein  $Jak2$ -vermittelter Schutz vor intrinsischer Apoptose ausgeschlossen werden kann.

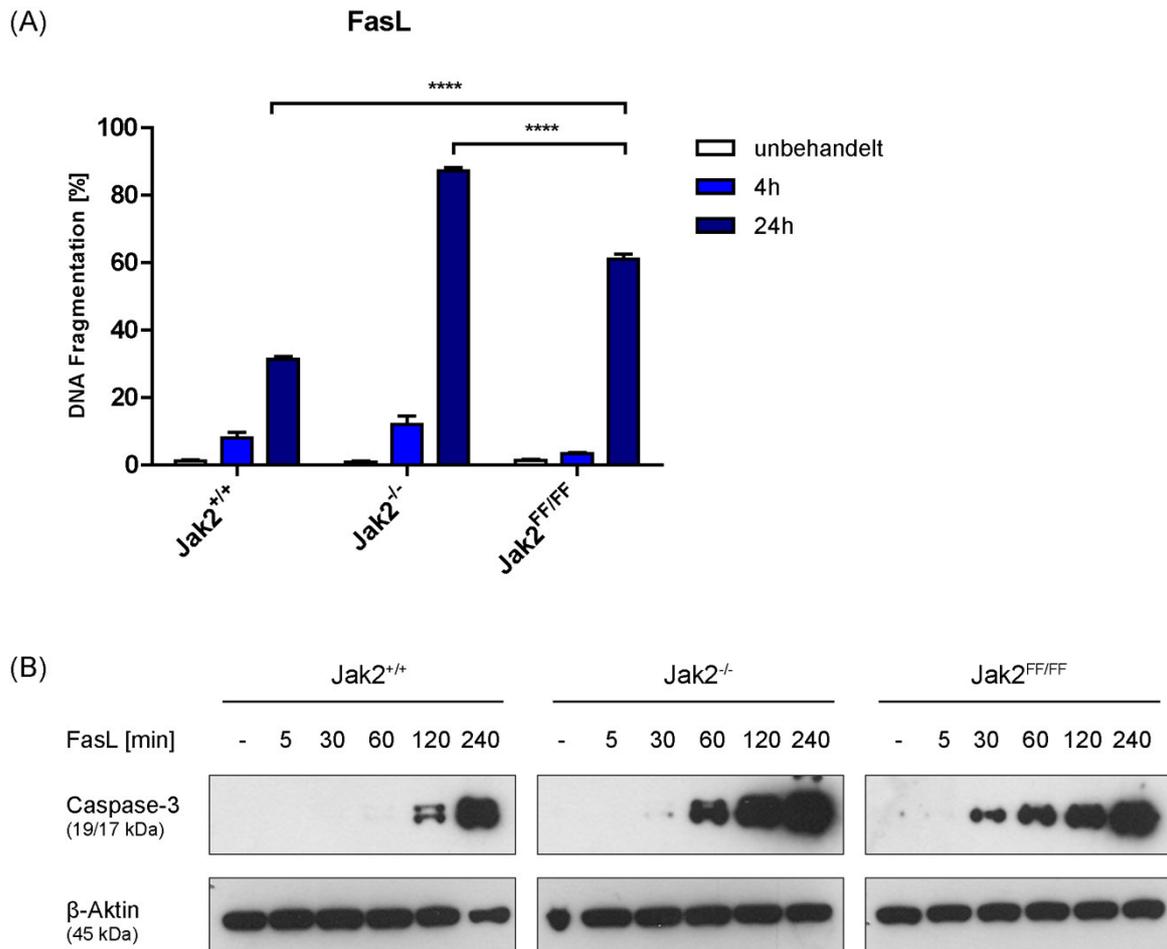
#### 4.1.9 Die Charakterisierung der protektiven Funktion von $Jak2$ in Abhängigkeit einer funktionellen Kinase-Domäne

Die Kinase-Funktion von  $Jak2$  ist essentiell für die Phosphorylierung und Aktivierung von Stats und somit für die Signalweiterleitung spezifischer induzierter Rezeptoren (Stark and Darnell, 2012). In Abschnitt 4.1.1.5 dieser Dissertation konnte bereits beschrieben werden, dass eine Inhibition von  $Jak2$  und der daraus resultierenden Blockade der Kinase-Domäne zu einer Steigerung der FasL-induzierten Apoptose führt. Additiv wurde in bisherigen Studien bewiesen, dass eine konstitutiv aktive Mutation von  $Jak2$  – die durch einen Aminosäureaustausch hervorgerufen wurde ( $Jak2V617F$ ) – zur Entstehung maligner Zellen beiträgt (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Levine et al., 2005). Eine Bedeutung der Kinase-Domäne von  $Jak2$  in Bezug auf dessen protektive Funktion während der Todesrezeptor induzierten Apoptose ist demnach wahrscheinlich und sollte im Folgenden analysiert werden.

##### 4.1.9.1 Untersuchung der Induktion von Apoptose in Kinase-inaktiven MEFs

Die Abhängigkeit der protektiven Funktion von  $Jak2$  von dessen Kinase-Aktivität, sollte durch die Bestimmung der Apoptose-Rate in Kinase-inaktiven murinen embryonalen Fibroblasten untersucht werden. Die dazu verwendeten MEFs, die aus Mäusen der Linie  $Jak2^{FF/FF}$  isoliert wurden, wurden bereits in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe eingehend

charakterisiert (Keil et al., 2014). Durch einen Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Phenylalanin in der Kinase-aktivierenden Domäne wird die Kinase-Funktion inaktiviert. So wurden  $Jak2^{+/+}$ ,  $Jak2^{-/-}$  und  $Jak2^{FF/FF}$  MEFs mit FasL für 4 h und 24 h inkubiert und die induzierte Anzahl apoptotischer Zellen anhand der Nicoletti-Methode bestimmt. Wie zu erwarten waren apoptotische Zellen in allen Zelltypen ohne Todes-Stimulus nicht detektierbar (Abb. 4.34 (A)). Nach 4 h und 24 h FasL-Zugabe wurde Apoptose induziert, jedoch zeigte sich erst nach 24 h eine signifikante Differenz in der Anzahl apoptotischer Zellen. Hier bildeten  $Jak2$ -Kinase-inaktive gegenüber Wildtyp-Fibroblasten eine erkenntlich größere Population an apoptotischen Zellen. Diese war im Vergleich zu  $Jak2$ -defizienten MEFs jedoch geringer. Der in Abbildung 4.34 (B) dargestellte Nachweis aktiver Caspase-3 bestätigt die Induktion von Apoptose in  $Jak2^{FF/FF}$  MEFs. Hier wurde jeweils für  $Jak2^{+/+}$ ,  $Jak2^{-/-}$  und  $Jak2^{FF/FF}$  MEFs eine Inkubationskinetik mit FasL angefertigt und Caspase-3 aus Proteinextrakten durch das Western-Blot-Verfahren visualisiert. In  $Jak2$ -defizienten und Kinase-inaktiven murinen Fibroblasten war eine große Menge aktiver-Caspase-3 bereits nach 30 min FasL-Zugabe induziert, deren Menge im weiteren Verlauf der Inkubationskinetik kontinuierlich anstieg. Dagegen war aktive-Caspase-3 in Wildtyp-Zellen erst ab einem Zeitpunkt von 2 h nachweisbar.

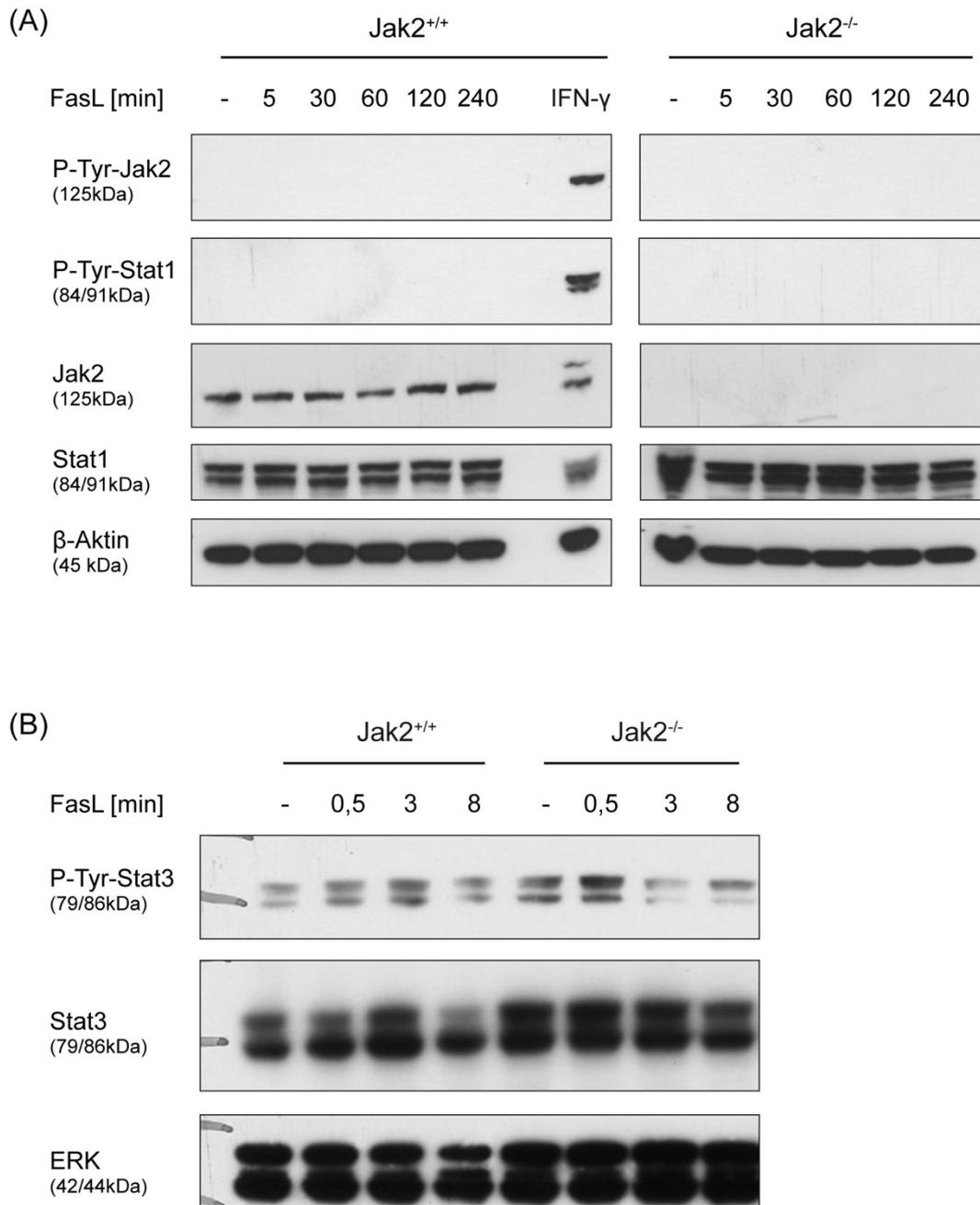


**Abb. 4.34 Analyse der Apoptose Induktion  $Jak2$ -Kinase inaktiven MEFs.** (A)  $Jak2^{+/+}$ ,  $Jak2^{-/-}$  und  $Jak2^{FF/FF}$  MEFs wurden mit FasL (40 ng/ml) für 4 h und 24 h stimuliert und Apoptose anhand der Messung der DNA Fragmentation bestimmt. (B) Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus FasL (40 ng/ml) stimulierten  $Jak2^{+/+}$ ,  $Jak2^{-/-}$  und  $Jak2^{FF/FF}$  MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für Caspase-3 und  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle). \*\*\*\* $p < 0,00005$

Somit konnte in diesem Experimentalsystem ein intermediärer Phänotyp der Jak2-Kinase-inaktiven Fibroblasten während der FasL-induzierten Apoptose identifiziert werden, was auf eine partielle Abhängigkeit der protektiven Funktion von Jak2 von der Kinase-Domäne hinweist.

### **4.1.9.2 Der Nachweis von aktivierender Tyrosin-Phosphorylierung während der Fas induzierten Apoptose**

Die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin von spezifischen Kinasen ist ein essentieller Vorgang in der Jak-getriebenen Signalweiterleitung (Stark and Darnell, 2012). Die dadurch vermittelte Aktivierung der Kinasen selbst sowie verschiedener Stat Moleküle ist auch für Signalmechanismen, die in Verbindung mit dem programmierten Zelltod stehen, von großer Bedeutung (Rosner et al., 2006). So konnte auch eine aktivierende Tyrosin-Phosphorylierung des Fas Rezeptors beschrieben werden (Janssen et al., 1996). Da eine funktionelle Kinase-Domäne vermutlich für die volle Ausführung der anti-apoptotischen Aktivität von Jak2 von Bedeutung ist, sollte zunächst untersucht werden inwiefern Jak2 durch die Phosphorylierung des Tyrosins an der Position 1007/8 aktiviert ist. Um die Phosphorylierung nachzuweisen, wurden Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mit FasL stimuliert und an verschiedenen Zeitpunkten Proteine extrahiert. Die Phosphorylierung sollte anschließend durch das Western-Blot-Verfahren nachgewiesen werden. Zusätzlich dienten IFN- $\gamma$  stimulierte Jak2<sup>+/+</sup> MEFs als Positiv-Kontrolle. Im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen war Jak2 überraschenderweise in Wildtyp-Zellen während der FasL-induzierten Apoptose nicht an den aktivierenden Aminosäuren Tyrosin 1007/8 phosphoryliert (Abb. 4.35 (A)). Wie erwartet war die Menge an Jak2 während der induzierten Apoptose jedoch konstant und Jak2 konnte in Jak2-defizienten Zellen nicht nachgewiesen werden. Demungeachtet sollte anschließend eine aktivierende Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose auf Stat Moleküle untersucht werden. Stat1 ist innerhalb Interferon-abhängiger Signalwege für eine pro-apoptotische Wirkung bekannt und wurde aufgrund einer Interaktion mit p53 auch als anti-apoptotischer Faktor beschrieben (Rosner et al., 2006; Youlyouz-Marfak et al., 2008). So sollte innerhalb der Inkubationskinetik ebenfalls eine Stat1 aktivierende Phosphorylierung des Tyrosins 701 untersucht werden. Jedoch war auch Stat1 weder in Wildtyp- noch in Jak2-defizienten Zellen an der Position Tyr-701 phosphoryliert. Beide Zelltypen zeigten ein einheitliches Expressionsmuster für Stat1 (Abb. 4.35 (A)). Zudem sollte die Phosphorylierung von Stat3 analysiert werden. Eine Funktion von Stat3 während des programmierten Zelltodes ist durch die Aktivierung mittels Wachstumshormonen beschrieben (O'Shea et al., 2002). Demnach besitzt Stat3 – aktiviert durch Rezeptoren der Wachstumshormone – eine dominierende Apoptose hemmende Funktion (O'Shea et al., 2002). Wie in Abbildung 4.35 (B) dargestellt war Stat3 innerhalb der durchgeführten FasL-Inkubationskinetik von Wildtyp- und Jak2-defizienten Fibroblasten phosphoryliert. Andererseits war bei einer vergleichenden Analyse weder ein Unterschied von phosphoryliertem noch basalem Stat3 erkennbar.

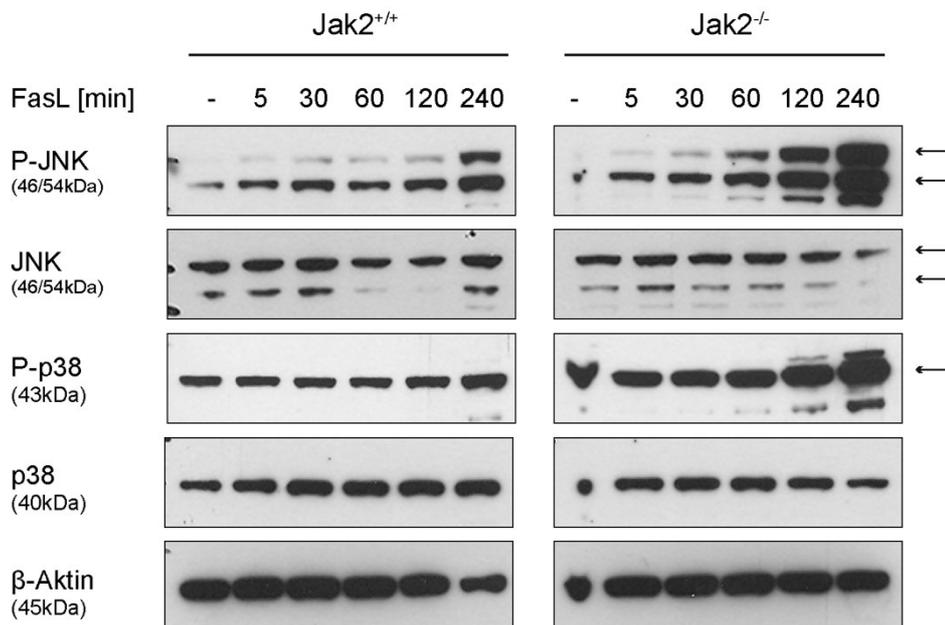


**Abb. 4.35 Identifizierung von aktivierenden Tyrosin-Phosphorylierungen nach FasL-Stimulation.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus FasL (40 ng/ml) sowie IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) stimulierten Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für (A) P-Tyr-Jak2, Jak2, P-Tyr-Stat1, Stat1,  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle), als auch (B) P-Tyr-Stat3, Stat3 und ERK (Lade-Kontrolle).

Zusammenfassend erscheint eine aktivierende Phosphorylierung der Tyrosine an der Position 1007 und 1008 nicht für die protektive Funktion von Jak2 während der Fas-induzierten Apoptose essentiell. Auch kann innerhalb des Fas medierten Signalweges der Phosphorylierung des Tyrosins 701 von Stat1 keine Funktion zugesprochen werden. Darüber hinaus ist besonders hervorzuheben, dass die hier identifizierte protektive Funktion unabhängig von der oft beschriebenen Interaktion von Jak2 und Stat3 während des Zelltodes ist.

#### 4.1.9.3 Der Einfluss von Jak2 auf Signalmechanismen von MAP-Kinasen nach Apoptose-Induktion

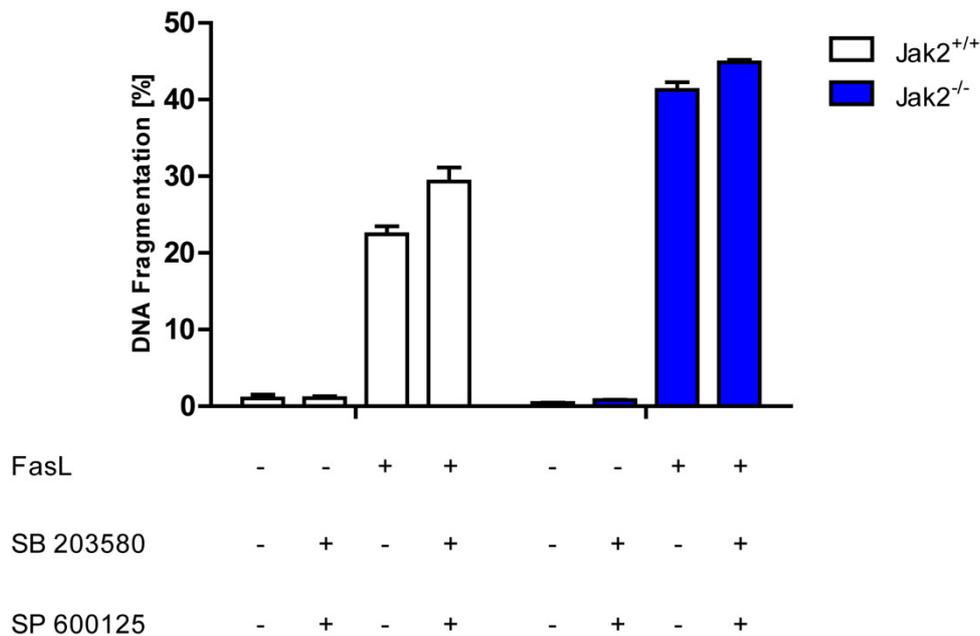
Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) sind essentielle Faktoren während Zelltod-fördernden und Zelltod-inhibierenden Prozessen (Dhanasekaran and Reddy, 2008). So werden die MAPK JNK und p38 im Zuge der Apoptose durch das Rezeptor-gebundene Ask1 phosphoryliert und aktiviert, um pro-apoptotische Faktoren zu induzieren (Ichijo et al., 1997). Im Gegensatz dazu, wird die Phosphorylierung von p38 und JNK ebenfalls innerhalb der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren induziert, um die Neusynthese Proliferations-fördernder Faktoren einzuleiten (Wagner and Nebreda, 2009). Eine Analyse der Phosphorylierung und somit der Aktivierung von p38 und JNK während der durch FasL eingeleiteten Apoptose sollte im Folgenden über eine mögliche Funktion im Zusammenhang mit der anti-apoptotischen Rolle von Jak2 aufklären. Demnach wurden  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit FasL stimuliert und die zellulären Proteine an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation isoliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK mit Hilfe der Western-Blot-Methode analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass während des apoptotischen Signalweges JNK und p38 phosphoryliert und daher aktiviert wurden (Abb. 4.36). Zusätzlich nahm im Gegensatz zu den basalen Expressionsmengen die phosphorylierte Form von JNK und p38 kontinuierlich zu. Bemerkenswerterweise lagen p-JNK und p-p38 in  $Jak2$ -defizienten Fibroblasten signifikant erhöht vor.



**Abb. 4.36 Identifizierung von aktivierten MAPK nach FasL Stimulation.** Western Blot Analyse mit Gesamt-Zelllysaten aus FasL (20 ng/ml) stimulierten  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs. Dauer der Stimulation wie angezeigt, nicht stimulierte Fibroblasten dienen als Kontrolle. Dargestellt sind Western Blots für P-JNK, JNK, P-p38, p38 und  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle). Die Pfeile markieren P-JNK, JNK und P-p38.

Da bereits eingehend beschrieben wurde, dass in  $Jak2$ -defizienten MEFs die Apoptose-Rate gegenüber Wildtyp-MEFs erhöht ist, lässt der dargestellte Nachweis der Phosphorylierungen von JNK und p38 vermuten, dass hier p38 und JNK pro-apoptotische Signale induzieren.

Daher sollte die Verwendung MAPK-spezifischer Inhibitoren die zuvor aufgestellte Hypothese bestätigen. Es wurden  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs mit einer Kombination der Inhibitoren SB 203580 (p38) und SP 600125 (JNK) für eine Stunde vorbehandelt und Apoptose durch die Zugabe von FasL induziert. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte nach vierundzwanzig Stunden anhand der Nicoletti-Methode. Unerwartet zeigten hier weder Wildtyp- noch  $Jak2$ -defiziente Fibroblasten eine Reduktion von apoptotischen Zellen durch die zusätzliche Behandlung der Inhibitoren nach FasL Zugabe (Abb. 4.37). Nach der Einleitung des Zelltodes nahm die Anzahl apoptotischer Zellen geringfügig zu, ist jedoch nicht signifikant. Dagegen wurde weder in nur Inhibitor-behandelten oder nicht stimulierten Fibroblasten Apoptose induziert.



**Abb. 4.37 Induktion von Fas-vermittelter Apoptose nach Inhibition der MAPK JNK und p38.**  $Jak2^{+/+}$  und  $Jak2^{-/-}$  MEFs wurden mit SB 203580 (10 $\mu$ M) und SP 600125 (10 $\mu$ M) für 1h vorinkubiert und anschließend mit FasL (20ng/ml) für 24h stimuliert. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde anschließend anhand der DNA Fragmentation bestimmt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte nicht bestätigt werden, dass die MAPK JNK und p-38 durch die Induzierung pro-apoptischer Faktoren während einer induzierten Fas-vermittelten Apoptose Zelltod-fördernde Signale einleiten.

#### 4.2 Analyse der Bedeutung von $Jak2$ während einer parasitären Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Eine Infektion infolge der oralen Aufnahme des protozoischen Parasiten *T. gondii* führt zum Krankheitsverlauf der Toxoplasmose (Dubey, 2008). In immunkompetenten Individuen werden schnell replizierende Tachyzoiten durch eine Immunantwort des Wirtes kontrolliert und somit die Entstehung eines akuten systemischen Krankheitsverlaufes verhindert (Dupont et al., 2012). Infolge dessen konvertiert *T. gondii* zu langsam replizierenden Bradyzoiten, welche Gewebezysten bilden und innerhalb von neuronalem und muskulärem Gewebe des Wirtes überdauern (Dupont et al., 2012). So verläuft eine Toxoplasmose in der Mehrzahl der Krankheitsfälle asymptomatisch, kann jedoch in immundefizienten Individuen zu einem schweren oder auch tödlichen Krankheitsverlauf

führen (Feustel et al., 2012). Vorherige Studien identifizierten die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12, für deren Signalweiterleitung Jak2 als Rezeptor-assoziierte Kinase essentiell ist, als bedeutende Faktoren innerhalb der eingeleiteten Immunantwort gegen *T. gondii* (Denkers et al., 2012b; O'Shea et al., 2015). Eine große Bedeutung von Jak2 für die Ausbildung einer intakten Immunantwort ist somit sehr wahrscheinlich, konnte bisher jedoch nicht direkt nachgewiesen werden. Auch erste klinische Studien an MPN-Patienten nach Gabe des Jak2-Inhibitors Jakavi<sup>®</sup> beschreiben eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Herpes Zoster oder Tuberkulose, was auf eine erhöhte Anfälligkeit für eine akut verlaufende Toxoplasmose oder eine Reaktivierung hindeuten könnte (Hopman et al., 2014; Vannucchi et al., 2015). Die Funktion von Jak2 während einer Infektion mit *T. gondii* sollte nun erstmals *in vivo* untersucht werden.

#### 4.2.1 Die Generierung eines konditionalen Jak2-Knockouts

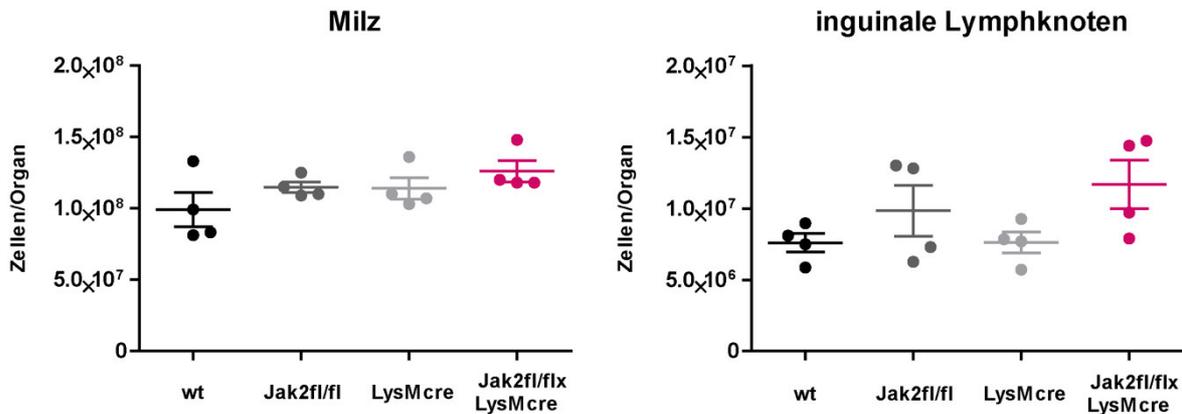
Wie zuvor beschrieben ist ein konventioneller Knockout von Jak2 wegen der hiermit einhergehenden unvollständigen Erythropoese embryonal letal (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998). Um dennoch die Bedeutung von Jak2 während der parasitären Infektion *in vivo* zu analysieren, wurde ein konditionaler Knockout von Jak2 generiert. IFN- $\gamma$  und IL-12 erfüllen wichtige Funktionen in der durch Makrophagen und Granulozyten vermittelten Abwehr, die eine erste Barriere für *T. gondii* bilden (Denkers et al., 2012a; Denkers et al., 2012b). Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Dissertation die Untersuchung einer Makrophagen-, Monozyten- und Granulozyten-spezifischen Jak2-Defizienz analysiert. Durch die Verpaarung gefloxter Jak2 (*Jak2* ist flankiert von *loxP*-Sequenzen) Mäuse mit *LysM<sup>cre/+</sup>* Mäusen kann ein spezifischer Knockout hauptsächlich in Makrophagen, Monozyten und Granulozyten von Jak2 durch die konditionale Cre-Expression erzielt werden (Clausen et al., 1999). Um einen Jak2 unspezifischen Effekt auszuschließen, wurden in den folgenden Untersuchungen drei Kontrollgruppen und eine Experimentalgruppe gebildet. Diese werden nachfolgend in Tab. 4.1 aufgeführt.

Tab. 4.1 Bildung der verschiedenen Gruppen der Versuchstiere

Bezeichnung	Genotyp	Erläuterung
wt	<i>Jak2<sup>+/+</sup></i> x <i>LysM<sup>+/+</sup></i>	Wildtyp-Kontrolle
<i>Jak2<sup>fl/fl</sup></i>	<i>Jak2<sup>fl/fl</sup></i> x <i>LysM<sup>+/+</sup></i>	In den <i>Jak2</i> -Lokus eingefügte <i>loxP</i> -„sites“ verursachen keinen Phänotyp (Kontrolle)
<i>LysMcre</i>	<i>Jak2<sup>+/+</sup></i> x <i>LysM<sup>cre/+</sup></i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Knock-in der Cre-Rekombinase in den <i>LysM</i>-Lokus verursacht keinen Phänotyp (Kontrolle)</li> <li>um einen Knockout des essentiellen Lysozym M zu vermeiden wurde mit heterozygoten Tieren gearbeitet</li> </ul>
<i>Jak2<sup>fl/fl</sup>/flxLysMcre</i>	<i>Jak2<sup>fl/fl</sup></i> x <i>LysM<sup>cre/+</sup></i>	Konditionaler <i>Jak2</i> -Knockout in Makrophagen und Granulozyten

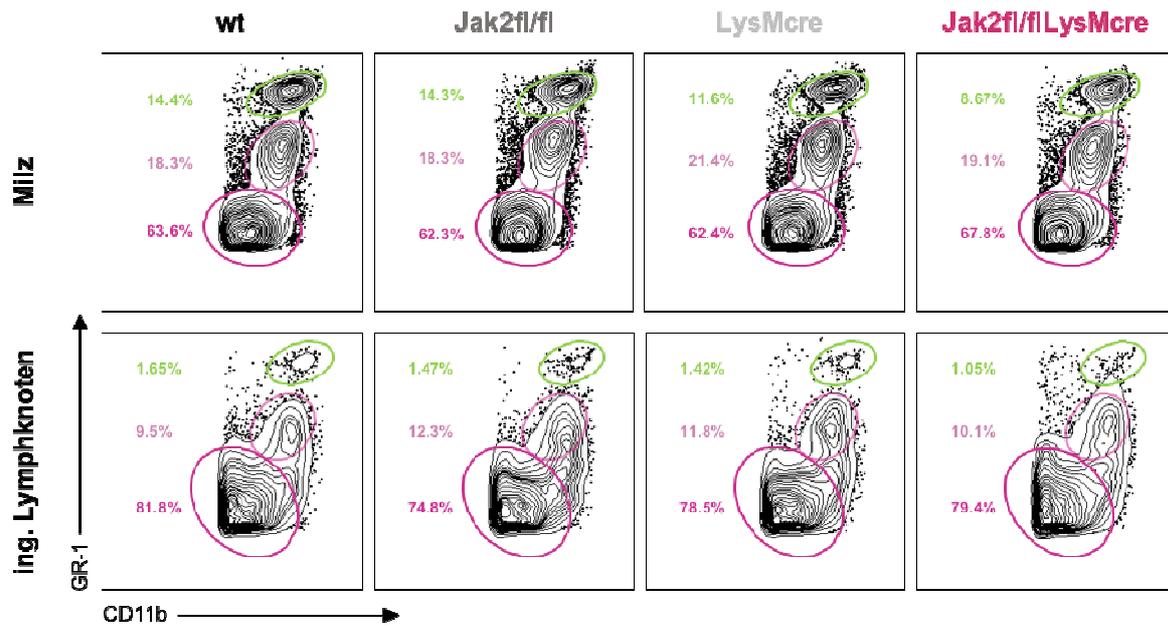
Durch die Bindung an den GM-CSF Rezeptor nimmt Jak2 bereits während der Differenzierung einer spezifischen Population von Makrophagen und Granulozyten eine wichtige Funktion ein (Khwaja and Linch, 1994). Um einen Defekt in der Differenzierung von ausgereiften Makrophagen und Granulozyten in Tieren des konditionalen *Jak2*-

Knockouts ( $Jak2^{fl/fl} \times LysM^{cre/+}$ ) auszuschließen, wurden zunächst die Zellpopulationen der Milz und der inguinalen Lymphknoten untersucht. Hierfür wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten aller Versuchsgruppen entnommen und die Zellen durch einen Kollagenase und DNase I Verdau aufbereitet. Wie in Abbildung 4.38 dargestellt, war sowohl bei der gesamten Zellzahl der Milz, als auch bei den inguinalen Lymphknoten keine Differenz zwischen den verschiedenen Genotypen ermittelbar.



**Abb. 4.38 Anzahl der Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten.** (A) Milz und (B) inguinale Lymphknoten wurden aus naiven wt,  $Jak2^{fl/fl}$ ,  $LysM^{cre}$  und  $Jak2^{fl/fl} \times LysM^{cre}$  Tieren entnommen und die Anzahl der isolierten Zellen nach Kollagenase und DNase I Verdau bestimmt.  $n=4$  (Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Für die weitere Analyse der in der Milz und den inguinalen Lymphknoten enthaltenen Populationen von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten wurden die isolierten Zellen durch verschiedene Fluorophor-gekoppelte Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Durch einen vorherigen Ausschluss toter, T- und B-sowie Dendritischer Zellen wurden so Makrophagen und Granulozyten durch die Oberflächenmarker CD11b und GR-1 visualisiert. Demnach bildeten alle Versuchsgruppen eine Population von Granulozyten (grün) in der Milz und in den inguinalen Lymphknoten aus, die sich auch innerhalb ihrer gemessenen Frequenz nicht unterschieden (Abb. 4.39). Des weiteren zeigten die Milzen und die inguinalen Lymphknoten aller Genotypen Populationen für Monozyten (rosa) sowie reife Makrophagen (magenta). Auch hier war kein Unterschied im Anteil der Zellpopulationen erkennbar.



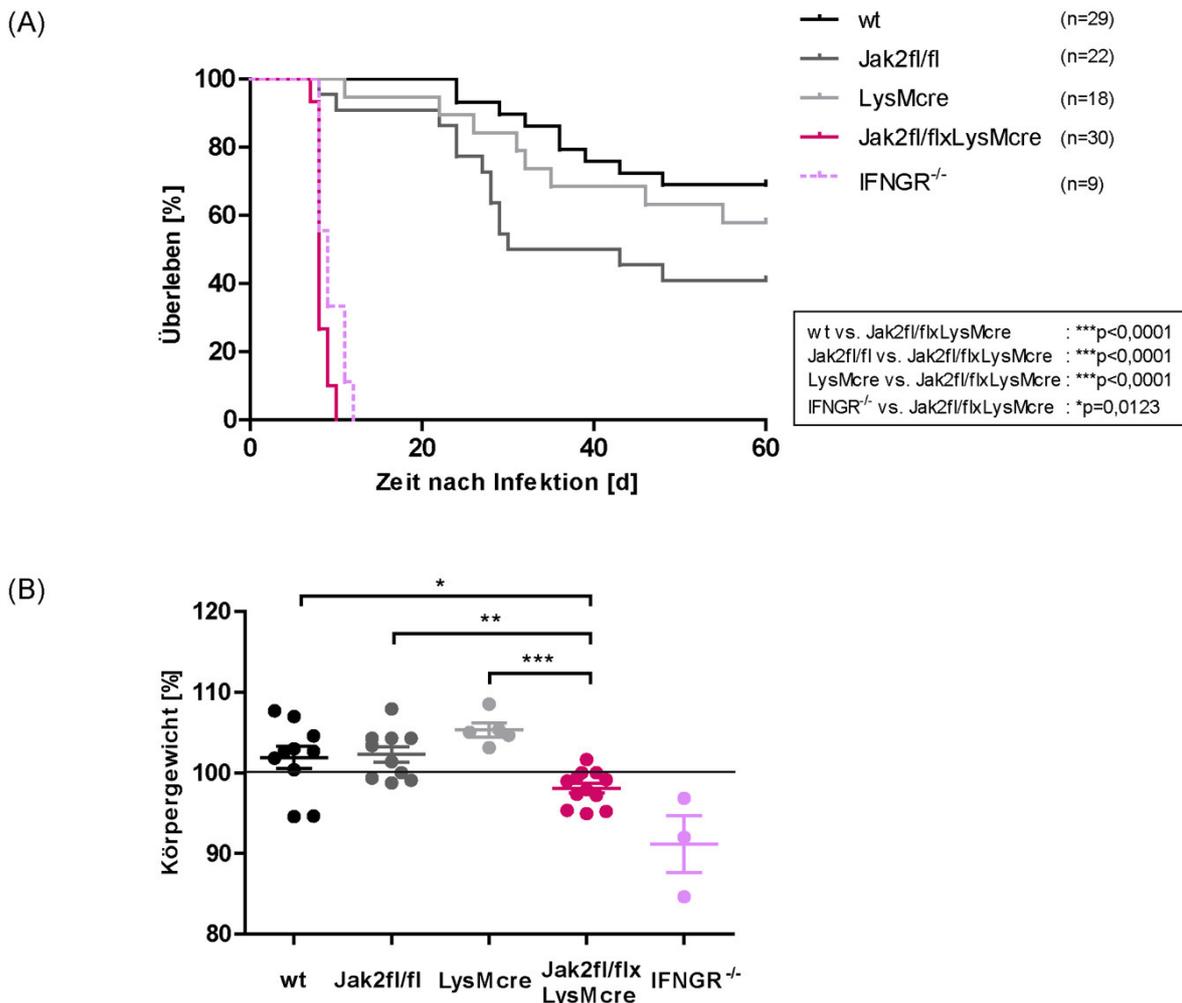
**Abb. 4.39 Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in naiven Mäusen.** Naiven wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen, mittels Kollagenase und DNase I Verdau aufbereitet und die Zellpopulationen durch die FACS-Analyse untersucht. Nach Ausschluss von: DAPI, CD3ε/CD19, CD11c; Granulozyten (Grün), Monozyten (rosa), Makrophagen (Magenta); dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Tier jeder analysierter Gruppe. (n=4) (aus zwei von einander unabhängigen Versuchen).

Zusammenfassend besitzen Mäuse mit einem Zelltyp-spezifischen Knockout von Jak2 in Makrophagen, Monozyten und Granulozyten kein Defizit in der Differenzierung dieser Zelltypen.

#### 4.2.2 Relevanz der Expression von Jak2 in Makrophagen und Granulozyten für das Überleben nach einer *T. gondii* Infektion

Der konditionale Knockout von Jak2 in Makrophagen, Monozyten und Granulozyten führt zu keiner Beeinträchtigung der Ausreifung dieser Zelltypen. Eine Bedeutung von Jak2 innerhalb der Immunantwort im Verlauf einer Toxoplasmose konnte bisher *in vivo* nicht analysiert werden. Aufgrund dessen sollte die Auswirkung des Makrophagen- und Granulozyten-spezifischen Knockouts von Jak2 auf die Funktionalität dieser Zelltypen nach einer Infektion mit *T. gondii* untersucht werden. Deshalb wurden im Folgendem das Überleben von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre nach einer Infektion mit *T. gondii* analysiert. Eine zusätzliche Infektion von IFNGR<sup>-/-</sup> Mäusen diente als Positivkontrolle für die Präparation der *T. gondii* Zysten und die darauf folgende Infektion, da hier bereits eine hohe Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit intrazellulären Pathogenen ausführlich beschrieben wurde (Huang et al., 1993). Für die Analyse wurden die Mäuse der verschiedenen Gruppen mit 20 Zysten des *T. gondii* Stammes ME49 *i.p.* infiziert und über einen Zeitraum von 60 Tagen beobachtet. Im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* zeigten Jak2fl/flxLysMcre Tiere eine signifikant geringere Überlebenszeit gegenüber wt, Jak2fl/fl, LysMcre Tieren (Abb. 4.40 (A)). So erlagen bereits nach sieben Tagen Jak2fl/flxLysMcre Mäuse der Infektion und erreichten bis Tag 10 der Infektion mit *T. gondii* eine 100%ige Rate der Mortalität. Ähnlich verlief die Infektion mit *T. gondii* in IFNGR<sup>-/-</sup> Tieren, jedoch war der gesamte Verlauf um 2-3 Tage gegenüber Jak2fl/flxLysMcre Tieren verschoben. Demgegenüber konnte bei wt Tieren eine

Überlebensrate von ca. 68%, bei LysMcre ca. 57% und für Jak2fl/fl überraschenderweise nur von ca. 40% bis Tag 60 beobachtet werden. Obgleich die drei Kontrollgruppen (wt, Jak2fl/fl und LysMcre) leichte Unterschiede in dem Anteil der überlebenden Tiere zeigten, war der Unterschied jedoch zu Jak2fl/flxLysMcre erkennbar signifikant. Des weiteren wurde innerhalb der ersten sieben Tage der Infektion das Körpergewicht der Mäuse bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass das Körpergewicht von wt, Jak2fl/fl, LysMcre Mäusen bis zum Tag 7 leicht zunahm (über 100%), jedoch Jak2fl/flxLysMcre Mäuse das Körpergewicht signifikant verringerten (unter 100%) (Abb. 4.40 (B)). Dagegen wiesen IFNGR<sup>-/-</sup> Mäuse im Durchschnitt ca. 90% des anfänglich bestimmten Körpergewichtes auf. Die Messung des Körpergewichts von ausschließlich drei Mäusen erscheint jedoch aufgrund der größeren Streuung einzelner Werte nicht aussagekräftig.



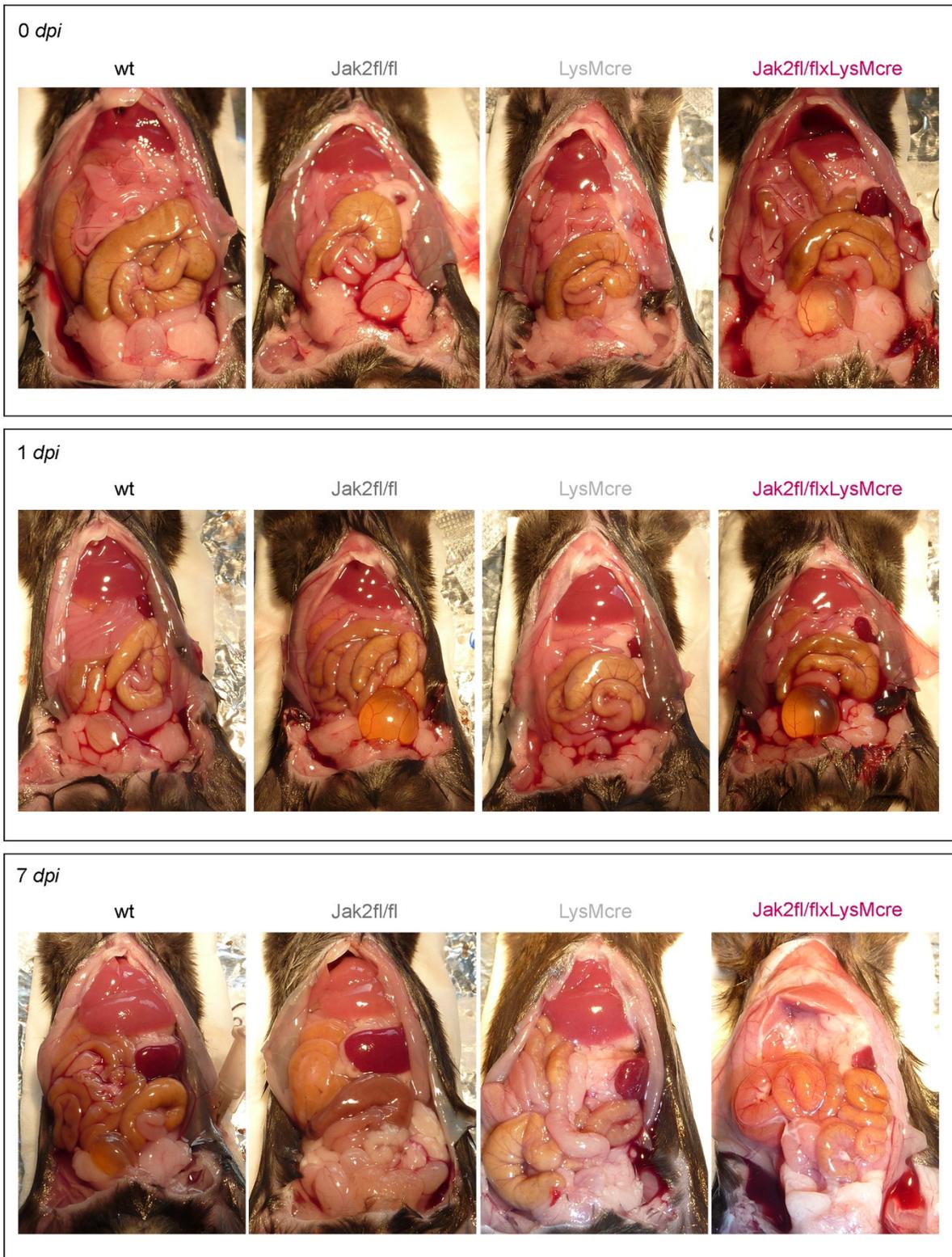
**Abb. 4.40 Überleben und Körpergewicht nach einer Infektion mit *T. gondii*.** wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre und IFNGR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden *i.p.* mit 20 Zysten (in PBS) *T. gondii* des Stammes ME49 infiziert, die zuvor aus Gehirnen von CD1 Mäusen aufbereitet wurden. (A) Überleben über einen Beobachtungszeitraum von 60 Tagen. n=Versuchstiere und p wie angegeben (B) Körpergewicht der Tiere an Tag 7 im Vergleich zum Gewicht vor Infektion. Gewogen wurde jeweils zur gleichen Tageszeit über die ersten sieben Tage der Infektion. 100% (Linie) stellen das Startgewicht dar. wt (n=10), Jak2fl/fl (n=10), LysMcre (n=5), Jak2fl/flxLysMcre (n=12), IFNGR<sup>-/-</sup> (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

Zusammenfassend zeigten Jak2fl/flxLysMcre gegenüber wt, Jak2fl/fl, LysMcre und IFNGR<sup>-/-</sup> Tieren eine deutlich erhöhte Rate der Mortalität. Außerdem wurde eine Abnahme des Körpergewichts in Jak2fl/flxLysMcre Mäusen, jedoch nicht in wt, Jak2fl/fl und LysMcre Mäusen, beobachtet. Folglich führt eine konditionaler Knockout von Jak2 in Makrophagen

und Granulozyten im Kontext einer parasitären Infektion zu einer erhöhten Suszeptibilität gegen *T. gondii*.

#### **4.2.3 Anatomische Beurteilung im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii***

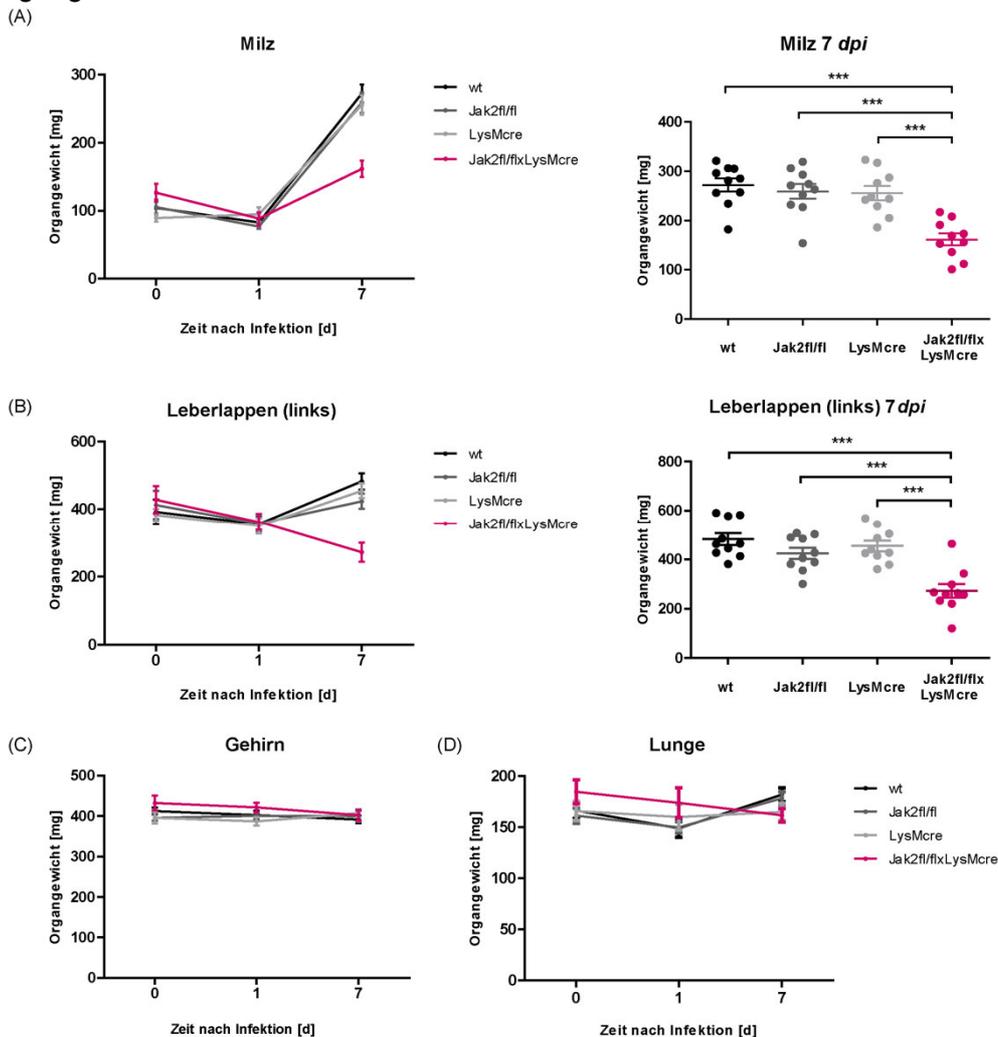
Um die erhöhte Suszeptibilität von Jak2fl/flxLysMcre Tieren gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren genauer zu analysieren, sollten anschließend *T. gondii* infizierte Tiere der gesamten vier Gruppen auf pathologische Veränderungen untersucht werden. Daher wurden wt, Jak2fl/fl, LysMcre sowie Jak2fl/flxLysMcre Mäuse mit 20 Zysten *T. gondii i.p.* infiziert und an den Tagen 1 (1 dpi) und 7 (7 dpi) nach Infektion, post mortem pathologisch untersucht und Befunde durch makroskopische Aufnahmen dokumentiert. Nicht infizierte Mäuse (0 dpi) der vier zu analysierenden Gruppen dienten hierbei als Kontrolle. Wie zu erwarten, zeigten uninfizierte wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Mäuse keine veränderte Anatomie (Abb. 4.41, Kasten oben). Auch einen Tag nach der Infektion der Mäuse mit *T. gondii* war keine Veränderung des Retroperitonealraumes (nicht gezeigt) und der Organe in der Peritonealhöhle erkennbar (Kasten Mitte). Dagegen waren an Tag 7 nach der Infektion deutliche pathologische Veränderungen und Unterschiede zwischen den drei Kontrollgruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre) und den Jak2fl/flxLysMcre Mäusen festzustellen (Kasten unten). In wt, Jak2fl/fl und LysMcre Mäusen schien die Leber vergrößert (Hepatomegalie), wohingegen die Leber von Jak2fl/flxLysMcre anämisch und verkleinert war und daher möglicherweise auf eine Schädigung der Leber hindeutet. Ebenfalls entstand in wt, Jak2fl/fl und LysMcre an Tag 7 der Toxoplasmose eine Splenomegalie. Auch hier zeigten Jak2fl/flxLysMcre Mäuse im Verlauf der Infektion einen gegensätzlichen pathologischen Phänotyp, nämlich eine deutlich verkleinerte Milz gegenüber den Tieren der drei entsprechenden Kontrollgruppen. Zudem wiesen ausschließlich Jak2fl/flxLysMcre Mäuse eine Ansammlung einer viskösen Flüssigkeit innerhalb des Peritonealraumes auf, die unter anderem durch eine Peritonitis hervorgerufen wird und zu einem kompakten Aneinanderhaften der Organe führte.



**Abb. 4.41 Makroskopische Aufnahmen zur Beurteilung der Anatomie von Mäusen nach einer Infektion mit *T. gondii*.** wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Mäuse wurden *i.p.* mit 20 Zysten (in PBS) *T. gondii* des Stammes ME49 infiziert, die zuvor aus Gehirnen von CD1 Mäusen aufbereitet wurden. Nach 0, 1 und 7 Tagen nach der Infektion wurden die Tiere auf ihre anatomische Beschaffenheit und Veränderung in dem Verlauf der Infektion untersucht und hier durch makroskopische Aufnahmen dargestellt.

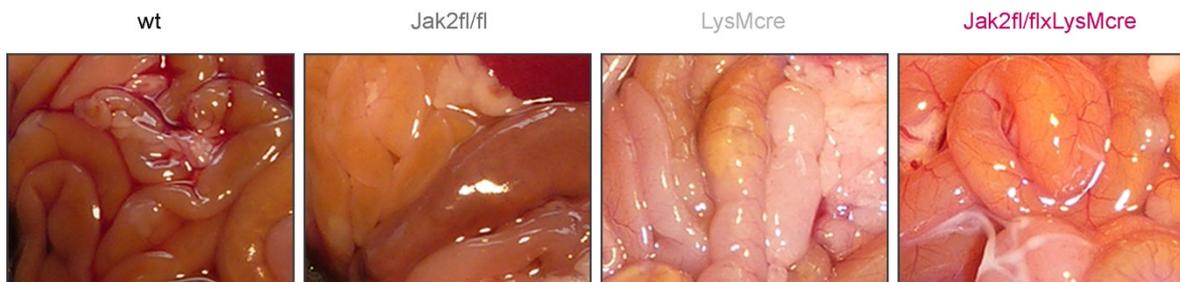
Um Veränderungen der Organe in dem Verlauf der Infektion mit *T. gondii* genauer zu charakterisieren, wurden Milz, Leber, Lunge und Gehirn an den Tagen 1 und 7 *post* Infektion gewogen und auf mögliche Anomalien untersucht. Hierbei dienten Organe nicht

infizierter Tiere als Kontrolle (Tag 0). Dem folgend wurde eine Abnahme des Milzgewichtes an Tag 1 nach der Infektion mit *T. gondii* der zu untersuchenden Gruppen von Mäusen beobachtet (Abb. 4.42 (A)). Weiterhin wiesen wt, Jak2fl/fl sowie LysMcre Mäuse eine Zunahme des Gewichts der Milz an Tag 7 *post* Infektion mit *T. gondii* auf, was die makroskopischen Aufnahmen und die dargestellte Splenomegalie aus Abbildung 4.41 bekräftigte. Auch die Milzen der Jak2fl/flxLysMcre Tiere nahmen in dem Verlauf der Infektion mit *T. gondii* an Gewicht zu. Jedoch war die Milz, wie ebenfalls in Abbildung 4.41 gezeigt, anhand des ermittelten Organgewichts an Tag 7 signifikant kleiner als die Milzen der entsprechenden drei Kontrollgruppen (Abb. 4.42 (A) rechts). Ebenso stieg das Gewicht des linken Leberlappens von wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren an Tag 7 gegenüber Tag 0 und Tag 1 nach Infektion durch den obligaten Parasiten an (Abb. 4.42 (B)). Wie auch in Abbildung 4.41 bereits beobachtet, war die Leber von Jak2fl/flxLysMcre am Tag 7 nach der intraperitonealen parasitären Infektion verkleinert und zeigte eine signifikante Differenz des Organgewichts im Vergleich zu den linken Leberlappen der Tiere der Kontrollgruppen (Abb. 4.42 (B) rechts). Gegensätzlich dazu wiesen Gehirn (Abb. 4.42 (C)) und Lunge (Abb. 4.42 (D)) keine signifikanten Unterschiede des ermittelten Organgewichts auf. Lediglich Jak2fl/flxLysMcre Tiere zeigten eine tendenzielle Abnahme des Lungengewichts im Verlauf der Infektion.



**Abb. 4.42 Organgewichte während einer Infektion mit *T. gondii*.** wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Mäuse wurden *i.p.* mit 20 Zysten (in PBS) *T. gondii* des Stammes ME49 infiziert, die zuvor aus Gehirnen von CD1 Mäusen aufbereitet wurden. Das Gewicht von (A) Milz, (B) Leber, (C) Gehirn und (D) Lunge wurde vor und im Verlauf der Infektion an den Tagen 0, 1 und 7 bestimmt. wt (n=10), Jak2fl/fl (n=10), LysMcre (n=10), Jak2fl/flxLysMcre (n=10) (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen), \*\*\*p<0,0005

Der deutlich akute Krankheitsverlauf der Toxoplasmose in Jak2fl/flxLysMcre Mäusen war auch in Bereichen des Darmes erkennbar. Wie makroskopische Vergrößerungen des Darmtraktes von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre an Tag 7 nach der Infektion zeigten, hatten Jak2fl/flxLysMcre Mäuse im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine Peritonitis entwickelt. Die Blutgefäße waren auffallend erweitert und die Oberfläche des Darmes wies Peritonitis-typische Fibrinablagerungen auf. Zudem waren die Peyer'schen Plaques deutlich gegenüber wt, Jak2fl/fl sowie LysMcre Tieren vergrößert und wiesen auf eine Infiltration immunologisch relevanter Zellen und eine akute Infektion in Jak2fl/flxLysMcre Tieren hin.



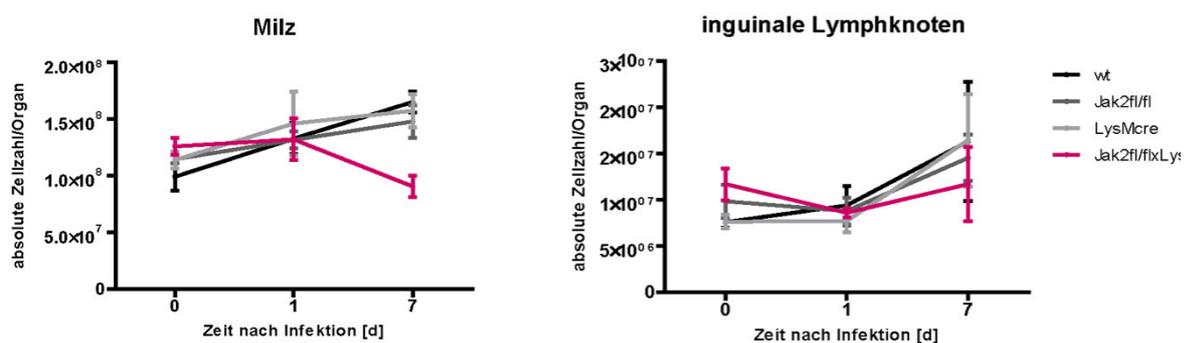
**Abb. 4.43 Makroskopische Aufnahmen des Darmtraktes von Mäusen nach einer Infektion mit *T. gondii*.** wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Mäuse wurden *i.p.* mit 20 Zysten (in PBS) *T. gondii* des Stammes ME49 infiziert, die zuvor aus Gehirns von CD1 Mäusen aufbereitet wurden. Dargestellt sind Vergrößerungen des Darmtraktes (*Intesitnum crassus*, *Intestinum tenue*, *Caecum*) der makroskopischen Aufnahmen aus Abb. 4.41 7 dpi.

Nach der Infektion mit dem obligaten Parasiten *T. gondii* konnte der Beginn eines schweren pathologischen Krankheitsverlaufes an Tag 7 beobachtet werden. Durch die Einleitung einer immunologischen Antwort bildeten wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tiere eine Splenomegalie sowie eine Hepatomegalie aus. Demgegenüber scheint in Jak2fl/flxLysMcre Tieren eine defiziente Ausbildung der immunologischen Antwort zu bestehen. So war keine signifikante Vergrößerung der Milz ermittelbar, jedoch wurde eine signifikante Verkleinerung der Leber beobachtet. Zudem entwickelten Jak2fl/flxLysMcre Tiere eine akute Peritonitis an Tag 7.

#### 4.2.4 Analyse von Zelltypen des Immunsystems während der Infektion mit *T. gondii*

Durch die Infektion des Wirts mittels eines Pathogens wird eine Immunantwort eingeleitet, die eine Migration immunkompetenter Zellen in periphere sekundäre lymphatische Organe wie die Milz und die drainierenden Lymphknoten einschließt (nach Janeway's Immunobiology (Murphy et al., 2008)). Bereits 1977 wurde durch Levine *et al.* beschrieben, dass eine akute Infektion von *T. gondii* zu einem Einstrom von Zellen in die Milz und zu einer Splenomegalie führt (Levine et al., 1977). Da innerhalb dieser Dissertation bereits gezeigt werden konnte, dass Jak2fl/flxLysMcre Tiere eine kaum vergrößerte Milz an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* besitzen (siehe Abb. 4.42 (A)), sollte im Folgendem die Verteilung immunologischer Effektorzellen in der Milz und der nach einer intraperitonealen Infektion drainierenden inguinalen Lymphknoten (Kool et al., 2008) analysiert werden.

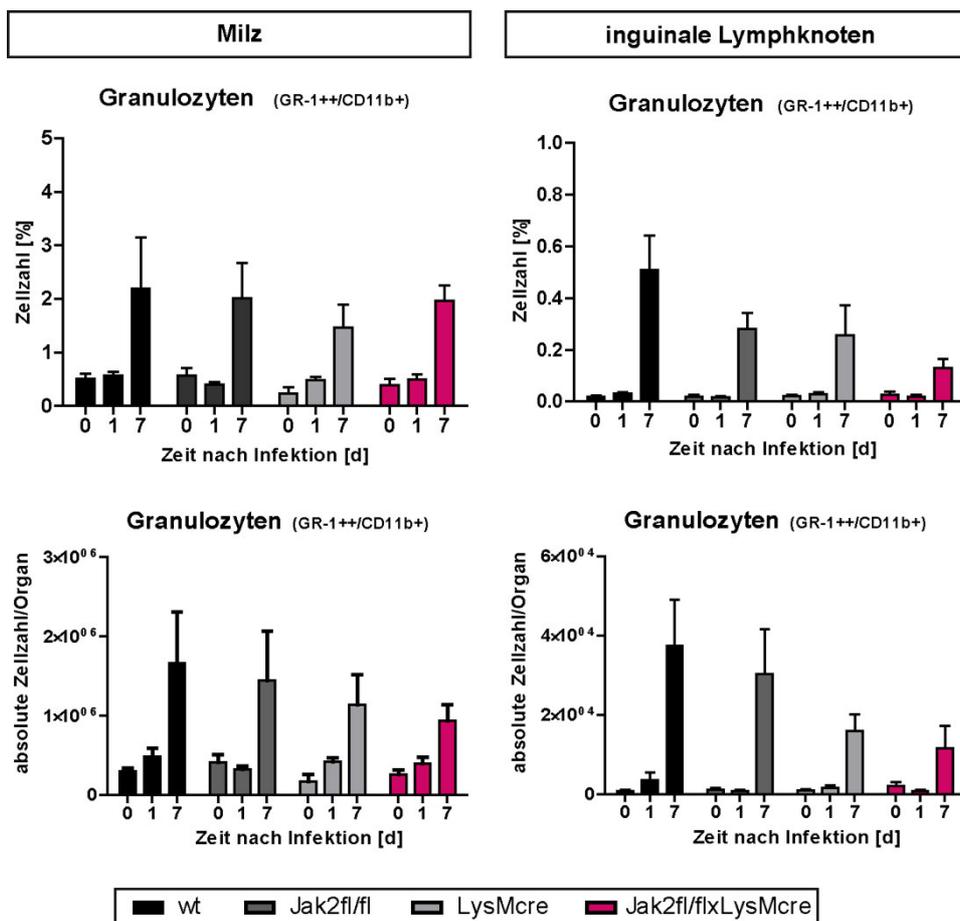
Hierfür wurden wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Mäuse mit 20 *T. gondii* Bradyzoiten behaltenden Zysten infiziert und die Milz und die inguinalen Lymphknoten aller Versuchstiere an den Tagen 1 und 7 *post* Infektion entnommen. Die durch einen Verdau mit Kollagenase und DNase I aufbereiteten Zellen wurden anschließend durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker markiert und mittels der Durchflusszytometrie analysiert und quantifiziert. Nicht infizierte Tiere (Tag 0) dienten als Kontrolle. Wie in Abbildung 4.44 dargestellt, war bereits eine Differenz in der gesamten Anzahl der Zellen in der Milz (links) an Tag 7 zwischen den wt, Jak2fl/fl und LysMcre zu Jak2fl/flxLysMcre Tieren feststellbar. So nahm die absolute Zellzahl der Milz von wt, Jak2fl/fl, und LysMcre Tieren nach der Infektion zu, wohingegen die absolute Zellzahl der Milz von Jak2fl/flxLysMcre Tiere abnahm. Die drainierenden inguinalen Lymphknoten wiesen ebenfalls eine Abnahme der absoluten Zellzahl auf. So stieg die absolute Zellzahl der Lymphknoten an Tag 7 nach Infektion in wt, Jak2fl/fl sowie LysMcre Tieren deutlich, in Jak2fl/flxLysMcre Tieren jedoch lediglich gering an.



**Abb. 4.44 Anzahl der Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** (A) Milz und (B) inguinale Lymphknoten wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren entnommen und die Anzahl der isolierten Zellen nach Kollagenase und DNase I Verdau bestimmt. (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Nach einer Infektion mit *T. gondii* infiltrieren neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen als erste immunologische Effektorzellen infiziertes Gewebe und die drainierenden Lymphknoten (Bliss et al., 2000; Dunay et al., 2008; Liu et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003). Durch die Erkennung pathogener Strukturen werden Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen aktiviert, kontrollieren

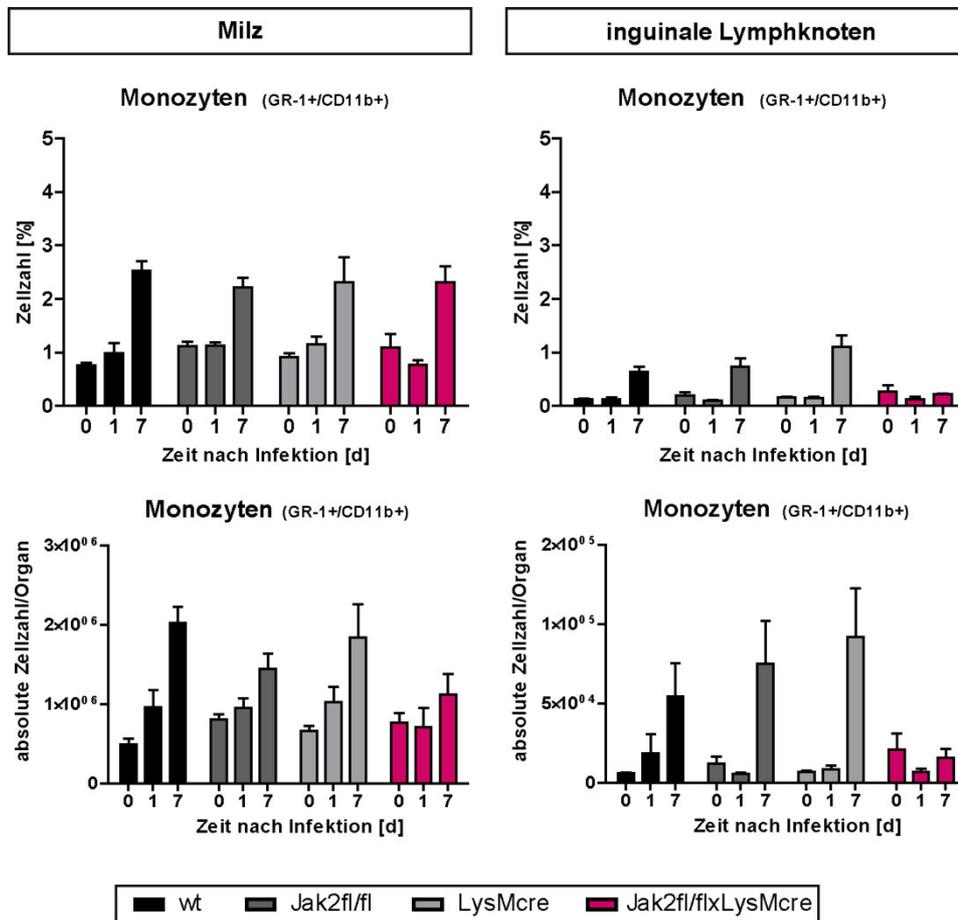
die Replikation von Pathogenen und leiten die adaptive Immunantwort ein (Dupont et al., 2012). Deshalb wurden anhand einer FACS-Analyse Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen in der Milz und den drainierenden inguinalen Lymphknoten quantifiziert. Der Anteil von Granulozyten als auch deren absolute Zahl in der Milz und den inguinalen Lymphknoten nahmen an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* in allen untersuchten Genotypen deutlich zu, wohingegen an Tag 1 keine Zunahme der Zahl von Granulozyten in der Milz und den Lymphknoten beobachtet werden konnte (Abb. 4.45). Interessanterweise waren im Vergleich dazu in Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 tendenziell weniger Granulozyten in der Milz und den drainierenden Lymphknoten, als in den drei untersuchten Kontrollgruppen. Überraschenderweise zeigten LysMcre Tiere ebenfalls eine geringere Zahl von Granulozyten in den Lymphknoten.



**Abb. 4.45 Granulozyten in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der Granulozyten sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19/CD3- (nicht B-/T-Zellen), GR-1<sup>++</sup>, CD11b<sup>+</sup> (Granulozyten); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

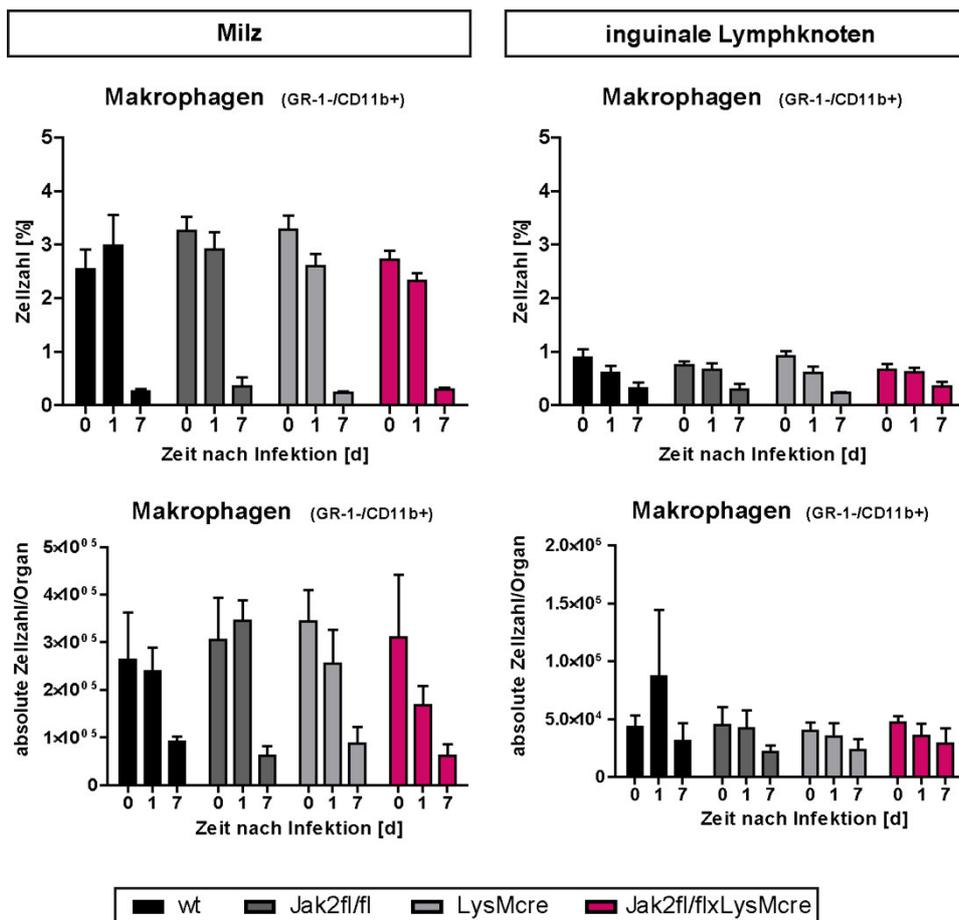
Neben den Granulozyten, waren auch mehr Monozyten in der Milz und den inguinalen Lymphknoten an Tag 7 nach der Infektion mit *T. gondii* nachweisbar (Abb. 4.46). Anders als die homogene prozentuale Verteilung von Monozyten in der Milz (links oben), war die absolute Anzahl von Monozyten in der Milz von Jak2fl/flxLysMcre Tieren reduziert (links unten). Zudem waren höhere Zahlen an Monozyten in der Milz von wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren bereits an Tag 1 nach der Infektion mit *T. gondii* zu finden. Die Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre Tieren wiesen bereits anhand der prozentualen

Verteilung eine geringere Zahl von Monozyten auf (rechts oben). Im Gegensatz zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren nahm ebenfalls die absolute Zellzahl von Monozyten in die drainierenden Lymphknoten am Tag 7 nach der Infektion nicht zu (rechts unten).



**Abb. 4.46 Monozyten in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der Monozyten, sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19/CD3- (nicht B-/T-Zellen), GR-1+, CD11b+ (Monozyten); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

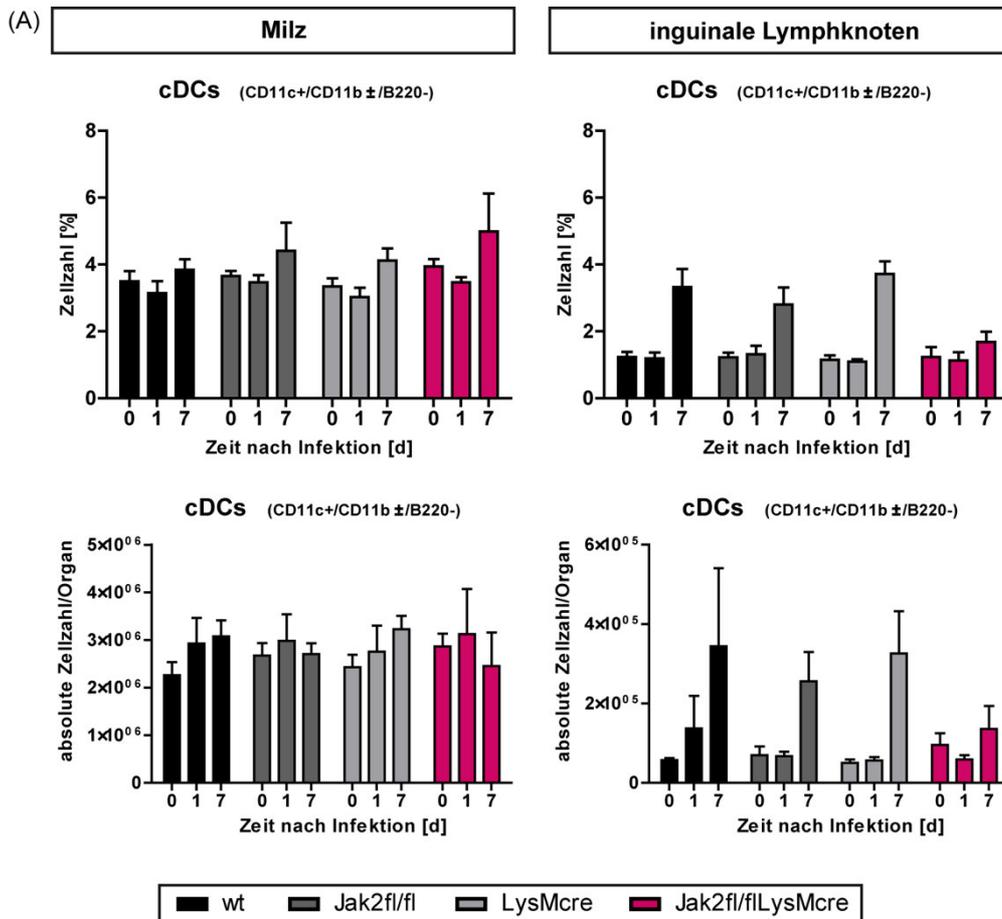
Interessanterweise nahm die Anzahl von Makrophagen in der Milz und den drainierenden inguinalen Lymphknoten im Verlauf der Infektion mit *T. gondii* signifikant ab (Abb. 4.47). Gegenteilig zu Tag 1 wiesen an Tag 7 nach der Infektion alle untersuchten Genotypen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre) eine Abnahme der Anzahl von Makrophagen der Milz und den inguinalen Lymphknoten auf.

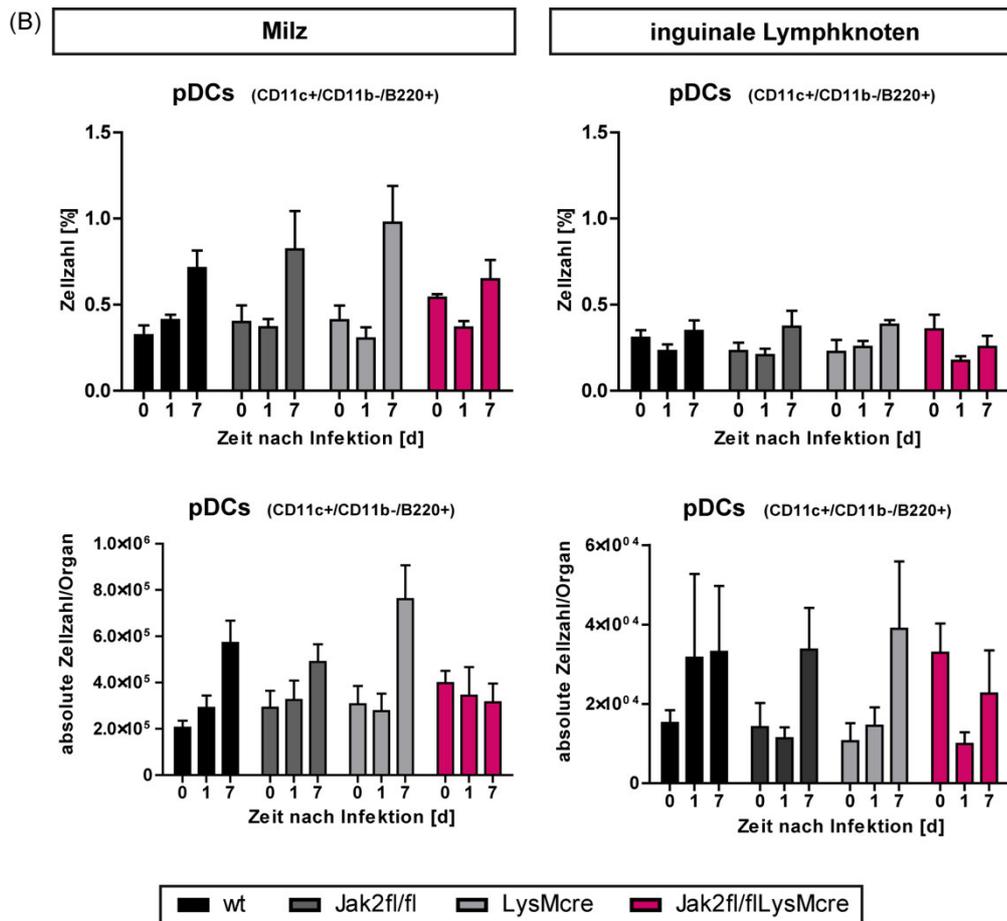


**Abb. 4.47 Makrophagen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der Makrophagen, sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19/CD3- (nicht B-/T-Zellen), GR-1-, CD11b+ (Makrophagen); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Neben Granulozyten, Monozyten und Makrophagen besitzen Dendritische Zellen essentielle Funktionen als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort nach der Infektion des Wirts durch *T. gondii* (Dupont et al., 2012). So gelten konventionelle Dendritische Zellen (cDC's) als Hauptquelle für Interleukin-12 nach einer Toxoplasmen-Infektion (Reis e Sousa et al., 1997). Nach der Infektion mit *T. gondii* war an Tag 7 eine geringe Zunahme des Anteils von cDC's der Milz von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre (Abb. 4.48, links oben). Auch die totale Anzahl von cDCs in der Milz, war an Tag 1 und 7 angestiegen (links unten). Überraschenderweise zeigten Jak2fl/fl und Jak2fl/flxLysMcre eine abnehmende Population von cDCs an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Im Gegensatz zu der Milz wiesen die inguinalen Lymphknoten eine Zunahme der cDCs an Tag 7 auf (rechts). Anders als in wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren, die eine sichtbare Zunahme der cDCs an Tag 7 aufwiesen (Anstieg des Anteils (rechts oben) als auch der totalen Zellzahl) fand sich nur eine sehr geringe Zahl von cDCs in den Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre Tieren. Neben der essentiellen Funktion von cDCs während der angeborenen Immunantwort gegen *T. gondii* sind ebenfalls bedeutende Funktionen für plasmazytoide Dendritische Zellen bekannt (Pepper et al., 2008). So befanden sich parallel zu cDCs ebenfalls pDCs in der Milz von wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren an Tag 7 nach Infektion der Tiere mit *T. gondii* (Abb. 4.48 (B)). Im Gegensatz zu der zunehmenden Zahl an pDCs (links oben: relative Zunahme; links unten: Zunahme der

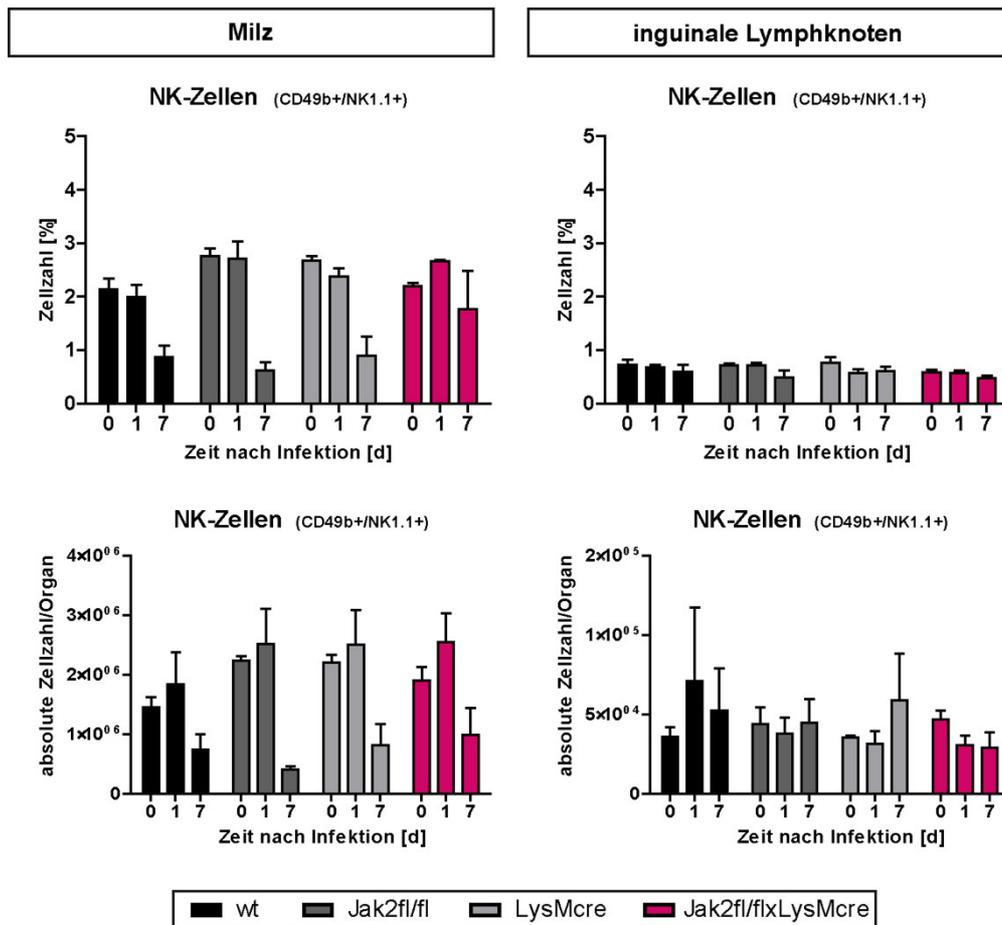
Gesamtzellzahl) der drei untersuchten Kontrollgruppen, konnte eine Erhaltung von pDCs der Milzen von Jak2fl/flxLysMcre Tieren nicht nachgewiesen werden. Dies zeigte sich insbesondere in den drainierenden Lymphknoten nach *T. gondii* Infektion wo die Zahl der pDCs von Jak2fl/flxLysMcre Tieren nicht anstieg (rechts). Anders als in wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren, wo pDCs sowohl in ihrem relativen Anteil als auch in ihrer absoluten Anzahl der inguinalen Lymphknoten zunahmen, wiesen dort die Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre Tieren keinen signifikanten Unterschied zu den Anteilen der pDC's an Tag 0 oder Tag 1 nach der Infektion auf.





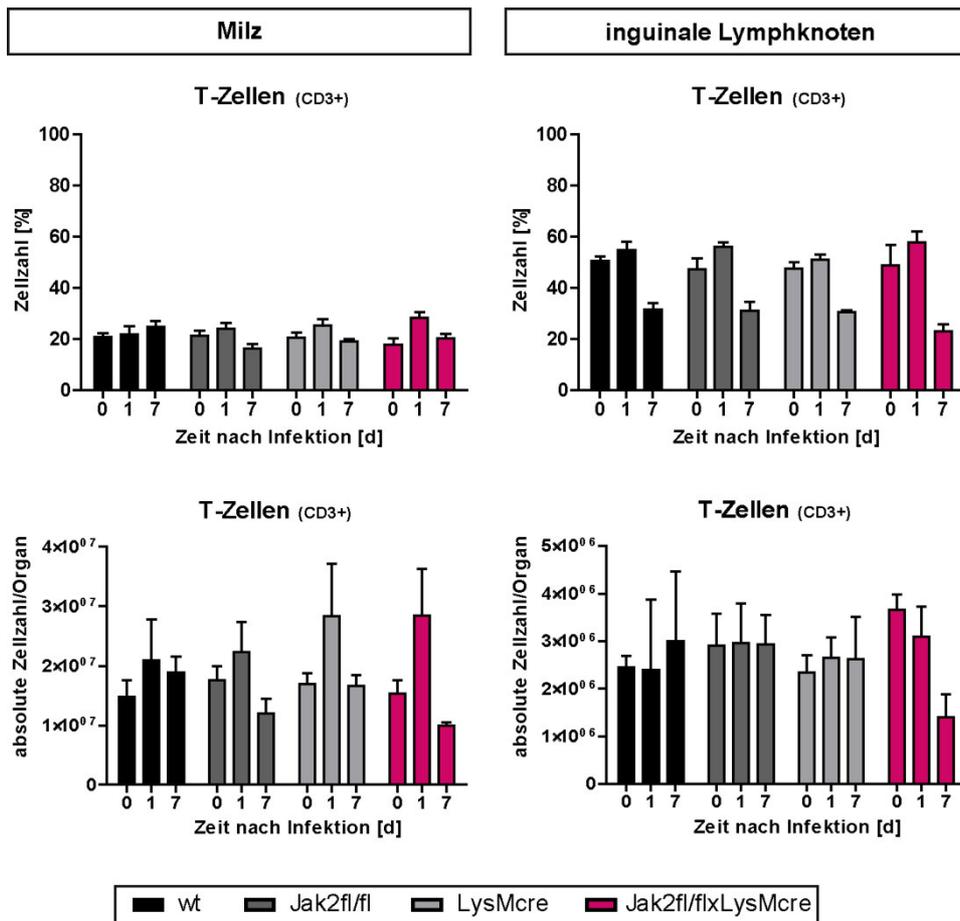
**Abb. 4.48 Dendritische Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der (A) cDcs und (B) pDCs sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19/CD3- (nicht B-/T-Zellen), CD11c+ (Dendritische Zellen), CD11b±/B220- (cDC's), CD11b-/B220+ (pDC's); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Durch die Sekretion von IL-12 werden im Laufe der Immunantwort gegen *T. gondii* weitere Effektorzellen der angeborenen Immunität rekrutiert und aktiviert; die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Gazzinelli et al., 1993). Im Verlauf der Infektion mit *T. gondii* nahm die NK-Zellzahl in wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 1 der Infektion sowohl prozentual als auch in der totalen Anzahl der Zellen in der Milz zunächst leicht zu, am Tag 7 dagegen sichtbar ab (Abb. 4.49, links). Im Gegensatz dazu war in den inguinalen Lymphknoten der Anteil der NK-Zellen in allen vier untersuchten Genotypen unverändert (rechts oben). Eine Abnahme oder Zunahme der absoluten Zahl der NK-Zellen der Lymphknoten, war aufgrund der zum Teil sehr hohen Standardabweichungen schwer zu bestimmen und definitive Unterschiede zwischen den untersuchten vier Gruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre) waren nicht erkennbar.



**Abb. 4.49** NK-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*. Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der NK-Zellen sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19/CD3- (nicht B-/T-Zellen), CD49b+/NK1.1+ (NK-Zellen); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

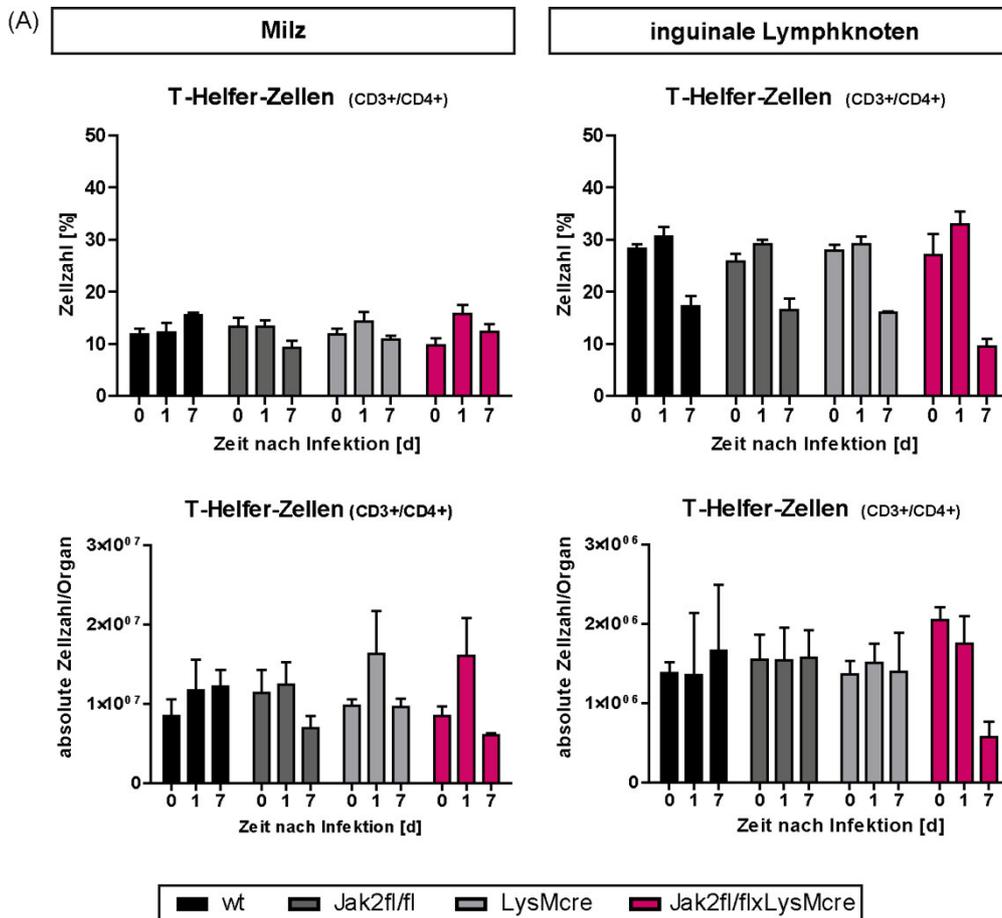
Neben NK-Zellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (DCs und Makrophagen) und deren Sekretion von IL-12 T-Zellen aktiviert und rekrutiert (Guermontez et al., 2002). Während der Immunantwort gegen *T. gondii* stieg der Anteil der T-Zellen (links oben) und die gesamte Anzahl der T-Zellen (links unten) der Milz gleichermaßen in wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre an (Abb. 4.50). Jedoch nahm die Anzahl der T-Zellen in der Milz bereits an Tag 7 der Infektion ab. Auch die drainierenden Lymphknoten wiesen eine Zunahme des Anteils der T-Zellen an Tag 1 der Infektion auf (rechts oben), gefolgt von einer Abnahme an Tag 7. Im Gegensatz dazu war die totale Anzahl der T-Zellen der Lymphknoten (rechts unten). In wt Tieren fanden sich an Tag 7 mehr T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten, Jak2fl/fl Tiere wiesen keine zunehmende oder abnehmende Zahl von T-Zellen auf. Dagegen zeigten LysMcre Tiere bereits an Tag 1 eine geringe Anzahl von T-Zellen, die über Tag 7 der Infektion hinaus konstant blieb. Interessanterweise besaßen Jak2fl/flxLysMcre eine erhöhte Anzahl von T-Zellen im naiven Zustand, die im Zuge der Infektion mit *T. gondii* über Tag 1 bis 7 kontinuierlich abnahm und an Tag 7 deutlich geringer war, als in den drei untersuchten Kontrollgruppen.

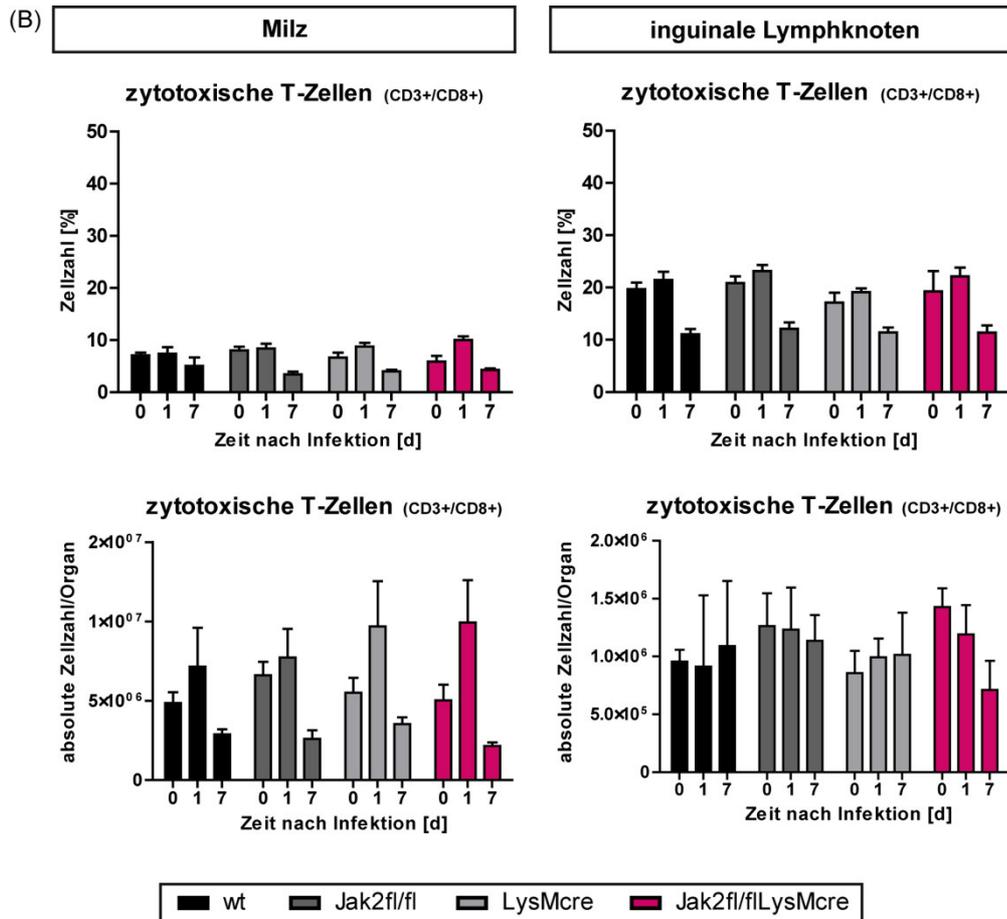


**Abb. 4.50 T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der T-Zellen sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gegated auf: DAPI- (lebend), CD3+ (T-Zellen); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Um die T-Zellpopulationen während der Immunantwort gegen *T. gondii* genauer zu charakterisieren, wurden zwei weitere Oberflächenmoleküle untersucht, die die T-Zellen in T-Helfer-Zellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+) unterteilen (Germain, 2002). Wie anhand der Abbildung 4.50 bereits zu erwarten, waren die T-Helfer-Zellzahlen (Abb. 4.51 (A) links) und die zytotoxische T-Zellzahlen (Abb. 4.51 (B) rechts) an Tag 1 der Infektion tendenziell in der Milz erhöht. Zudem nahm der Anteil der T-Helfer- sowie der zytotoxischen T-Zellen an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* ab. Ein Unterschied zwischen den analysierten Gruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre) war nicht erkennbar. Demgegenüber waren in den drainierenden Lymphknoten deutliche Unterschiede in der Zahl von T-Helfer-Zellen detektierbar (A; rechts). An Tag 1 der Infektion war keine Zunahme des Anteils oder der totalen T-Zellzahl der inguinalen Lymphknoten erkennbar. Vergleichbar mit der Milz war die Anzahl der T-Helfer-Zellen in den Lymphknoten an Tag 7 der Infektion geringer, welche jedoch in Jak2fl/flxLysMcre Tieren gegenüber den analysierten Kontrollgruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre) dramatisch gesunken war (besonders: gesamte Anzahl der T-Helfer-Zellen/Lymphknoten). Auch wiesen alle untersuchten Gruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre) eine leichte Zunahme der zytotoxischen T-Zellen in den Lymphknoten an Tag 1 auf (B; rechts) gefolgt von einer Abnahme des Anteils der zytotoxischen T-Zellen an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* (B; rechts oben). Eine Abnahme oder Zunahme der absoluten Zahl der

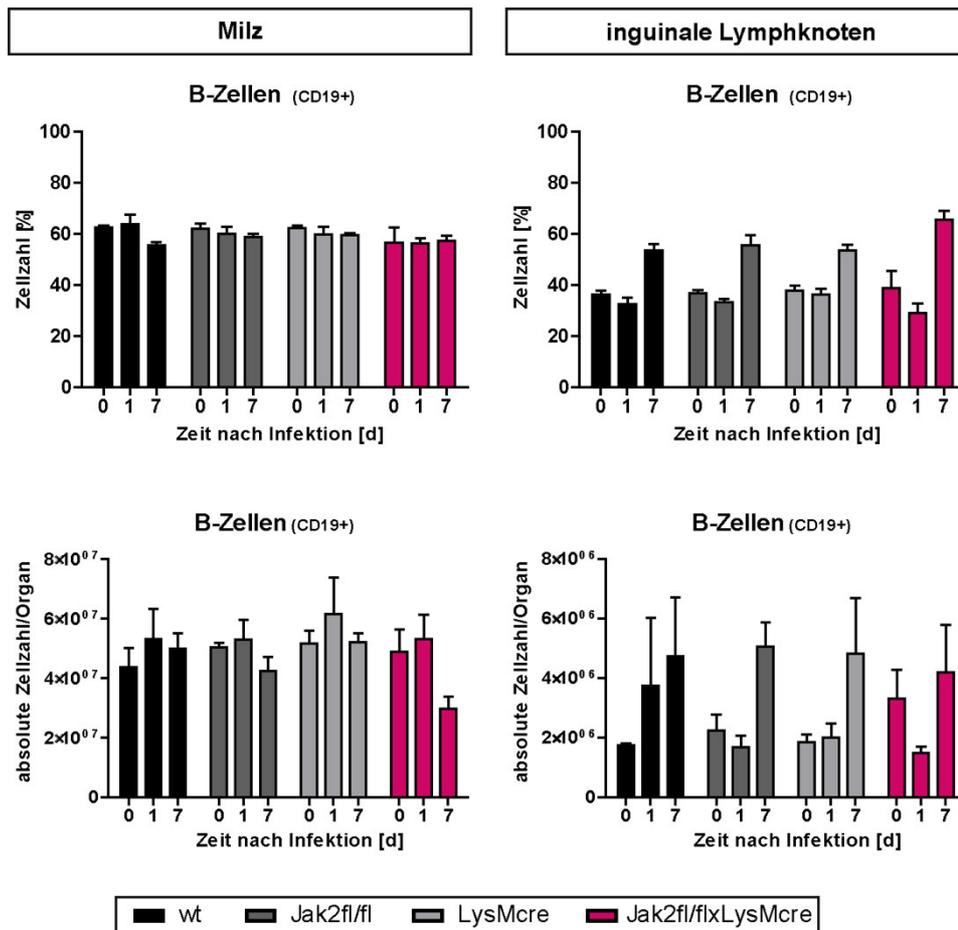
zytotoxischen T-Zellen in den analysierten Lymphknoten war aufgrund der zum Teil sehr hohen Standardabweichungen schwer zu bestimmen. Daher waren definitive Unterschiede zwischen den untersuchten drei Gruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre) nicht ermittelbar. Jak2fl/fl;LysMcre wiesen jedoch auch hier eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl der zytotoxischen T-Zellen im Verlauf einer *T. gondii* Infektion über die Tage 1 bis 7 auf.





**Abb. 4.51 T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Milz (links) und inguinale Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der (A) T-Helfer-Zellen und (B) zytotoxische T-Zellen sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gegated auf: DAPI- (lebend), CD3+ (T-Zellen), CD3+/CD4+ (T-Helfer-Zellen) oder CD3+/CD8+ (zytotoxische T-Zellen); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Wie bereits bekannt, sind T-Helfer-Zellen für die Ausbildung einer B-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort verantwortlich und die Antikörperantwort ist bedeutend für die Eliminierung von *T. gondii* (Johnson and Sayles, 2002; Sabin and Feldman, 1948). Im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* änderte sich der Anteil der B-Zellen der Milz und den inguinalen Lymphknoten aller analysierten Gruppen nicht (Abb. 4.52; links oben). Jedoch wiesen wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre eine tendenzielle Erhöhung der absoluten Anzahl der B-Zellen an Tag 1 und eine Abnahme an Tag 7 der Infektion auf, die allerdings entgegengesetzt dazu in Jak2fl/flxLysMcre Tieren deutlich zunahm (links unten). Dagegen wiesen die analysierten inguinalen Lymphknoten an Tag 7 der Infektion eine deutliche Zunahme der Zahl der B-Zellen in den Lymphknoten auf (prozentual und in der gesamten Anzahl der B-Zellen). Eine Differenz zwischen wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre war weder im relativen Anteil, noch in der Gesamtzellzahl der B-Zellen der inguinalen Lymphknoten ermittelbar.



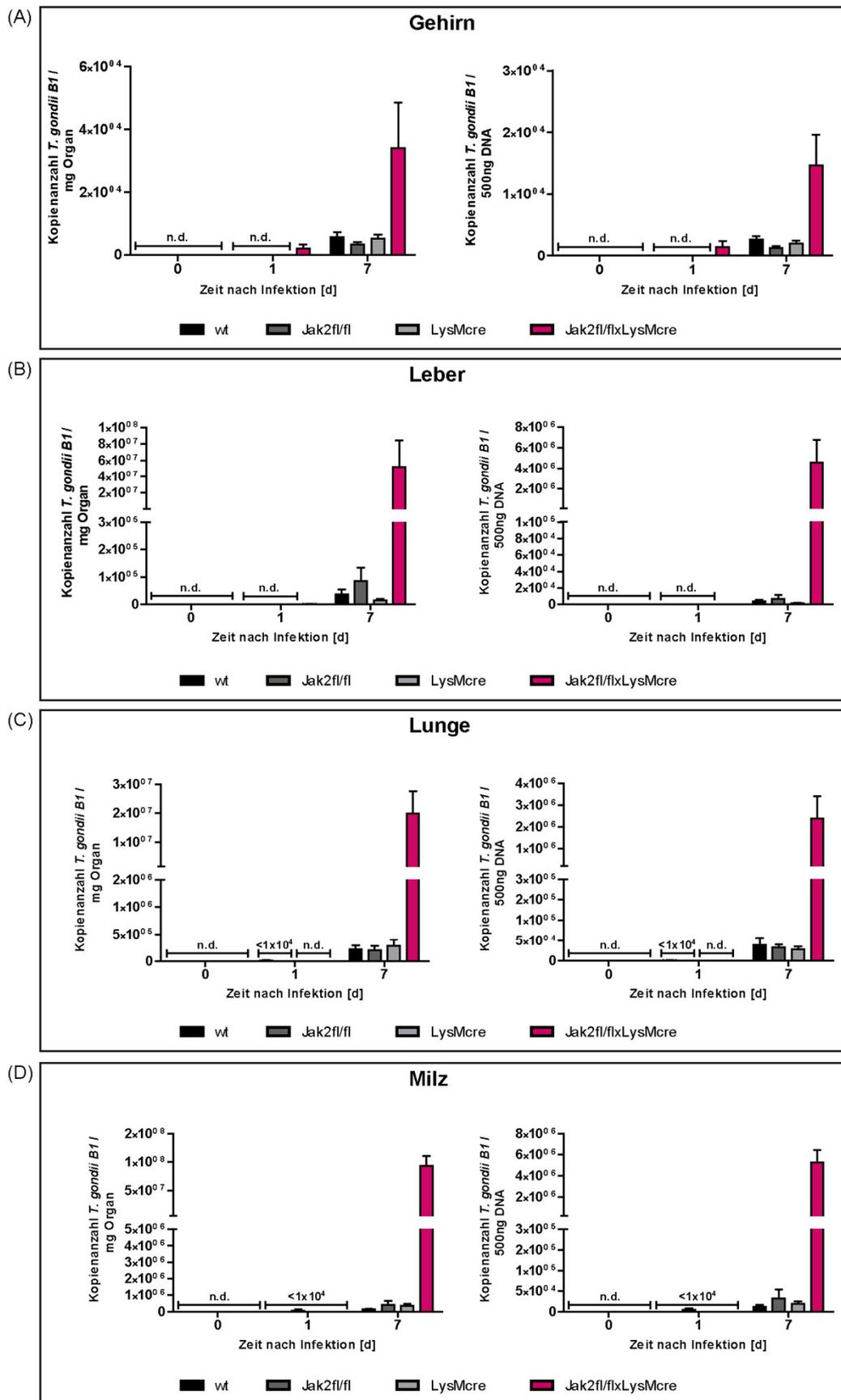
**Abb. 4.52 B-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*.** Die Milz (links) und die inguinalen Lymphknoten (rechts) wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und der Anteil der B-Zellen sowie die gesamte Anzahl der Zellen pro Organ durch eine FACS-Analyse bestimmt. Gated auf: DAPI- (lebend), CD19+ (B-Zellen); (n=4), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Zusammenfassend verändern sich die Zahlen an immunologischen Effektorzellen während einer Immunantwort gegen den Parasiten *T. gondii* in der Milz und den drainierenden inguinalen Lymphknoten. Interessanterweise ist die Anzahl von Monozyten (Milz und Lymphknoten), cDCs (Lymphknoten), pDCs (Milz), T-Helfer-Zellen (Lymphknoten) sowie B-Zellen (Milz) in Jak2fl/flxLysMcre deutlich geringer, als in wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren, weshalb eine gestörte Immunantwort gegenüber *T. gondii* höchstwahrscheinlich ist.

#### 4.2.5 Analyse der parasitären Last in Organen während der Infektion mit *T. gondii*

Die vorherigen Ergebnisse belegen, dass Jak2-vermittelte Signale in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen essentiell für das Überleben nach einer Infektion mit *T. gondii* sind. Durch eine Defizienz von Jak2 in Granulozyten, Monozyten oder auch Makrophagen entstand im Verlauf der Infektion mit *T. gondii* eine akute Peritonitis und pathologische Veränderungen der Milz sowie der Leber. Die Analyse der parasitären Last der Organe konnte weiteren Aufschluss über die Schwere der Infektion bieten. Wie bereits beschrieben wurde, infiziert *T. gondii* u. a. die Leber, die Lunge, die Milz und migriert schließlich über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (Abbott et al., 2006; Dubey, 1997a).

Dort wird im normalem Verlauf der Infektion durch die Stadienkonversion der schnell replizierenden Tachyzoiten in die in Zysten überdauernden Bradyzoiten der Übergang von der akuten in die chronische Infektion eingeleitet (Hunter and Sibley, 2012). Nach einer Infektion von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren mit *T. gondii* wurden daher an den Tagen 1 und 7 nach der Infektion Gehirn, Leber, Lunge und Milz entnommen und nach Isolation der DNA die Anzahl der Kopien des *T. gondii* B1 Gens als Maß für die Last an Parasiten bestimmt. Hierfür dienten nicht infizierte Tiere als Kontrolle (Tag 0). An Tag 1 nach Infektion mit *T. gondii* konnte weder ein signifikanter Anstieg in der Kopienanzahl des *T. gondii* spezifischen B1 Genes beobachtet werden noch ein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre). Bereits an Tag 1 migrierten Toxoplasmen in das Gehirn von Jak2fl/flxLysMcre Tieren (Abb. 4.53 (A)). Auch an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii*, war die parasitäre Last in Bezug auf das Gewicht des Gehirns oder die Menge an isolierter DNA in Jak2fl/flxLysMcre Tieren signifikant erhöht gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren. Die primär von *T. gondii* infizierten peripheren Organe Leber (Abb. 4.53 (B)), Lunge (Abb. 4.53 (C)) und Milz (Abb. 4.53 (D)) wiesen gegenüber dem Gehirn deutlich gesteigerte Zahlen von *T. gondii* Parasiten in Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 nach der Infektion auf. Besonders in der Leber, in der Lunge, als auch in der Milz von Jak2fl/flxLysMcre war die Toxoplasmenlast dramatisch gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren erhöht (Leber:  $6 \times 10^7$  vs.  $1 \times 10^5$ ; Lunge:  $3 \times 10^7$  vs.  $5 \times 10^5$ ; Milz:  $1 \times 10^8$  vs.  $1 \times 10^6$ ).



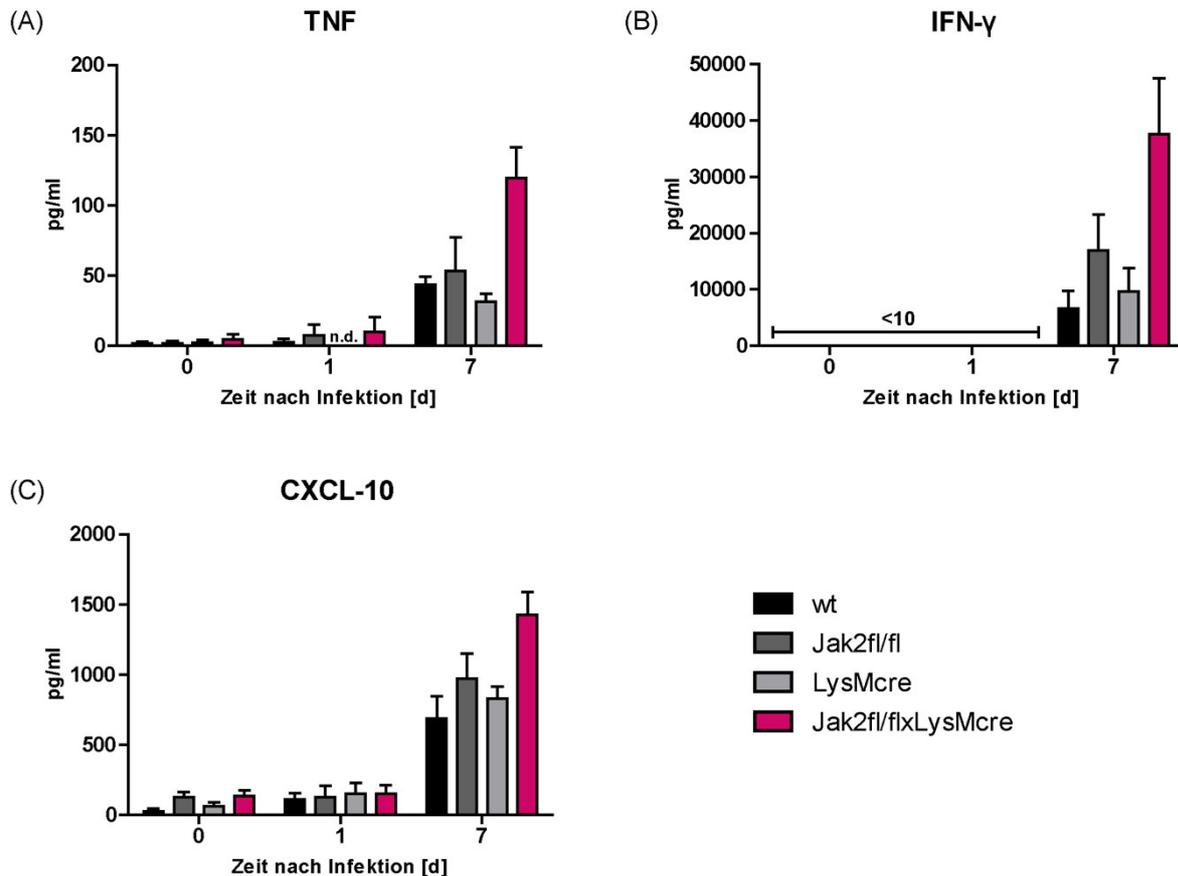
**Abb. 4.53 Toxoplasmenlast in Gehirn, Leber, Lunge und Milz.** (A) Gehirn, (B) Leber, (C) Lunge und (D) Milz wurden aus naiven und mit *T. gondii* infizierten wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 entnommen und die gesamte DNA aufgereinigt. Anschließend wurde die Last der Parasiten anhand der Bestimmung der Kopienanzahl des für *T. gondii* spezifischen *B1* Genes durch die qPCR-Methode ermittelt; (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen). Links Kopienzahl pro Organ, rechts Kopienzahl pro 500 ng DNA aus Organ.

Eine Infektion mit *T. gondii* führte in Tieren mit einem konditionalen Knockout für Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu einem *T. gondii*-spezifischen Proliferationsvorteil in Leber, Lunge und Milz (akute Infektion). Auch das Gehirn von Jak2fl/flxLysMcre Tieren wies bereits an Tag 1 und 7 eine deutlich erhöhte Toxoplasmen-Last auf. Diese dramatisch erhöhte Last des Parasiten in den untersuchten Organen stellt einen weiteren Hinweis auf einen Defekt der Immunantwort gegen *T. gondii* dar.

#### 4.2.6 Untersuchung proinflammatorischer Zytokine während der Immunantwort gegen *T. gondii*

Für die Ausbildung einer Immunantwort gegen *T. gondii* ist die Produktion und die Regulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-12, und IFN- $\gamma$  essentiell (Gazzinelli et al., 1994; Suzuki et al., 1988; Yap et al., 1998). Um die Sekretion der Zytokine zu untersuchen, sollte deren Konzentration im Serum *T. gondii* infizierter Tiere ermittelt werden. Daher wurden wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tiere mit *T. gondii* infiziert und das Serum an den Tagen 1 und 7 entnommen. Nicht infizierte Tiere dienten hierbei als Kontrolle (Tag 0). Die Bestimmung der Konzentrationen von TNF, IFN- $\gamma$  und CXCL-10 erfolgte mittels ELISA. Die Bildung und Sekretion von TNF (überwiegend durch Dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen) aktiviert weitere Makrophagen und induziert anti-parasitäre Mechanismen, wie die Expression des NO-bildenden Enzyms iNOS (Bennouna et al., 2003; Chang et al., 1990; Deckert-Schluter et al., 1998; Li et al., 1994). An Tag 1 nach der Infektion mit *T. gondii* wurde in allen untersuchten Genotypen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre) keine Sekretion von TNF induziert (Abb. 4.54 (A)). An Tag 7 war schließlich eine Ausschüttung von TNF in das Serum nachweisbar, die zudem in Jak2fl/flxLysMcre Tieren deutlich um den Faktor 2,5 erhöht war. Überraschenderweise zeigten Jak2fl/fl eine leichte Zunahme an TNF gegenüber wt und LysMcre Tieren. Die Ausschüttung von IL-12 durch Dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten, inflammatorische Monozyten und Makrophagen induziert T- und NK-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  (Bliss et al., 1999; Gazzinelli et al., 1993; Gazzinelli et al., 1994; Liu et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003). Die Bestimmung der Konzentration von IL-12p70 wies auf eine Überproduktion von IL-12p70 in den Seren von Jak2fl/flxLysMcre hin (Daten nicht gezeigt), konnte jedoch im Rahmen der bisherigen Arbeit nicht eindeutig reproduziert werden. Das sekretierte IFN- $\gamma$  ist als Hauptmodulator der Immunantwort gegen *T. gondii* für die Einleitung verschiedener anti-parasitärer Mechanismen verantwortlich (Adams et al., 1990; Howard et al., 2011). An den Tagen 1 und in nicht infizierten Gruppen waren nur sehr geringe Konzentrationen von IFN- $\gamma$  nachweisbar (Abb. 4.54 (B)). Nach der Infektion wurden schließlich sehr hohe Mengen an IFN- $\gamma$  an Tag 7 in das Serum sezerniert. Hier zeigten Jak2fl/flxLysMcre Tiere sogar dramatisch hohe Mengen an IFN- $\gamma$  (ca. 40 $\mu$ g/ml), die gegenüber wt und LysMcre um den Faktor 4 und überraschenderweise gegenüber Jak2fl/fl Tieren lediglich um den Faktor 2 erhöht waren. Neben der Aktivierung von iNOS oder der GTPasen wird in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  CXCL-10 sezerniert, welches für die Rekrutierung von T-Zellen verantwortlich ist (Dufour et al., 2002). Auch CXCL-10 zeigte, wie zu erwarten, keine signifikante Erhöhung der Konzentration an Tag 1 nach der Infektion (Abb. 4.54 (C)). Ähnlich zu TNF und IFN- $\gamma$  war an Tag 7 nach der Infektion die Produktion und Sekretion des Chemokins nachweisbar. Auch hier war die Chemokinmenge in Jak2fl/flxLysMcre Tieren gegenüber

wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren signifikant erhöht, wobei Jak2fl/fl ebenfalls einen Anstieg der CXCL-10 Konzentration aufwiesen.



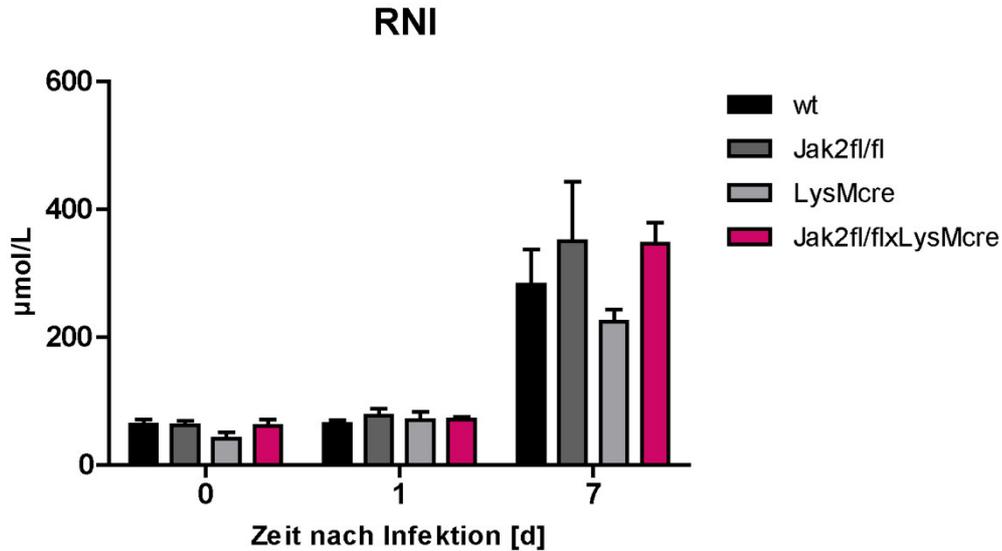
**Abb. 4.54 Nachweis von Zytokinen im Serum nach Infektion mit *T. gondii*.** Die Entnahme des Serums von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren erfolgte an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Die Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine (A) TNF, (B) IFN-γ und (C) CXCL-10 erfolgte mit Hilfe der Durchführung von ELISAs. (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

Eine Defizienz von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen führte somit zu einer Änderung des Zytokinmilieus nach einer Infektion mit dem Parasiten *T. gondii*. Die Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine im Serum von Jak2fl/flxLysMcre Tieren trägt vermutlich zu der schweren Toxoplasmose und einem septischen Schock der untersuchten Tiere bei.

#### 4.2.7 Analyse IFN-γ induzierter anti-parasitärer Mechanismen

Wie bereits in Abschnitt 4.2.7 beschrieben, induziert die Bindung von IFN-γ an dessen kognaten Rezeptor (IFNGR) die Aktivierung anti-parasitär wirkender Mechanismen, wie die Produktion von NO in Makrophagen (Adams et al., 1990). Da Jak2 essentiell für die IFNGR vermittelte Signalweiterleitung ist (O'Shea et al., 2002), sollte die Produktion von NO-Metaboliten (RNI: reactive nitrogen species) nach der Infektion mit *T. gondii* analysiert werden. Daher wurden wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tiere mit *T. gondii* infiziert und die Konzentration der RNI in den Seren der infizierten Tiere an den Tagen 1 und 7 nach der Infektion bestimmt. Hierbei dienten entnommene Seren nicht infizierter Tiere als Kontrolle (Tag 0). Wie erwartet waren an den Tagen 0 und 1 nur sehr geringe

Mengen an RNI in allen untersuchten Genotypen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre) nachweisbar (Abb. 4.55). Überraschenderweise zeigten Jak2fl/flxLysMcre jedoch nicht wie erwartet kleinere Mengen an gebildetem RNI; im Gegensatz zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren. Demnach stieg die RNI-Konzentration in den analysierten Seren an Tag 7 nach der Infektion an, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier analysierten verschiedenen Genotypen festgestellt werden.



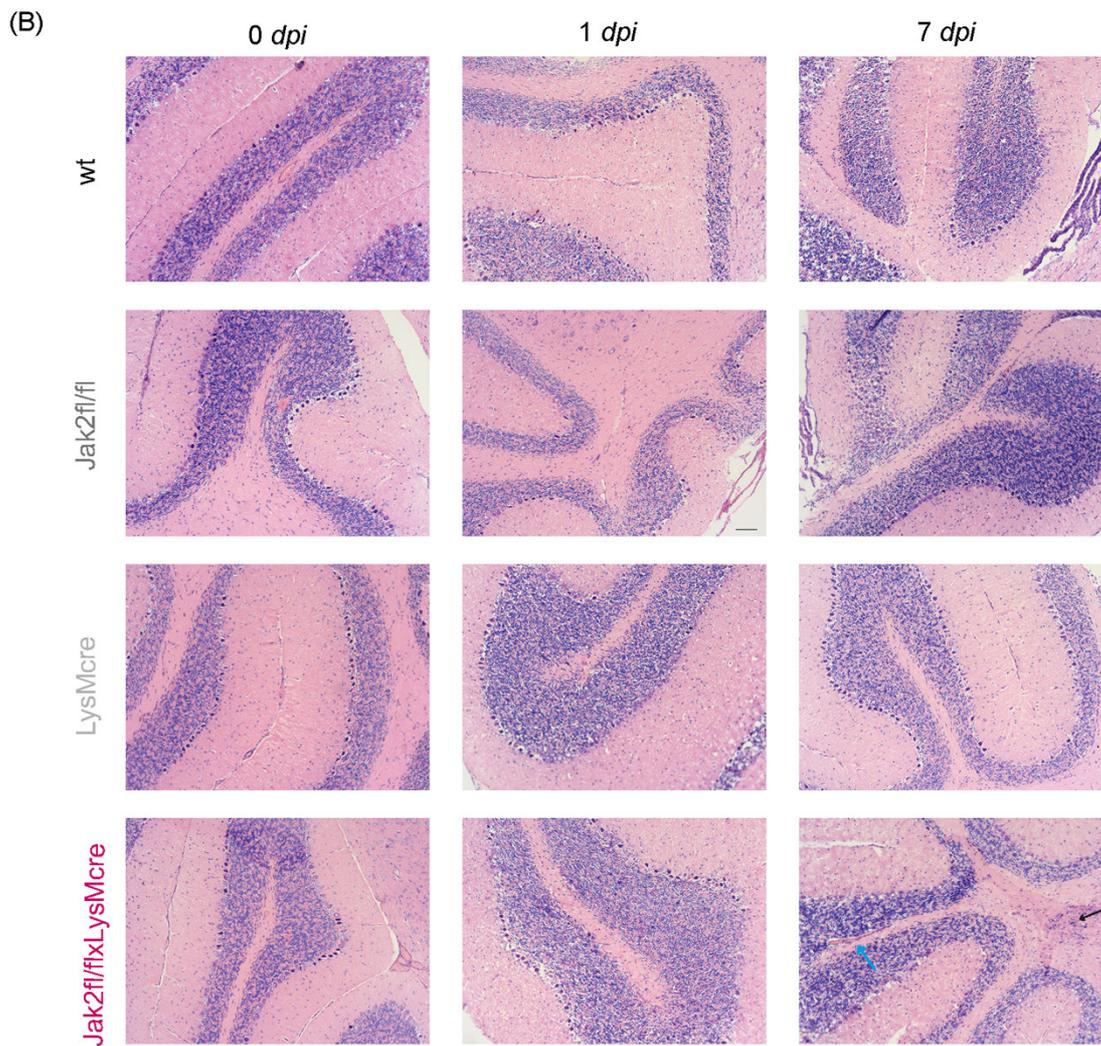
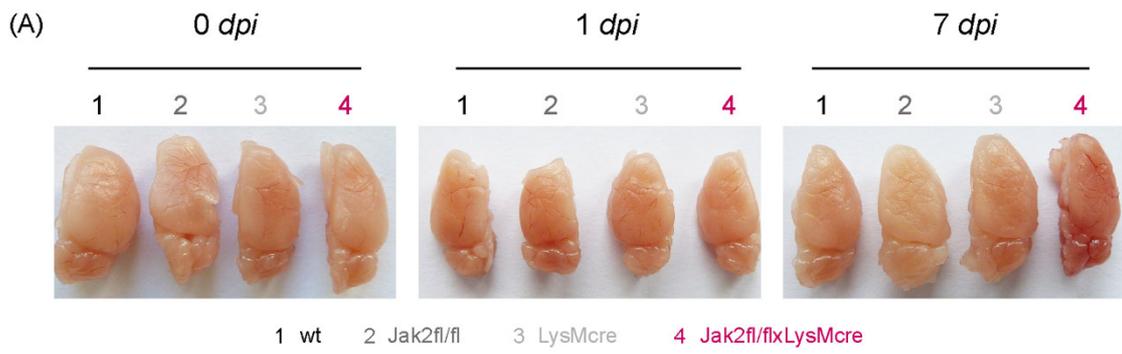
**Abb. 4.55 Nachweis der Bildung von NO-Metaboliten (RNI) nach Infektion mit *T. gondii*.** Die Entnahme des Serums von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren erfolgte an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Die Bestimmung der Konzentrationen der NO-Metabolite erfolgte mit Hilfe der Durchführung des Total Nitrate/Nitrite Assay Kit. (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen).

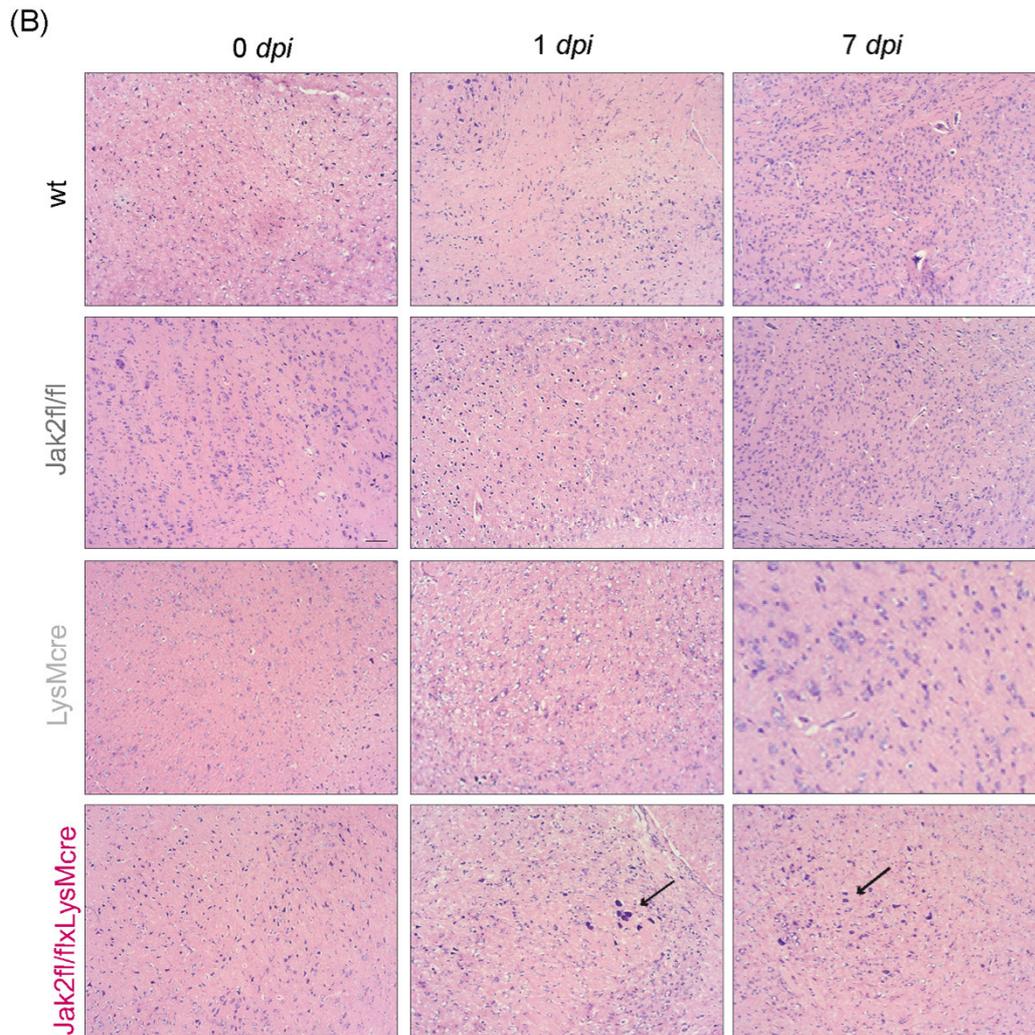
Aus der Analyse der RNI-Konzentration schließend, besitzt Jak2 keinen essentiellen Einfluss auf die im Serum messbare RNI-Produktion.

#### 4.2.8 Histologische Analysen von Organen nach einer Infektion mit *T. gondii*

Innerhalb der vorliegenden Dissertation konnte bereits ein Defekt bei der Rekrutierung von B- und T-Zellen in den Milzen und inguinalen Lymphknoten von Tieren mit einem konditionalen Knockout von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen identifiziert werden. Weiterhin wiesen diese Tiere nach Infektion im Gegensatz zu den Kontrollgruppen weder eine Splenomegalie noch eine Hepatomegalie auf. Das Wachstum der Toxoplasmen war im Vergleich zu den Kontroll-Tieren wesentlich in der Leber, Lunge, Milz und dem Gehirn erhöht. Schließlich zeigten Analysen des Zytokinmilieus der Seren eine gesteigerte Sekretion von TNF, IFN- $\gamma$  sowie CXCL-10 in das Blut der untersuchten Tiere nach 7 Tagen. Für eine genauere Charakterisierung der mit *T. gondii* infizierten Organe sollten histologische Analysen durchgeführt werden. Hierfür wurden aus Gehirnen, Lebern, Milzen und inguinalen Lymphknoten *T. gondii* infizierter Tiere (wt, Jak2fl/fl, LysMcre, Jak2fl/flxLysMcre) an den Tagen 1 und 7 Gefrierschnitte angefertigt und mittels einer Giemsa- (Gehirn) oder einer H&E-Färbung (Leber, Milz, Lymphknoten) gefärbt. Nicht infizierte Tiere dienten abermals als Kontrolle (Tag 0).

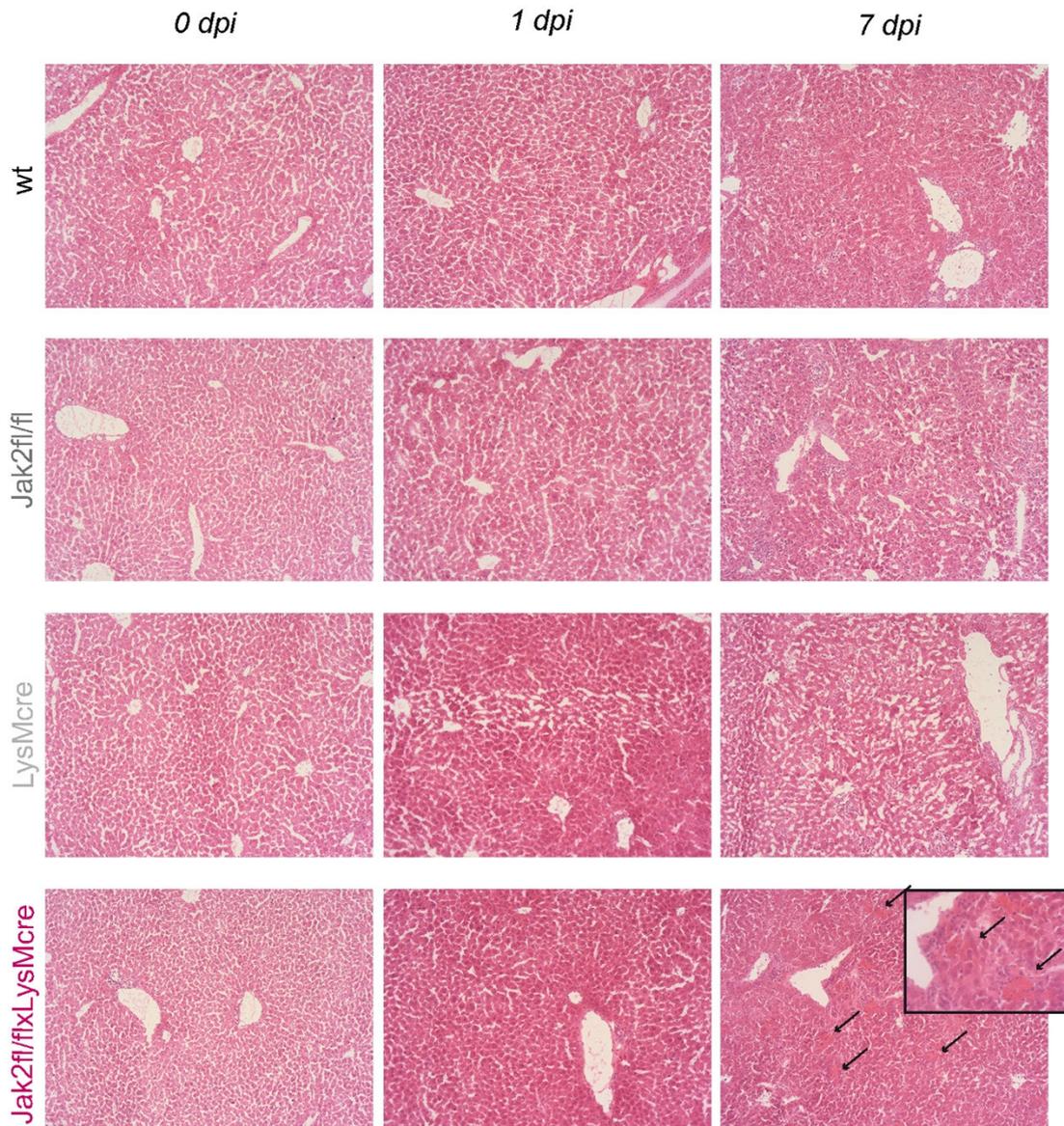
Wie in Abbildung 4.56 (A) zu sehen, war bereits bei der Analyse der makroskopischen Morphologie des Gehirns eine Veränderung in Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren festzustellen. Im Gegensatz zu Tag 1 und den Gehirnen nicht infizierter Tiere, die keine auffälligen Unterschiede aufwiesen, war das Gehirn von Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 nahezu hämorrhagisch, was auf eine durch eine akute Toxoplasmose induzierte Enzephalitis hinwies. Die histopathologische Untersuchung des Cerebellums zeigte das Stratum granulosum (dunkelblau), welches von einer Schicht aus Purkinjezellen umschlossen ist und sich von der Stratum molekulare (rosa) abgrenzt (Abb. 4.56 (B)). Hier ist ebenfalls hervorzuheben, dass infizierte Jak2fl/flxLysMcre große, erweiterte Blutgefäße (blauer Pfeil) und Areale infiltrierter Zellen (schwarzer Pfeil) an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* aufwiesen. Die zuvor beschriebenen Infiltrate konnten ebenso im Cerebrum von Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 nachgewiesen werden (Abb. 4.56 (C)). Dahingegen wiesen die histologischen Präparate der Gehirne nicht infizierter Tiere und an Tag 1 nach Infektion, sowie der Kontrollgruppen (wt, Jak2fl/fl, LysMcre) keine pathologischen Auffälligkeiten auf.





**Abb. 4.56 Analyse des Gehirns nach Infektion mit *T. gondii*.** Entnommene Hälften der (A) Gehirne von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. (B,C) Giemsa-Färbung der Gefrierschnitte der Gehirne. (B) Cerebellum, (C) Cerebrum; Gezeigt ist jeweils ein exemplarisches Gehirn eines Tieres; Vergrößerung 100x; (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen)

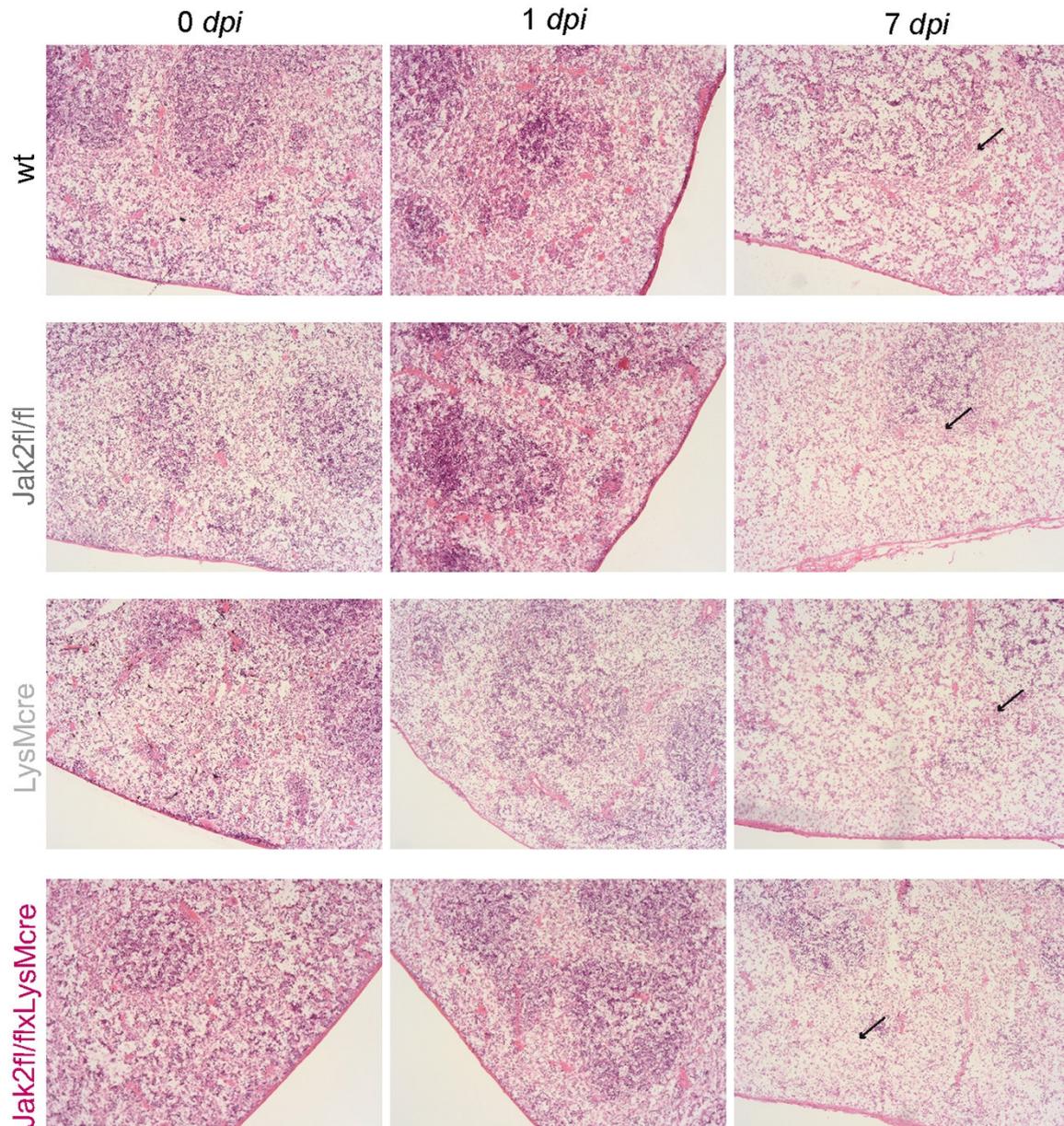
In dieser Dissertation konnte bereits gezeigt werden, dass wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tiere eine Hepatomegalie an Tag 7 nach Infektion mit *T. gondii* aufwiesen, wohingegen sich die Leber von Jak2fl/flxLysMcre Tieren im Zuge der Infektion signifikant verkleinerte. So zeigten die Lebern von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 0 und 1 der Infektion eine unveränderte, gesunde Morphologie der Leber (Abb. 4.57). Durch die Infektion mit *T. gondii* wies die Leber von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren große Areale infiltrierender Lymphozyten auf (hellere Bereiche). Die Leber von Jak2fl/flxLysMcre Tieren zeigte zudem eine kompaktere Anordnung der Hepatozyten. Gleichzeitig bildete sich eine große Anzahl hämorrhagischer Areale (schwarze Pfeile), die einer Gewebewandlung der Leber charakterisieren und die Entstehung einer Leberfibrose andeuten können.



**Abb. 4.57 Analyse der Leber nach Infektion mit *T. gondii*.** HE-Färbung der Gefrierschnitte der entnommenen Lebern von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Gezeigt ist jeweils eine exemplarische Leber eines Tieres; Vergrößerung 100x; (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen)

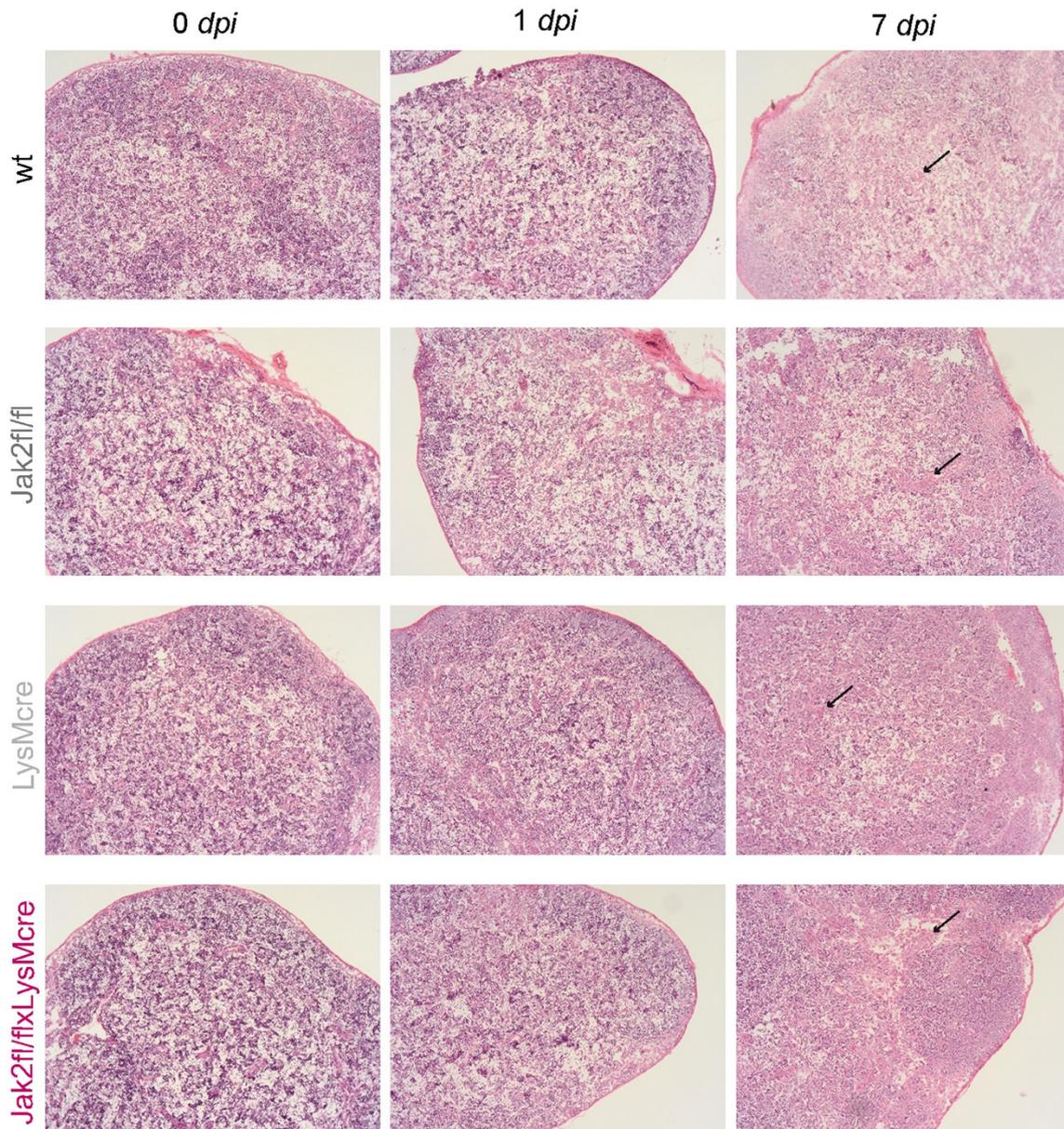
Zuvor konnte innerhalb dieser Dissertation belegt werden, dass wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tiere gegenüber Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 eine Splenomegalie aufweisen, die in den Kontrollgruppen durch einen Einstrom von Zellen gekennzeichnet ist. Die mit HE gefärbten Präparate der Milzen von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren zeigten die Milz-umschließende Kapsel (pink), die rote Pulpa (rosa), die weiße Pulpa (violett), sowie die in der weißen Pulpa liegenden zentralen Arteriolen (rot) (Abb. 4.58). Uninfiziert und Tag 1 nach Infektion wiesen die Milzen von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre keine sichtbaren morphologischen Veränderungen auf. Jedoch zeigten die Milzen an Tag 7 deutliche, durch die Infektion mit *T. gondii* hervorgerufene, histopathologische Änderungen der Milzarchitektur. Die weiße Pulpa von wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren erschien vergrößert und die rote Pulpa wies eine große Anzahl von Arealen infiltrierender Zellen auf (schwarze Pfeile), wohingegen die weiße Pulpa der Milzen von Jak2fl/flxLysMcre eine dichtere Anordnung der Zellen und die rote Pulpa eine

geringere Anzahl Areale infiltrierender Zellen aufwies. Dennoch war an Tag 7 nach Infektion in allen untersuchten Genotypen die Milzarchitektur verändert.



**Abb. 4.58 Analyse der Milz nach Infektion mit *T. gondii*.** HE-Färbung der Gefrierschnitte der entnommenen Milzen von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Gezeigt ist jeweils eine exemplarische Milz eines Tieres; Vergrößerung 100x; (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen)

Die drainierenden inguinalen Lymphknoten zeigten bisher keine durch den konditionalen Knockout von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen hervorgerufene Veränderung der Gesamtzellzahl. Tag 0 und Tag 1 nach Infektion mit *T. gondii* vergleichend, wiesen wt, Jak2fl/fl, LysMcre sowie Jak2fl/flxLysMcre in den Lymphknoten keine morphologischen Veränderungen der Mikroarchitektur auf (Abb. 4.59). Ab Tag 7 der Infektion waren jedoch histopathologische Auffälligkeiten deutlich sichtbar. So wiesen wt, Jak2fl/fl, LysMcre und auch Jak2fl/flxLysMcre Tiere Areale von Immunzellen auf (schwarze Pfeile).



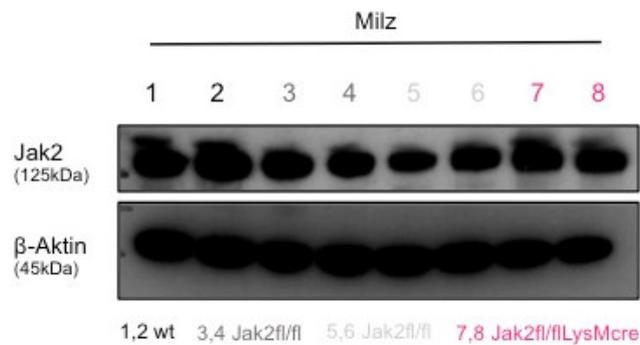
**Abb. 4.59** Analyse der inguinalen Lymphknoten nach Infektion mit *T. gondii*. HE-Färbung der Gefrierschnitte der entnommenen Lymphknoten von wt, Jak2fl/fl, LysMcre und Jak2fl/flxLysMcre Tieren an den Tagen 0, 1 und 7 nach Infektion mit *T. gondii*. Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Lymphknoten eines Tieres; Vergrößerung 100x; (n=6), (n=Versuchstiere; aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen)

Die immunhistologische Analyse betrachtend, führt ein konditionaler Knockout von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen im Verlauf einer akuten Toxoplasmose zu einer früh auftretenden Enzephalitis, dem Beginn einer Leberschädigung, sowie einem vermindertem Einstrom von Immunzellen in die Milz.

#### 4.2.9 Analyse der Jak2 Expression in der Milz

Bereits während verschiedener Analysen im Zuge dieser Dissertation zeigte sich ein schwacher Phänotyp der Tiere der Kontrollgruppe die ein gefloxtes *Jak2* Gen besitzen (Jak2fl/fl). Demnach wiesen Jak2fl/fl gegenüber wt Tieren sowohl eine höhere Sterberate innerhalb der Überlebensstudie nach Infektion mit *T. gondii* auf, als auch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ - und CXCL-10 Konzentration an Tag 7 nach der Infektion mit *T. gondii*. Um eine

mögliche Ursache dieses Phänotyps aufzuklären, sollte die basale Expression der Jak2-Proteine in der Milz der folgenden Tiere untersucht werden: wt, Jak2fl/fl, Jak2fl/flxLysMcre. So wurde die Milz aus naiven Tieren entnommen und Gesamtextrakte der enthaltenen Proteine hergestellt. Durch die Immunoblot-Methode wurde anschließend Jak2 und  $\beta$ -Aktin (Ladekontrolle) nachgewiesen.



**Abb. 4.60 Jak2 Expression in der Milz.** Die Milzen wurden naiven wt, Jak2fl/fl und Jak2fl/fl Tieren entnommen und Gesamtextrakte der enthaltenen Proteine hergestellt und die Expression von Jak2 anhand der Western-Blot-Methode analysiert. wt: schwarz, Jak2fl/fl dunkelgrau: Zuchtlinie 1, Jak2fl/fl hellgrau: Zuchtlinie 2, Jak2fl/flxLysMcre: magenta; Dargestellt sind Western-Blots für Jak2 und  $\beta$ -Aktin (Lade-Kontrolle).

Wie die Abbildung 4.60 zeigt, wurde Jak2 in den Milzen aller untersuchten Genotypen exprimiert. Jedoch wird deutlich, dass einige Jak2fl/fl Tiere eine reduzierte Expression von Jak2 gegenüber der wt-Kontrolle in der Milz aufwiesen, was eine mögliche Ursache für das Auftreten des abgeschwächten Phänotyps in Jak2fl/fl Tieren darstellt.

## 5 Diskussion

Die Kommunikation durch die Signalweiterleitung mittels Janus Kinasen und Stat Molekülen ist für die Aufrechterhaltung biologischer Prozesse wie die Hämatopoese, das Zell-Überleben, die Entwicklung sowie die Immunabwehr entscheidend (Keil et al., 2014; Neubauer et al., 1998; O'Shea et al., 2002; O'Shea and Plenge, 2012). Fehlregulationen der Jak-Stat-Signalweiterleitung führen zur Entwicklung diverser Erkrankungen, die häufig mit Autoimmun-Reaktionen oder gar einer Immuninkompetenz verbunden sind (O'Shea et al., 2015). Die konstitutiv aktive Mutation Jak2V617F ist besonders seit den 1990er Jahren aufgrund der Entstehung von myeloproliferativen Neoplasien und der Entwicklung fortschrittlicher Therapien von großem Interesse (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015).

Die Aufklärung von Jak2-medierten Mechanismen innerhalb des programmierten Zelltodes (Apoptose), der durch Todesrezeptoren ausgelöst wurde, als auch innerhalb der Funktion des Immunsystems ist von besonderer Bedeutung. Beide Aspekte stellten daher zentrale Thematiken dieser Dissertation dar.

### 5.1 Apoptose

Die Identifikation von Jak2-abhängigen malignen Erkrankungen führte zu einem Anstieg bei der Entwicklung von Jak2-Inhibitoren, um konventionelle Therapien abzulösen (LaFave and Levine, 2012). Verschiedene Studien identifizierten bereits eine Zelltod-fördernde Wirkungsweise der Jak2-Inhibitoren auf verschiedene maligne Zelllinien (Hart et al., 2011; Wilson et al., 2013). Zugleich wurde festgestellt, dass Jak2 durch die Beteiligung an der IFNGR-vermittelten Signalweiterleitung Zellen gegenüber einem induzierten programmierten Zelltod sensitiviert (Rosner et al., 2006). Eine direkte Funktion von Jak2 innerhalb des durch die Todesrezeptoren eingeleiteten Zelltodes ist bisher nicht bekannt. Aufgrund dessen wurde eine Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose als zentraler Aspekt dieser Dissertation untersucht und charakterisiert.

#### 5.1.1 Identifizierung einer protektiven Funktion von Jak2 während der Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) wird innerhalb des extrinsischen Signalweges durch die Familie der Todesrezeptoren eingeleitet (Peter et al., 2007; Strasser et al., 2000). Die zur TNFR-Superfamilie gehörenden Todesrezeptoren werden durch die Bindung ihres spezifischen Liganden aktiviert (Lavrik et al., 2005; Locksley et al., 2001). Um eine Funktion der Janus Kinase 2 (Jak2) während der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose zu charakterisieren wurde anhand der Messung der Fragmentation der DNA zunächst die Apoptoserate von Wildtyp- und von Jak2-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) nach der Induktion durch den FasL untersucht (Abb. 4.1). Gegensätzlich zu der durch Rosner *et al.* beschriebenen sensitivierenden Funktion von Jak2 durch IFNGR-vermittelte Signale und anschließender FasL Stimulation (Rosner et al., 2006), wird im Zuge einer ausschließlichen Gabe von FasL über einen Zeitraum von zweiundsiebzig Stunden die DNA Jak2-defizienter MEFs massiv gegenüber Wildtyp-

Zellen fragmentiert. Aufgrund der starken Apoptose-Induktion und einer offensichtlichen Sensitivierung der Jak2-defizienten MEFs ist eine bisher unbekannte protektive Funktion von Jak2 während der FasL induzierten Apoptose unverkennbar.

Die Fragmentation der DNA ist ein klassisches Charakteristikum apoptotischer Zellen im Verlauf des programmierten Zelltodes (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Bereits 1972 konnte durch Kerr *et al.* bewiesen werden, dass durch die Einleitung der Apoptose eine Karyorrhesis sowie eine Karyopyknose auftritt (Kerr et al., 1972). Heute ist bekannt, dass die Aktivierung von für Apoptose typischen Caspasen zur Spaltung von DNA-reparierenden Enzymen, wie von PARP, und die fehlende DNA-Reparatur zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen und der anschließenden Aktivierung der DNase I zu der Fragmentation der DNA führt (Alnemri et al., 1996; Earnshaw et al., 1999; Enari et al., 1998; Fischer et al., 2003; Sakahira et al., 1998). Tatsächlich sind Karyorrhesis, Karyopyknose und DNA-Fragmentation ebenfalls Charakteristika des nicht programmierten Zelltodes, der Nekrose (Elmore, 2007; Kerr, 1971). Anders als bei der Apoptose sind hier allerdings Caspasen nicht essentiell für die Ausführung der Fragmentierung der DNA (Kroemer and Martin, 2005). Ferner führt hier nicht eine gezielte Abfolge mehrerer Prozesse zu einer Fragmentierung als spätere Konsequenz, sondern ein Platzen der Zellen zu einer simultanen Zerstörung der Zelle, die zu einer plötzlichen Entlassung, dem Zerfall zellulärer Bestandteile und der Fragmentation der DNA durch nicht spezifisch aktivierter Endonucleasen führt (De Duve and Wattiaux, 1966; Higuchi, 2003).

Neben der Nekrose ist außerdem ein Caspase-unabhängiger Signalweg der Apoptose bekannt: Zusätzlich zu Cytochrom C werden durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) Moleküle, wie der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) oder die Endonuklease G (EndoG), entlassen (Cande et al., 2004; Parrish and Xue, 2003). AIF und EndoG translozieren daraufhin in den Nukleus, wodurch das Chromatin kondensiert und degradiert (Cande et al., 2004; Kroemer and Martin, 2005; Parrish and Xue, 2003).

Ein zweiter Caspase-unabhängiger, jedoch Todesrezeptor-vermittelter Zelltod wird durch lysosomalen Stress induziert (Boya and Kroemer, 2008). Durch die Aktivierung der Cathepsine B und D wird eine vollständige Proteolyse der zelleigenen Proteine und schließlich der Zelltod eingeleitet (Boya and Kroemer, 2008). Die Anwendung der pan-Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK und Q-VD-OPh und die anschließende Behandlung von Wildtyp-MEFs und Jak2-defizienten MEFs mit FasL führte zu einer Reduzierung bzw. einer vollständigen Blockade der induzierten Apoptose in beiden Zelllinien (s. Abb. 4.2). Demnach konnte bewiesen werden, dass in Wildtyp- und Jak2-Knockout-MEFs nach Gabe von FasL ein Caspase-abhängiger Zelltod, die Apoptose, eingeleitet wurde. Jak2 erfüllt hierbei eine schützende Funktion. Z-VAD-FMK inhibiert nahezu alle Familienmitglieder der Caspasen (Slee et al., 1996; Vandenabeele et al., 2006). Gleichzeitig ist beschrieben, dass Z-VAD-FMK neben der inhibierenden ebenfalls eine Zelltod-fördernde Funktion besitzt (Wu et al., 2011). Daher ist es wahrscheinlich, dass die verbliebene gemessene Fragmentation der DNA in Wildtyp- und Jak2-defizienten MEFs auf den durch Z-VAD-FMK induzierten Zelltod, die Nekrose bzw. Nekroptose (Wu et al., 2008; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011), zurückzuführen ist und nicht auf die durch den FasL induzierte extrinsische Apoptose. Dafür spricht außerdem, dass kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Jak2-Knockout-MEFs in der Rate der DNA-Fragmentierung in der Gegenwart von Z-VAD-FMK festzustellen ist. Wu et al. bewiesen, dass Z-VAD-FMK im

Zytosol von Zellen die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und durch weitere Signaltransduktionsketten der MAPK die Transkription von TNF induziert wird (Wu et al., 2011). Die darauf folgende autokrine Stimulation des TNFR führt schließlich zu der Induktion des Zelltodes über RIP und weitere Proteinkinasen (Wu et al., 2011). Zusätzlich wurde innerhalb dieser Studie beschrieben, dass der pan-Caspasen-Inhibitor Q-VD-OPh keine Zelltod-fördernde Funktion besitzt (Wu et al., 2011). Aufgrund dessen wurde die durch FasL induzierte Apoptose in Wildtyp-MEFs und Jak2-defizienten MEFs vollständig durch die Vorbehandlung mit Q-VD-OPh geblockt was verdeutlicht, dass Jak2 eine schützende Funktion während der extrinsisch induzierten, Caspase-abhängigen Apoptose einnimmt. Anders als für Z-VAD-FMK konnte für Q-VD-OPh beschrieben werden, dass dieser bevorzugt die Caspasen-1, -3, -8 -9 und -12 inhibiert (Caserta et al., 2003; Lee et al., 2015). Einen direkten Einfluss von Jak2 auf die Caspase-1 während der FasL-induzierten Apoptose ist hierbei jedoch auszuschließen, da die Caspase-1 als erste inflammatorisch wirkende Caspase charakterisiert wurde und folglich keine Apoptose-induzierenden Funktionen besitzt (Black et al., 1989; Cerretti et al., 1992; Kostura et al., 1989; Thornberry et al., 1992). Anders sind die Caspasen-8, -9 und -3 diesbezüglich einzustufen.

Die als Initiator-Caspasen bezeichneten Caspase-8 und Caspase-9 bilden essentielle Schlüsselmoleküle zu Beginn der apoptotischen Signalkette (Chowdhury et al., 2008; Lavrik et al., 2005). Nach der Aktivierung des Fas-Rezeptors durch seinen Liganden wird der zytoplasmatische DISC-Komplex durch die Rekrutierung und Bindung von FADD über DD-Wechselwirkungen und der Pro-Caspase-8 über die Bindung von homotypischer DED-Domänen gebildet (Kischkel et al., 1995). Die Ausbildung des DISC-Komplexes führt schließlich zur Prozessierung und zur Aktivierung der Caspase-8 (Medema et al., 1997; Scaffidi et al., 1997). Eine Western-Blot-Analyse Wildtyp-Zellen und Jak2-defizienter Zellen nach Induktion von Apoptose durch den FasL sollte hierbei Aufschluss über die Aktivierung der Caspase-8 und eine mögliche blockierende Funktion von Jak2 geben (s. Abb. 4.3). Durch die Analyse wurde deutlich, dass Jak2-defiziente, im Gegensatz Wildtyp-Zellen eine deutliche Abnahme der Pro-Caspase-8 und folglich eine Zunahme der aktiven Spaltform der Caspase-8 im Verlauf der induzierten Apoptose zeigen. Somit ist höchstwahrscheinlich, dass Jak2 eine protektive Funktion bereits zu Beginn der Todesrezeptor-induzierten Apoptose ausübt. Hierbei stehen zwei mögliche zentrale Mechanismen im Vordergrund: Zum einen ist eine direkte Assoziation von Jak2 an dem Fas Rezeptor bzw. innerhalb des ausgebildeten DISC möglich, wo Jak2 direkt die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 blockieren könnte. Eine Ko-Immunpräzipitation von Fas und Jak2 konnte allerdings innerhalb dieser Dissertation nicht verifiziert werden (nicht gezeigte Daten), weswegen eine direkte Assoziation von Jak2 mit dem DISC unklar bleibt. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass neben dem TNFR auch der Fas-Rezeptor binnen weniger Minuten nach Liganden-Bindung einen zweiten Signalkomplex ausbildet (Lavrik and Krammer, 2012). Die als Komplex II bezeichnete Interaktion des Adaptermoleküls FADD mit der Procaspase-8 und c-FLIP entsteht im Zytosol der Zelle und dient zur Aktivierung der Initiator-Caspase (Lavrik and Krammer, 2012). Dass Jak2 einen Teil dieses Komplexes bildet und auf diesem Wege die Spaltung der Procaspase-8 inhibiert oder als Zytosol-ständiger Faktor die Caspase-8 hemmt wäre somit vorstellbar.

Die Substratspezifität der Initiator-Caspasen beschränkt sich auf die Effektor-Caspasen, wie die Caspase-3 (Nunez et al., 1998). So konnte nach Stimulation von Wildtyp- und Jak2-defizienten MEFs ebenfalls die Spaltung der Pro-Caspase-3 und somit die Aktivität

der Caspase-3 nachgewiesen werden. Die hierbei ermittelte gesteigerte Anzahl an aktiver Caspase-3 in Jak2-defizienten Fibroblasten ist auf die gesteigerte Aktivität der Caspase-8 zurückzuführen und als Folge der fehlenden Protektion durch Jak2 zu interpretieren. Zusätzlich ist die Blockade der Spaltung der Effektor-Caspasen durch ein zytosolisches Jak2 nicht auszuschließen. Ein spezifisches Substrat der Effektor-Caspasen bzw. der Caspase-3 ist das DNA-reparierende Enzym PARP (Earnshaw et al., 1999; Fischer et al., 2003). Durch die von der Caspase-3 medierte herbeigeführte Spaltung von PARP ist PARP deaktiviert und die DNA wird nicht vor der voranschreitenden Fragmentierung geschützt (Tewari et al., 1995). Folglich zeigen Jak2-defiziente MEFs, aufgrund der gegenüber dem Wildtyp gesteigerten Anzahl aktivierter Caspase-3-Moleküle, eine Anhäufung des generierten Spaltproduktes der PARP (Abb. 4.3). Eine gesteigerte Aktivität der Effektor-Caspasen nach Induktion der Fas-Signaltransduktion in Jak2-Knockout-MEFs wird ebenfalls bei der Betrachtung der mitgeführten Ladekontrolle (ERK) deutlich (Abb. 4.3). Im Gegensatz zu Wildtyp-MEFs zeigen hier Jak2-defiziente MEFs eine Abnahme von ERK im Verlauf der FasL-Stimulation. ERK stellt ein weiteres spezifisches Substrat der Effektor-Caspasen dar, welches als Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) für den Aufbau und die Weiterleitung proliferationsfördernder Signale maßgeblich ist (Deak et al., 1998; Earnshaw et al., 1999; Fischer et al., 2003).

Somit konnte detailliert bewiesen werden, dass Jak2 eine essentielle Funktion während der Fas-vermittelten Apoptose einnimmt, um Zellen vor dem induzierten programmierten Zelltod zu schützen.

### 5.1.2 Protektion von humanen Zellen durch Jak2

Janus Kinasen sind hochkonservierte Proteinkinasen, die in nahezu allen Vertebraten vertreten sind (O'Shea et al., 2015; Villarino et al., 2015). Da zuvor innerhalb dieser Dissertation belegt werden konnte, dass Jak2 in einem murinen Zellsystem fundamentale Funktionen besitzt, um den Schutz der Zellen vor einem programmierten Zelltod aufrechtzuerhalten, ist die Übertragbarkeit dieser Funktionen von einem murinen auf ein humanes System höchst wahrscheinlich.

Die Untersuchung humaner Fibroblasten (HT1080) mit einer Jak2-Defizienz ( $\gamma$ 2A) oder die zugehörigen Kontrollzellen (2C4) (Kohlhuber et al., 1997; Watling et al., 1993), führte nach einer Induktion von Apoptose durch den FasL in Jak2-defizienten Fibroblasten im Gegensatz zu den Kontrollzellen zu einer erhöhten Anzahl von Zellen mit fragmentierter DNA. Durch einen Mangel an Jak2 wurde die Anzahl apoptotischer Zellen gegenüber den Kontrollzellen deutlich gesteigert werden (s. Abb. 4.4). So konnte eindrücklich bewiesen werden, dass Jak2 sowohl in einem murinen als auch in einem humanen Zellsystem eine anti-apoptotische Funktion während des durch den FasL induzierten Signalweges einnimmt.

Zusätzlich wurden durch verschiedene Studien bereits erste Hinweise auf anti-apoptotische Funktionen von Jak2 in humanen malignen Zellen bzw. Zelllinien beschrieben (Hart et al., 2011; Wilson et al., 2013). Anders als der hier untersuchte Einfluss von Jak2 auf den extrinsischen Zelltod, ausgelöst durch Todesrezeptoren, wurden die aufgeführten Studien ausschließlich unter Zugabe von diversen Jak2-Inhibitoren durchgeführt und ebenso Apoptose in den Zielzellen induziert (Hart et al.,

2011; Wilson et al., 2013). Die Funktion von Jak2 in malignen Zellen ist besonders während der letzten zwanzig Jahre vermehrt in das Zentrum der wissenschaftlichen Diskussion getreten. Durch die Aufklärung der konstitutiv aktiven Form von Jak2 und deren Korrelation mit der Entstehung verschiedener Formen von myeloproliferativen Neoplasien, konnte Jak2 als direkter kanzerogener Faktor identifiziert werden (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Levine et al., 2005). Hierbei ist der Austausch der Aminosäure Valin (Position 617) gegen ein Phenylalanin für die konstitutive Aktivierung der Kinasedomäne verantwortlich, weshalb andauernde proliferationsfördernde Signale (z.B. durch den EpoR) weitergetragen werden (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Als Konsequenz wurden bisher verschiedene Jak2 Inhibitoren synthetisiert, um gegenüber den üblichen Chemotherapeutika alternative und wirkungsvollere Therapien zu entwickeln. Erste Studien einiger Inhibitoren zeigten bereits eine deutlich verminderte Aktivität von mutiertem Jak2 aufgrund der Inhibition der Phosphorylierung sowie in der Signalkette darunter liegender Stats in diversen malignen Zelllinien (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Zugleich konnte so eine verminderte Jak2-Aktivität mit der Induktion von Apoptose gezielt in Verbindung gebracht werden. Aufgrund der vielversprechenden Studien *in vitro* als auch *in vivo* indem ein in einem Jak2V617F-basiertem Mausmodell nach einer oralen Gabe des Jak2 Inhibitors eine Inhibition der Ausbreitung von Tumorzellen gezeigt werden konnte, beweisen auch erste klinische Studien des Jak2-Inhibitor-Ruxolitinib (Jakavi<sup>®</sup>) erste Erfolge (Baffert et al., 2010; LaFave and Levine, 2012).

Demnach könnten Jak2-Inhibitoren ebenfalls einen Apoptose-steigernden Effekt während der Fas-induzierten Apoptose ausüben. Der im Rahmen dieser Dissertation getestete Jak2-Inhibitor NVP-BSK805 ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor (Baffert et al., 2010). Niedrige Konzentrationen von NVP-BSK805 induzierten keine Apoptose in Jurkat-A3-Zellen (s. Abb. 4.5 (A)). Jedoch induzierte eine zusätzliche Behandlung der NVP-BSK805 prä-inkubierten Zellen mit FasL eine deutlich größere Menge an apoptotischen Zellen, als die alleinige Stimulation mit FasL von Jurkat A3 Zellen. Der festgestellte Effekt konnte ebenfalls durch den Nachweis des Spaltproduktes von PARP bewiesen werden, wodurch das Spaltprodukt mit ansteigender NVP-BSK805 Konzentration kontinuierlich zunimmt (s. Abb. 4.5 (B)). Somit erscheint die katalytische Aktivität von Jak2 für die Ausführung der protektiven Funktion wichtig. Genauer analysiert besitzt die Bindung von ATP in die ATP-Bindetasche der JH2-Domäne (der Pseudokinasedomäne) für dessen Stabilität und somit die Funktionalität dieser Domäne eine große Bedeutung. Daraus folgernd ist es höchstwahrscheinlich, dass die Pseudokinasedomäne regulierende Eigenschaften der Janus Kinase 2 nach deren Induktion während der FasL-vermittelten Apoptose erfüllt. Da durch Hammaren *et al.* postuliert wurde, dass die Bindung von ATP essentiell für die Phosphorylierung der Kinase-aktivierenden Tyrosine 1007/1008 der JH1 Domäne ist (Hammaren et al., 2015), könnte die Phosphorylierung der Tyrosine 1007/1008 bei der protektiven Rolle von Jak2 während des FasL-induzierten programmierten Zelltodes von Bedeutung sein. Festzustellen ist jedoch, dass NVP-BSK805 zwar die eingeleitete Apoptose verstärkt, jedoch eine deutlich niedrigere Apoptoserate in Jak2-defizienten (murin und human) Fibroblasten induziert. Eine Kinase-unabhängige Funktion von Jak2 (Keil et al., 2014) während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose ist daher nicht auszuschließen.

Set-2 ist eine Zelllinie die aus einem Patient mit einer myeloproliferativen Neoplasie Erkrankung generiert wurde und somit die Jak2 Mutation Jak2V617F besitzt (Quentmeier et al., 2006; Uozumi et al., 2000). Der Nachweis des PARP-Spaltproduktes in Set-2

Zellen, zeigte nach einer Vorbehandlung der Zellen mit NVP-BSK und einer anschließenden Zugabe des FasL eine erhöhte Menge des gespaltenen PARP und daher eine gesteigerte Induktion von Apoptose (Abb. 4.5 (C)). Hierbei ist besonders hervorzuheben, dass eine alleinige Behandlung mit FasL hier zu keiner gesteigerten Induktion des Zelltodes führt. Dies ist auf eine bereits beschriebene Eigenschaft der Tumorzellen zurückzuführen (Uozumi et al., 2000). Um die ständige Proliferation der karzinogenen Zellen zu gewähren, entwickeln diese Mechanismen, die dazu dienen die Einleitung von Apoptose zu blockieren (Martin-Villalba et al., 2013). Interessanterweise führt eine Inhibition von Jak2 in malignen Zellen ebenfalls zu einer Steigerung der FasL-induzierten Apoptose, die aufgrund der Menge des nachgewiesenen PARP-Spaltproduktes zusätzlich von der durch NVP-BSK805 dargestellten Apoptose abzugrenzen ist. Dies beweist eine anti-apoptotische Funktion von Jak2 während des FasL-vermittelten Signalweges ebenfalls in humanen Tumorzellen.

Ein weiterer Jak2-Inhibitor, Jak2 Inhibitor V Z3, bestätigt die mit NVP-BSK805 durchgeführten Analysen. Eine Vorinkubation mit Z3, welcher an eine direkt benachbarte Bindestelle der ATP-Tasche bindet und diese blockiert (Sayyah et al., 2008), und eine anschließende Behandlung der Jurkat A3 Zellen mit FasL führt ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der fragmentierten DNA und somit an apoptotischen Zellen (s. Abb. 4.6).

Somit konnte mittels humaner Zellen (Fibroblasten, Jurkat A3 und Set-2) sowie zweier unterschiedlicher Inhibitoren bewiesen werden, dass Jak2 sowohl in murinen als auch in humanen Zellsystemen eine protektive Funktion während der Fas-vermittelten Apoptose hat, die darüber hinaus zu Teilen von der Pseudokinase-Domäne und von der Kinaseaktivität abhängig ist.

### **5.1.3 Biologische Relevanz der Jak2 vermittelten protektiven Funktion (Beispiel: Leber)**

Murine und humane Zellsysteme gelten als bewährte Modellsysteme zur Aufklärung biologischer Mechanismen. Hierbei können erste Einblicke generiert werden. Die verschiedenen analysierten Funktionen und Mechanismen können so jedoch nicht in einem komplexen System untersucht und in einen Zusammenhang gebracht werden. Um die sowohl bereits in murinen als auch in humanen Zellsystem nachgewiesene protektive Funktion während des Fas-induzierten programmierten Zelltodes in einen biologischen Kontext einzuordnen, wurde eine *in vivo* Studie durchgeführt.

Weil ein konventioneller Knockout von Jak2 durch eine nicht vollständige Erythropoese zu einer Letalität des murinen Embryos an Tag 12.5 führt (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998), wurde ein konditionaler Knockout von Jak2 untersucht. Dieser gewebespezifische Knockout von Jak2 in Hepatozyten (Jak2<sup>fl/fl</sup> x Albcre: L-Jak2KO), welche den Hauptbestandteil an Zellen in der Leber bilden, stellt eines der besten Modelle für die Fas-vermittelte Apoptose dar (Galle et al., 1995; Nagata, 1996; Schmich et al., 2011; Tacke et al., 2009). Es ist bekannt, dass der FasL- bzw. Fas-induzierte Signalweg essentielle Funktionen in der Leber-Homöostase bzw. der Regulation von Zelltod und Zellerneuerung einnimmt (Malhi et al., 2006). Morphologische Untersuchungen der Leber von L-Jak2KO Mäusen konnten erstmals durch Shi *et al.* beschrieben werden (Shi et al.,

2012). Erste HE-Färbungen der Leber wiesen große pathologische Unterschiede in einem direkten Vergleich zu Kontroll-Tieren auf (Shi et al., 2012). Diese konnten innerhalb dieser Dissertation, ebenfalls mit Hilfe einer HE Färbung der Leber von L-Jak2KO Tieren, bestätigt werden (s. Abb. 4.7). Die hierbei auffallende, lückenhafte oder diffuse Anordnung der Leber-Parenchymzellen wurde innerhalb der durch Shi et al. durchgeführten Studie auf eine Akkumulation von Lipiden, hervorgerufen durch einen Defekt des GHR-vermittelten Signalweges, zurückgeführt (Shi et al., 2012). Verschiedene Mausmodelle, assoziiert mit einem Defekt in der GHR-induzierten Signaltransduktion, weisen eine ungewöhnlich hohe Anzahl der „fatty-acid“-Translokase auf, die damit für eine erhöhte Aufnahme von „fatty acids“ durch Hepatozyten verantwortlich zu machen ist (Barclay et al., 2011; Cui et al., 2007; Fan et al., 2009; Shi et al., 2012). Eine direkte Assoziation der dargestellten pathologischen Veränderungen der Leber mit der Induktion von Apoptose konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Die in Abbildung 4.8 gezeigte TUNEL-Färbung weist eine große Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb der Leber von L-Jak2KO Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren nach. Daher ist eine Verbindung der Leberpathologie in L-Jak2KO Mäusen mit einer erhöhten Induktion von Apoptose höchst wahrscheinlich. Die Apoptose von Hepatozyten stellt eine bekannte Konsequenz verschiedener Leber-assoziiierter Erkrankungen dar, wie hepatozelluläre Karzinome, chronische und akute Hepatitiden oder die Wilson's Krankheit (Guicciardi and Gores, 2005).

Weiterhin ist bekannt, dass Apoptose während der aufgeführten Leber-assoziierten Erkrankungen durch viele verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann; wie beispielsweise durch die Bindung von FasL an seinen kognaten Rezeptor Fas (Malhi et al., 2006). So konnte bereits 1993 durch Ogasawara *et al.* beschrieben werden dass ein aus Hamstern isolierter Fas-induzierender anti-Fas (Jo2) Antikörper einen letalen Effekt auf behandelte Mäuse ausübt (Ogasawara et al., 1993). Neben anderen betroffenen Organen nimmt hierbei die Induktion von Apoptose in der Leber eine zentrale Rolle ein (Peter et al., 2007). Dabei konnten Hepatozyten als Hauptpopulation apoptotischer Zellen identifiziert werden, da diese eine große Anzahl von membrangebundenem Fas auf ihrer Oberfläche tragen (Muschen et al., 1998). So konnte auch in den *ex vivo* isolierten Hepatozyten (s. Abb. 4.9) eine Induktion von Apoptose nach einer Stimulation mit FasL ermittelt werden. Hierbei wiesen Jak2-defiziente Hepatozyten ebenfalls eine Steigerung der Apoptose nach Stimulation, jedoch bereits auch unstimuliert, gegenüber den Kontroll-Zellen auf, was sich auch durch den Nachweis an gespaltenem PARP und daher der Aktivität der Caspase-3 bestätigen ließ (s. Abb. 4.10). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eindeutig belegt werden, dass eine Defizienz von Jak2 in Hepatozyten, die eine hohe Expression an Fas besitzen, zu einem fehlendem Schutz während des eingeleiteten programmierten Zelltodes führt und den dargestellten pathologischen Phänotyp der Leber von L-Jak2KO Tieren zur Folge hat. Weiterhin ist denkbar, dass die Aufnahme großer Mengen an „fatty acids“ zu einem apoptotischen Shift, besonders der unstimulierten Hepatozyten, führt. Es konnte bereits beschrieben werden, dass „fatty acids“ für einen Shift von einer Insulin-induzierter Proliferation der Hepatozyten zu einer Fas-induzierten Apoptose verantwortlich sind (Sommerfeld et al., 2015). Die zusätzliche Stimulation zeigt jedoch, dass ein davon unabhängiger, aber Jak2-abhängiger, Prozess die Zellen vor Apoptose schützt, da in isolierten Hepatozyten keine erhöhte Aufnahme der „fatty acids“ mehr erfolgen kann.

Somit konnte eingehend demonstriert werden, dass Jak2 die Fas-vermittelte Apoptose *in vivo* antagonisiert. Dies könnte auf mögliche Nebenwirkungen der bereits in klinischen Studien eingesetzten Jak2 Inhibitoren hindeuten. Diesbezüglich wurde bereits in einigen wenigen Studien erwähnt, dass MPN-Patienten nach einer längeren Einnahme eines spezifischen Jak2 Inhibitors erhöhte Serumlevel von AST und ALT aufweisen (Pieri et al., 2013), die als etablierte Marker auf Leberschädigungen hinweisen. Daher könnte die erhöhte Apoptoserate Jak2-defizienter Hepatozyten und die apoptotische Leber der L-JAK2KO-Maus auf eine Korrelation bezüglich der Inhibition von Jak2 in MPN-Patienten mit Jak2-blockierender Therapie und einer Schädigung der Leber hinweisen.

#### **5.1.4 Jak2 ist Teil des Todesrezeptor-induzierten Signalweges**

Die protektive Funktion von Jak2 während des Fas-induzierten programmierten Zelltodes, konnte innerhalb dieser Dissertation, durch die Einleitung von Apoptose in MEFs sowie in humanen Fibroblasten, als auch durch die Charakterisierung des Leber-spezifischen pathologischen Phänotyps der L-Jak2KO Maus, bewiesen werden. Aufgrund der starken Redundanz der Jak2 vermittelten protektiven Antwort, sollte eine Funktion von Jak2 während der Signalweiterleitung weiterer Familienmitglieder der Todesrezeptoren untersucht werden.

Vergleichbar zum FasL konnte ebenfalls für TRAIL und TNF beschrieben werden, dass eine kombinierte Stimulation von IFN- $\gamma$  mit dem jeweiligen Todesliganden zu einer Sensitivierung von Zellen gegenüber Apoptose führt (Siegmond et al., 2005; Sugarman et al., 1985). Ebenso übereinstimmend zu FasL, zeigte auch die Induktion von Apoptose nach Stimulation von DR4/DR5 oder TNFR durch deren spezifische Liganden TRAIL bzw. TNF, eine erhöhte Rate an Apoptose in Jak2-defizienten MEFs im Gegensatz zu den mitgeführten Wildtyp-Zellen (s. Abb. 4.13 und Abb. 4.11). Der ermittelte signifikante Anstieg an apoptotischen Zellen blieb auch über eine Periode von zweiundsiebzig Stunden bestehen. Anders als die Stimulation von Apoptose mittels FasL, erfolgte hier eine kombinierte Induktion der Apoptose mittels TRAIL oder TNF in der Anwesenheit von Cycloheximid. Cycloheximid, ein aus Streptomyceten gewonnenes Antibiotikum, inhibiert als Translationshemmer die Neusynthese von relevanten Proteinen und verhindert daher während der eingeleiteten Apoptose, die Proteinbiosynthese weiterer anti-apoptotischer Faktoren (Siegel and Sisler, 1963, 1964). Besonders für den TNF-vermittelten Signalweg ist bekannt, dass nach der Induktion des TNFR1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu einer Expression anti-Apoptose kodierender Gene führt (Beg and Baltimore, 1996; Beg et al., 1993). Daher wird durch die Zugabe von Cycloheximid die TRAIL- und TNF-induzierte Apoptose verstärkt.

Die Todesrezeptoren werden weiterhin, aufgrund unterschiedlicher an der DISC-Ausbildung beteiligter Faktoren, in zwei verschiedene Gruppen unterteilt. Während der durch TRAIL induzierte Signalmechanismus nahezu dem Fas induzierten Signalweg gleicht, ist der TNFR Bestandteil einer zweiten Gruppe an Todesrezeptoren (Lavrik et al., 2005; Peter and Krammer, 2003). So wird nach der Induktion von DR4/5 durch TRAIL die Bildung des DISC-Komplexes eingeleitet (Sprick et al., 2000). Übereinstimmend zu dem DISC des Fas-Rezeptors besteht der vorhergehende aus rekrutierten FADD- und Pro-Caspase-8-Molekülen an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors (Sprick et al., 2000). Durch die Assemblierung der Adaptermoleküle und die DISC-Formation entsteht durch eine auto-katalysierte Spaltung aktive Caspase-8, welche wiederum direkt oder durch

einen mitochondrialen Amplifikations-Loop die Gruppe der Effektor-Caspasen aktiviert und schließlich Apoptose induziert (Lavrik et al., 2005). So konnte übereinstimmend zu FasL nach Stimulation von Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs mittels TRAIL eine erhöhte Spaltung der Caspase-3 sowie dessen Spaltprodukt PARP und daher eine erhöhte Caspase-Aktivität in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nachgewiesen werden (s. Abb. 4.14). Dagegen konnte für den TNFR Signalweg schon früh die Ausbildung zweier verschiedener Komplexe beschrieben werden, wodurch die zweite Gruppe der Todesrezeptoren gekennzeichnet ist (Kataoka and Tschopp, 2004; Lavrik et al., 2005). Nach Aktivierung von TNFR durch seinen spezifischen Liganden TNF werden hier die Adaptermoleküle TRADD und TRAF1/2 an den zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors rekrutiert (Kataoka and Tschopp, 2004; Micheau and Tschopp, 2003). Zusätzlich konnte die direkte Bindung der Proteinkinase RIP an TRADD nachgewiesen werden (Hsu et al., 1996a; Hsu et al., 1996b). Gegensätzlich zu den Fas- und TRAIL-rekrutierten Signalkomplexen übermittelt dieser als Rezeptor-assoziiert bezeichnete Komplex I keine Apoptose fördernde Signale sondern die Expression und Induktion anti-apoptotischer Faktoren über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Micheau and Tschopp, 2003). Durch Micheau und Tschopp wurde bewiesen, dass dieser Komplex ebenfalls in das Zytosol von Zellen transloziert (Micheau and Tschopp, 2003). Innerhalb des Zytosols rekrutieren und binden sowohl FADD als auch die Caspase-8, die nach Aktivierung Apoptose induziert (Micheau and Tschopp, 2003). So konnte ebenfalls nach einer Stimulation von TNF eine starke Induktion der Effektor-Caspase-3 sowie der Spaltung von PARP in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nachgewiesen werden, welche allerdings in Jak2 defizienten Zellen dramatisch erhöht vorlagen (s. Abb. 4.12). Trotz der unterschiedlichen Signalkomplexe von Fas/DR4/DR5 und TNFR konnte eine protektive Funktion von Jak2 während aller apoptotischen Signaltransduktionen bewiesen werden. Demnach ist höchstwahrscheinlich, dass Jak2 einen Einfluss auf apoptotische Faktoren ausübt, die an allen drei Signalmechanismen der verschiedenen gebildeten Komplexe beteiligt sind. So konnte bereits für eine andere Proteinkinase, die Proteinkinase RIP, beschrieben werden, dass RIP sowohl eine essentielle Funktion während TNFR-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B einnimmt als auch ein wichtiger Bestandteil anti-apoptotischer Prozesse nach der Induktion von Fas ist (Kreuz et al., 2004; Micheau and Tschopp, 2003). Hier konnte zudem gezeigt werden, dass auch während der Fas-induzierten Apoptose NF- $\kappa$ B in Abhängigkeit von RIP aktiviert wird (Kreuz et al., 2004).

Zudem identifizierten Lavrik *et al.* im Jahr 2008 die Formation eines zweiten Komplexes (Komplex II) nach der Induktion des Fas Rezeptors. Demnach induziert die Bindung von FasL an seinen kognaten Rezeptor bereits nach wenigen Minuten die Bildung eines Komplexes bestehend aus FADD, Procaspase-8 und dem stark anti-apoptotisch wirkenden Protein c-FLIP (Lavrik et al., 2008). C-FLIP bindet an FADD sowie TRADD der Komplexe II nach Fas/DR4/5 bzw. TNFR Stimulation und antagonisiert Apoptose durch die direkte Inhibition der Aktivierung der Caspase-8 (Chang et al., 2002). Eine direkte Interaktion oder einen Einfluss von Jak2 auf Todesrezeptoren könnte, aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der gebildeten Komplexe, somit direkt an der Plasmamembran, aber auch im Zytosol von apoptotischen Zellen stattfinden.

### 5.1.5 Nukleäres Jak2 beeinflusst die Regulation anti-apoptotischer Gene

Wie bereits beschrieben, sind Todesrezeptoren membranständige Rezeptoren, die nach Bindung eines Todesliganden apoptotische Signalkaskaden innerhalb des Zytosols von

Zellen induzieren, jedoch auch nach Internalisierung und Bildung eines zweiten Komplexes („Komplex II“) direkt innerhalb des Zytosols Signalmechanismen aufbauen (Lavrik et al., 2005; Lavrik and Krammer, 2012). Um den Einfluss der protektiven Funktion von Jak2 auf die unterschiedlich gebildeten Komplexe näher zu charakterisieren, wurde die Lokalisation von Jak2 während der FasL-induzierten Apoptose eingehend untersucht. Interessanterweise transloziert Jak2 nach Induktion der Fas-vermittelten Apoptose in den Nukleus der Zellen. Konkordant zur nukleären Lokalisation von Jak2 reduziert die Stimulation mit FasL die Menge an membranständigem und zytosolischem Jak2 über einen Zeitraum von einer Stunde (Abb. 4.15, 4.16, 4.17). Daher ist eine nukleäre und zudem Zelltod-protective Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose höchstwahrscheinlich. Möglicherweise hat Jak2 eine duale Funktion während der Fas-induzierten Apoptose (weil Jak2 auch im Zytosol und an der Membran verbleibt).

Neben der hauptsächlich kanonischen Jak2-vermittelten Signalweiterleitung über Stat Moleküle und der damit verbundenen Assoziation transkriptioneller Mechanismen nach Translokation der aktivierten Stats in den Nukleus und der Expression relevanter Zielgene, konnte in den letzten Jahren ebenfalls eine Lokalisation von Jaks innerhalb des Nukleus beschrieben werden (Dawson et al., 2009; Helmer et al., 2010; Nilsson et al., 2006; O'Shea et al., 2015). Zusammengefasst deuten die bisherigen Studien darauf hin, dass nukleäres Jak2 epigenetische Modifikationen und Faktoren des Nukleus reguliert (Dawson et al., 2009; Nilsson et al., 2006). Weiterhin konnte die nukleäre Lokalisation von Jak2 mit der Regulation des Zellzyklus von Apoptose und genetischer Instabilität verknüpft werden (Ito et al., 2004; Nilsson et al., 2010; Rinaldi et al., 2010). Dass eine Jak2-abhängige Regulation der Genexpression unabhängig vom kanonischen Jak-Stat Signalmechanismus ist, zeigt eine Untersuchung des hämatopoetischen Onkogens „LIM domain only 2“ (LMO2) (Dawson et al., 2009). Dieses besitzt keine putative Stat Binderegion, wird jedoch nachgewiesenermaßen durch Jak2 reguliert (Dawson et al., 2009; Sattler and Griffin, 2009). Dabei transloziert Jak2 in den Nukleus und phosphoryliert gezielt das Tyrosin 41 des Histons H3 (H3Y41) (Dawson et al., 2009). Durch die Phosphorylierung des Histons H3 verlässt das Heterochromatin Protein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) das zuvor gebundene Chromatin (Dawson et al., 2009). Dieses verhindert als Repressor so die Transkription von LMO2 (Dawson et al., 2009).

Die Studien von Dawson beschreiben zudem ein eindeutiges onkogenes Potential von nukleärem Jak2. Durch die Aufklärung der mit MPN assoziierten Mutation Jak2V617F und Jak2V617F-charakterisierenden Studien konnte die onkogene Funktion von Jak2 bestätigt werden (Rinaldi et al., 2010). Aus MPN-Patienten isolierte und Jak2V617F tragende Zellen weisen eine Lokalisation des mutierten Jak2 im Nukleus der Zellen auf (Rinaldi et al., 2010). Diese Lokalisation des mutierten Jak2 ist weiterhin mit der von Dawson identifizierten Regulation der Expression des Onkogens LMO2 verknüpft (Rinaldi et al., 2010).

Weitere Studien beschreiben, dass Jak2 innerhalb des Nukleus nicht nur für die Phosphorylierung von Histonen verantwortlich ist, sondern ebenfalls die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren kann (Hewetson et al., 2002; Nilsson et al., 2006). Prolaktin induziert das Wachstum der Brustdrüsen. Nilsson *et al.* zeigten, dass in murinen Brustepithelzellen Prolaktin-aktiviertes Jak2 für die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF1-C2 verantwortlich ist (Nilsson et al., 2006). Interessanterweise verhindert Jak2 den proteosomalen Abbau von NF1-C2 und fördert dadurch die Transkription des Tumorsuppressorgens p53 in murinen Milchdrüsen (*Glandula mammalia*) (Johansson et al., 2003; Nilsson et al., 2006; Nilsson et al., 2010).

Für einen weiteren Prolaktin-induzierten Transkriptionsfaktor RUSH-1 konnte ebenfalls eine physikalische Assoziation mit Jak2 bewiesen werden (Hewetson et al., 2002). RUSH-1 besitzt keine Stat-Bindestellen und wird anstatt über den kanonischen Jak-Stat-Signalweg durch nukleäres Jak2 aufgrund von Tyrosin-Phosphorylierungen aktiviert (Helmer et al., 2010; Hewetson et al., 2004).

Unter Einbezug der zuvor erläuterten bisherigeren Studien über direkt Jak2-abhängige nukleäre Funktionen, ist folgende Funktion von Jak2 durch verschiedene nukleäre Mechanismen denkbar:

- I. Jak2 phosphoryliert ähnlich der Studie von Dawson *et al.* direkt Histone (Dawson et al., 2009) und reguliert durch Chromatin-assoziierte Faktoren gezielt die Transkription der im Zuge der Anti-Apoptose relevanten Zielgene.
- II. Jak2 übt eine direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren oder DNA-Regulatoren (z.B. Repressoren) aus, die durch eine Aktivierung von Todesrezeptoren induziert werden.
- III. Die nukleäre Funktion ist mit einer Todesrezeptorassoziation verbunden. Eindrucksvolle erste Studien zeigten bisher, dass TRAILR1/2 (DR4/5) nach Stimulation ihre membranständige und zytoplasmatische Lokalisation verlassen und in den Nukleus translozieren (Bai et al., 2009; Kojima et al., 2011). Hierfür verantwortlich sind zwei nukleäre Zielsequenzen (NLS) die innerhalb der Sequenz von TRAILR2 (DR5) identifiziert werden konnten (Kojima et al., 2011). Dass die Lokalisation von DR5 mit anti-apoptischen Funktionen in Verbindung steht, konnte durch eine Inhibition der Translokation von TRAIL-R2 in den Nukleus bewiesen werden (Kojima et al., 2011). Demnach führt eine Inhibition in HeLa und HepG2 Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose (Kojima et al., 2011). Eine nach TRAIL-Stimulation ausgelöste Interaktion von Jak2 mit DR4/5 und eine damit assoziierte Translokation dieses Komplexes in den Nukleus könnte für den Aufbau einer balancierenden anti-apoptischen Antwort und damit auch für die Zell-Homöostase essentiell sein.

Anknüpfend an Todesrezeptor-vermittelte nukleäre Funktionen sind auch nach Fas-Aktivierung Nukleus-translozierende Faktoren bekannt. So transloziert das DISC-assoziiertes Protein DAXX nach Aktivierung von Fas in den Nukleus (Krieghoff-Henning and Hofmann, 2008). Dort übt es jedoch eine pro-apoptische Funktion aus (Krieghoff-Henning and Hofmann, 2008). Für die Kernlokalisation von DAXX sind wiederum zwei NLS-Sequenzen verantwortlich (Yeung et al., 2008). Dies verdeutlicht, dass nach Stimulation von Todesrezeptoren - unabhängig von Transkriptionsfaktoren - Proteine aktiv in den Nukleus translozieren, um dort pro- und anti-apoptische Gene zu regulieren.

Daher wäre die Aufklärung, welche Faktoren oder Domänen eine gezielte Translokation von Jak2 in den Nukleus steuern von besonderem Interesse. Bemerkenswerterweise besitzt Jak2 in der für die Bindung des Rezeptors verantwortlichen Domäne eine nukleäre Zielsequenz (Lobie et al., 1996). Jedoch konnte bisher nicht eindeutig belegt werden, inwiefern diese NLS essentiell für die Translokation von Jak2 in den Nukleus ist. Eine weitere Studie von Sedek und Strous deutet zudem auf ein SUMOiliertes Signal als Auslöser für die Kernlokalisation von Jak2 hin (Sedek and Strous, 2013). Demnach führen Proliferations-fördernde-, Hunger- oder Stress-induzierende Signale zu einer SUMOilierung von zytoplasmischem Jak2 durch SUMO2/3 und einer anschließenden Translokation in den Nukleus (Sedek and Strous, 2013). Überdies ist die induzierte

SUMOylierung von der Aktivität des katalytischen Zentrums von Jak2 abhängig (Sedek and Strous, 2013). Eine Untersuchung des Translokationsverhaltens von Jak2-Trunktionsmutanten nach FasL-Stimulation erzielte erste Hinweise auf die für die Kernlokalisierung notwendigen Domänen (Abb. 4.17). Die Trunktionsmutante mit fehlender Kinase-Domäne (JH1) Jak2 $\Delta$ JH1 zeigte eine, dem Wildtyp Jak2 ähnliche, Translokation in den Nukleus. So ist die durch Fas-induzierte Kernlokalisierung von Jak2 unabhängig von der Kinase-Domäne. Da eine Jak2-SUMOylierung abhängig von der Aktivität des katalytischen Zentrums ist, ist dieser Mechanismus vermutlich nicht das Nukleus-leitende Signal. Die Trunktionsmutante Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 weist eine differentielle Lokalisation auf (s. Abb. 4.17). Wie bereits durch Keil *et al.* beschrieben, führt die Abwesenheit der Kinase- und Pseudokinase-Domäne (JH1/JH2) ohne Stimulus zu einer Aufhebung der membranständigen Lokalisation von Jak2, wodurch Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 überwiegend im Zytosol und im Nukleus lokalisiert (Keil et al., 2014). Hervorzuheben ist, dass die Kernlokalisierung von Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 durch FasL verstärkt werden konnte (s. Abb. 4.17). Hierdurch konnte bewiesen werden, dass die Fas-induzierte Translokation von Jak2 in den Nukleus unabhängig von der Pseudokinase- und Kinase-Domäne ist. Möglicherweise sind während des Fas-induzierten Signalweges die NLS-Sequenzen für die Translokation von Jak2 in den Nukleus essentiell. Um diese Hypothese zu bestätigen wären Studien mit Trunktionsmutanten, denen die FERM- oder die SH2-Domäne fehlt, sinnvoll. Auch sollte aufgeklärt werden, ob die Kern-lokalisierte Trunktionsmutante Jak2 $\Delta$ JH1/JH2 eine anti-apoptotische Funktion ausüben kann oder diese Funktion abhängig von der Kinase-Aktivität ist. Zudem wäre denkbar, mittels Ko-Immünpräzipitation und LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry), die nukleären Interaktionspartner von Jak2 nach Fas-Stimulation zu identifizieren.

Nach der Bindung des Liganden an einen Todesrezeptor werden Mechanismen induziert, die die Transkription relevanter Zielgene, kodierend für anti- oder pro-apoptotische Faktoren, streng regulieren (Kataoka et al., 2000). Durch die innerhalb dieses Projektes angewendeten Lokalisationsstudien konnte erstmals eine Translokation von Jak2, ausgelöst durch die Stimulation von Todesrezeptoren, innerhalb des Nukleus identifiziert werden. Dadurch wurde der Einfluss von nukleärem Jak2 auf die Regulation von Genen untersucht, die nach Todesrezeptor-Induktion exprimiert werden. Auffallend war hierbei, dass die Gene, die für die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2, c-FLIP und XIAP kodieren, in Jak2-defizienten MEFs nach FasL Stimulation nicht hochreguliert wurden (Abb. 4.18). In Wildtyp-MEFs konnte dagegen eine Hochregulation der Expression von Bcl-2, c-FLIP und XIAP durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors induziert werden. Auffällig ist, dass c-FLIP, anders als Bcl-2 und XIAP, bereits nach 20 min hochreguliert wird. C-FLIP ist einer der ersten anti-apoptotischen Mediatoren und besitzt eine Caspase-8-inhibierende Funktion bereits am DISC-Komplex des Todesrezeptors, wodurch die frühe Hochregulation der Genexpression möglich ist (Scaffidi et al., 1999). Dagegen greifen Bcl-2 und XIAP später in die Fas-vermittelte Signalkette ein. So ist Bcl-2 für die Inhibition der Poren-bildenden Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak verantwortlich und verhindert die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (Irmeler et al., 1997; Vaux et al., 1988). XIAP blockiert direkt die Aktivierung von Effektor-Caspasen (Deveraux et al., 1997). Somit besitzt Jak2 während der Fas-vermittelten Apoptose Gen-regulierende Funktionen, die für den Aufbau einer protektiven Antwort verschiedener anti-apoptotischer Faktoren essentiell sind. Demgegenüber konnten keine Unterschiede in der Hochregulation des pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds Bim festgestellt werden (Abb. 4.20). Auch die Analyse der Genexpression von Bax und Bid wies vielmehr eine leichte Hochregulation

der Expression in Jak2-defizienten gegenüber Wildtyp-MEFs auf. Durch eine fehlende Hochregulation in Jak2-defizienten MEFs ist das Gleichgewicht zwischen anti- und pro-apoptotischen Faktoren der Zielzellen verschoben, was zu einer Verstärkung von Apoptose führt. Bemerkenswerterweise ist durch ein Jak2-Defizit ebenfalls die Hochregulation von Genen aufgehoben, die für Transkriptionsfaktoren kodieren (p53, IRF1 und IRF7) (s. Abb. 4.21). Durch eine Interaktion mit NF1-C2 konnte für p53 bereits eine Gen-regulatorische Funktion von Jak2 innerhalb des Nukleus bewiesen werden (Nilsson et al., 2006). Möglicherweise besitzt nukleäres Jak2 nicht nur während des Prolaktin-, sondern auch während des Fas-Signalweges einen Einfluss auf NF1-C2 und reguliert die Expression des Tumorsuppressorgens p53. Für IRF1 und IRF7 sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen beschrieben (Chapman et al., 2000; Piya et al., 2011; Romieu-Mourez et al., 2006; Sanceau et al., 2000). Inwieweit IRF1 und IRF7 in einem direkten Zusammenhang mit der protektiven Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose stehen, sollte auf Proteinebene genauer untersucht werden.

Um jedoch einen direkten Einfluss von Jak2 bzw. nukleärem Jak2 auf Transkriptionsfaktoren während Todesrezeptor-induzierter Signalwege zu untersuchen, wurde die Induktion von Apoptose in Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach einer Behandlung mit dem NF-κB-Inhibitor BAY 11-7085 und FasL analysiert (s. Abb. 4.22). NF-κB ist für die Induktion anti-apoptotischer Faktoren, unter anderem Bcl-2, c-FLIP und XIAP, nach Todesrezeptor-Aktivierung verantwortlich (Liu et al., 1996). Weil im Gegensatz zu Wildtyp-MEFs die Apoptose in Jak2-defizienten MEFs nicht durch eine Vorbehandlung mit dem NF-κB-Inhibitor sowie der zusätzlichen Gabe von FasL gesteigert werden konnte, ist davon auszugehen, dass Jak2 einen stimulierenden Effekt auf NF-κB während der Fas-induzierten Apoptose ausübt. Dennoch ist erwähnenswert, dass durch eine Inhibition von NF-κB in Wildtyp-MEFs die Apoptoserate nicht auf jene Rate apoptotischer Jak2-defizienter MEFs angehoben werden konnte. Folglich ist dies ein weiterer Hinweis auf drei hypothetische protektive Funktionsmechanismen von Jak2 beim Überleben von Zellen; einerseits ausgeführt im Nukleus und andererseits innerhalb des Zytosols und an der Zellmembran. Möglicherweise könnte Jak2 auch innerhalb des zytosolischen Komplexes II, induziert durch Todesrezeptoren, an der Aktivierung von NF-κB beteiligt sein.

Zusammengefasst schützt Jak2 Zellen möglicherweise innerhalb des Zytosols und an der Membran vor dem Todesrezeptor-induzierten Zelltod. Zusätzlich konnte auf eine zweite anti-apoptotische Funktion von Jak2 innerhalb des Nukleus hingewiesen werden. Nach Aktivierung des Fas-Rezeptors transloziert Jak2 abhängig von der FERM- oder der SH2-Domäne in den Nukleus. Innerhalb des Nukleus ist Jak2 schließlich vor allem für die Regulation von Genen verantwortlich, die für anti-apoptotische Gene kodieren. Hierbei ist eine Histon-regulierende Funktion sehr wahrscheinlich. Auch ein direkter Einfluss auf Transkriptionsfaktoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### **5.1.6 Jak2 ist essentiell für die mitochondriale Integrität**

Bereits die Analyse der Expression verschiedener pro- und anti-apoptotischer Gene nach FasL-Stimulation wies darauf hin, dass Jak2 für eine Balance anti- und pro-apoptotischer Faktoren essentiell ist (siehe Abschnitt 5.1.5). Da ebenfalls eine erhöhte Anzahl aktiver Caspase-8 in Jak2-defizienten MEFs ermittelt werden konnte, war eine stärkere Induktion von aktiviertem Bid nach FasL Stimulation zu erwarten und konnte mittels Western-Blot-

Verfahrens auch bewiesen werden (Abb. 4.23). Bid ist Teil der BH3-only Proteine der Bcl-2-Familie und verbindet den extrinsischen Signalmechanismus mit dem intrinsischen oder auch mitochondrialen Signalmechanismus (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Im Zuge der extrinsischen, d.h. Todesrezeptor-vermittelten Apoptose, spaltet aktive Caspase-8 Bid in seine truncierte aktive Form - das tBid (Li et al., 1998). Anschließend transloziert tBid an die äußere Mitochondrienmembran und aktiviert die pro-apoptotischen Faktoren Bax und Bak (Korsmeyer et al., 2000). Die hierbei ablaufenden Mechanismen werden bisher über zwei Modelle beschrieben, die bisher nicht eindeutig verifiziert sind (Chipuk and Green, 2008). Das direkte Modell beschreibt eine direkte Aktivierung von Bax, die durch eine simultane Blockade des anti-apoptotischen Bcl-2 verstärkt wird. Alternativ ist eine Aktivierung von Bax über tBid durch das indirekte Modell beschrieben (Chipuk et al., 2008; Chipuk and Green, 2008). Durch die Inaktivierung anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2 oder Mcl-1 entsteht aktives Bax oder Bak, wodurch ein direkter Abbau von Bax und Bak nach ihrer Aktivierung verhindert wird (Willis et al., 2007). Somit weist die erhöhte Spaltung der Caspase-8 und auch die von Bid darauf hin, dass Jak2 bereits eine protektive Funktion während der Aktivierung der Initiator-Caspasen ausübt. Mithin schützt Jak2 außerdem sowohl Zellen des Typ I (ohne mitochondrialen Amplifikations-Loop) als auch Zellen des Typ II (mit mitochondrialem Amplifikations-Loop) vor der Apoptose.

Die Analyse der Genexpression des anti-apoptotischen wirkenden Bcl-2 zeigte, dass Bcl-2 im Zuge der Fas-vermittelten Apoptose in Jak2-defizienten Zellen nicht hochreguliert wird; dies steht im Gegensatz zu den ebenfalls untersuchten Wildtyp-MEFs (siehe Abschnitt 5.1.5). Auch eine Analyse auf Proteinebene mittels der Western-Blot-Methode wies eine deutlich reduzierte Menge an Bcl-2 in Jak2-Knockout-MEFs im Gegensatz zu Wildtyp-MEFs nach einer Induktion von Apoptose durch FasL auf (Abb. 4.24). Eine schwache Expression von Bcl-2 auf Proteinebene entsteht möglicherweise durch die Translation verbliebener mRNA, die im basalen Zustand der Zellen gebildet wird. Dieses Bcl-2 wird durch den größeren Anteil an pro-apoptotischen Faktoren (wie z.B. tBid) blockiert und unverzüglich abgebaut.

Um dennoch den Zusammenhang der Apoptose-protektiven Funktion von Jak2 und Bcl-2 genauer charakterisieren zu können, wurde zusätzlich ein Inhibitor für Bcl-2 (YC 137) verwendet (Abb. 4.25). Durch die Inhibition von Bcl-2 stieg die Apoptoserate in Wildtyp-MEFs an und auch die durch Fas-induzierte Apoptoserate konnte durch die Blockade von Bcl-2 verstärkt werden. YC 137 unterbindet und blockiert die Bindung von Bcl-2 an pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie (Real et al., 2004). Durch die Aufhebung der anti-apoptotischen Funktion von Bcl-2 ist somit das Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Faktoren – sowohl nicht behandelte als auch mit FasL-behandelte – Wildtyp-MEFs verschoben. Die Apoptoserate dieser Zellen steigt daher an. Im Gegensatz zu Wildtyp-MEFs konnte die Anzahl apoptotischer Jak2-defizienter MEFs durch eine Behandlung mit YC 137 nicht signifikant gesteigert werden. Dies bekräftigt das durch die Western-Blot-Methode identifizierte Defizit an Bcl-2 in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs und verweist auf eine Verschiebung der Balance zwischen anti- und pro-apoptotischen Faktoren bereits im nicht behandeltem Zustand der Zellen. Auch nach zusätzlicher Stimulation mit FasL wurde die Anzahl Jak2<sup>-/-</sup> apoptotischer Zellen nicht signifikant gesteigert. Der dennoch ermittelte leichte prozentuale Anstieg apoptotischer Zellen ist höchstwahrscheinlich auf die zuvor beschriebene basale Induktion von Bcl-2 zurückzuführen (siehe oben). Zusätzlich sollte hier erwähnt werden, dass die Apoptoserate von Wildtyp-MEFs nach einer Inhibition von Bcl-2 nicht an jene Apoptoserate von Jak2-defizienten MEFs heranreicht. Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor aufgestellte Hypothese, dass Jak2 eine duale

protektive Funktion besitzt und diese während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle ausführt.

Jak2 reguliert die Expression bzw. die Aktivität von Bcl-2 und tBid während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose. Infolgedessen ist anzunehmen, dass Jak2 auch einen Einfluss auf die Regulation weiterer Mitglieder der Bcl-2-Familie ausübt und ein essentieller Mediator für das Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Faktoren ist. Vorherige Studien konnten belegen, dass die Mitglieder der Bcl-2-Familie maßgebend für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Apoptose und Überleben von Zellen sind (Chipuk and Green, 2008). Bis heute wurden die Mitglieder der Bcl-2-Familie als Mitochondrien-assoziierte Proteine beschrieben, die zum einen über den Schutz der Mitochondrien, aber zum anderen auch für die Entlassung mitochondrialer Bestandteile sorgen, z.B. von Cytochrom C, um Apoptose umzusetzen (Youle and Strasser, 2008). Insofern wurde der Einfluss von Jak2 auf die Mitochondrien untersucht und konnte eine bemerkenswerte Morphologie der Mitochondrien von Jak2<sup>-/-</sup> MEFs offengelegt werden (Abb. 4.26 und 4.27). Durch die Färbung von Cytochrom C wurden die Mitochondrien von Jak2<sup>+/+</sup> MEFs und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs visualisiert. Dabei wurden verschiedene Zustände der Mitochondrien-Morphologie zwischen Wildtyp-Zellen und Jak2-defizienten Zellen gefunden: Wildtyp-MEFs wiesen im unbehandelten Zustand überwiegend eine „intermediäre“ Morphologie der Mitochondrien auf. Diese zeichnete sich durch eine kürzere, eng verzweigte Vernetzung der Mitochondrien aus. Diese wurde bereits für Epithelzellen als charakteristische mitochondriale Struktur beschrieben (Collins et al., 2002). Dagegen wiesen Jak2-defiziente MEFs „hyper-fusionierte“, d.h. zu lange tubuläre Strukturen der Mitochondrien auf. Über die Morphologie der Mitochondrien lässt sich nicht nur der Zustand der Mitochondrien erkennen, sondern es kann auch auf den „Gesundheitszustand“ der gesamten Zelle zurück geschlossen werden (Scorrano, 2013). So entscheidet die Funktionalität der Mitochondrien über Zellvitalität und Apoptose (Scorrano, 2013). Um die Funktionalität und so auch die ATP-Synthese der als „Kraftwerke“ der Zellen geltenden Organellen aufrechtzuerhalten, unterliegen Mitochondrien Fusions- und Fissionsprozessen (Kasahara and Scorrano, 2014; Scorrano, 2013). Während die Fission der Mitochondrien massiv durch die Einleitung von Apoptose induziert wird und es in diesem Rahmen ebenfalls zu einer Fragmentierung von Mitochondrien kommt, gilt die Fusion von Mitochondrien auch als „Heilungsprozess“ (Chan, 2006). Innerhalb des durch die Fusion gebildeten Netzwerks, sollen so geschädigte Mitochondrien durch einen Austausch mitochondrialer Inhalte der intakten Mitochondrien erneuert und die Zellen vor dem Zelltod geschützt werden (Chan, 2006). Die hyper-fusionierten Strukturen der Mitochondrien weisen möglicherweise auf einen beeinträchtigten Zustand bzw. Stress der Zellen aufgrund der Jak2-Defizienz hin. Wenige Studien beschreiben bisher die hyper-fusionierte mitochondriale Morphologie sowie deren Folge für betroffenen Zellen. Bisher wurde die Hyperfusion als Stress-induzierter Prozess beschrieben, der mit einer erhöhten Synthese von ATP der Mitochondrien in Verbindung gebracht wurde und gleichzeitig die Translokation des Poren-bildenden Bax verlangsamt (Tondera et al., 2009). So könnte die hyper-fusionierte Morphologie der Mitochondrien in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs darauf hindeuten, dass Jak2 einen direkten Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus besitzt oder die Zellen durch eine Inhibition von Proliferations-fördernden Signalen in einem Zellstress auslösendem Grundzustand verweilen. Aufgrund der nicht erhöhten basalen Apoptoserate von Jak2-defizienten MEFs führt dieser Grundzustand die Zellen in einen programmierten Zelltod. Dass Jak2 indirekt in den Metabolismus der Mitochondrien eingreift, ist möglicherweise ein Hinweis auf die beobachtete „Grund“-

Apoptose der Leber in den L-Jak2KO Tieren (s. Abschnitt 5.1.3). Wie zuvor in Abschnitt 5.1.3 dargelegt, führt der Gewebe-spezifische Knockout von Jak2 in Hepatozyten zu einem Anstieg von „fatty acids“, die wiederum zu einem „Shift“ von Proliferation zu Apoptose führen kann und möglicherweise durch ein Defizit von Jak2 zusätzlich verstärkt wird (Shi et al., 2012; Sommerfeld et al., 2015). So könnte hier die erhöhte Aufnahme von „fatty acids“ zu Zell-Stress beitragen, indem der Überschuss an Metaboliten des Zitratzyklus (Kasahara and Scorrano, 2014) zu einer erhöhten ATP-Synthese führt. Folglich sollten Jak2-defiziente Hepatozyten auf eine differentielle Mitochondrien Morphologie untersucht werden.

Neben einem möglichen Einfluss von Jak2 auf Faktoren des mitochondrialen Metabolismus, könnte Jak2 auch durch die Regulation anderer mitochondrialer Proteine die mitochondriale Morphologie beeinflussen. Vorstellbar ist, dass Jak2 die Expression oder Aktivität der an der Fusion und Fission beteiligten Faktoren reguliert. Die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran wird vor allem durch die GTPasen Mitofusion 1 und Mitofusin 2 induziert (Chen et al., 2003). Durch eine durch GTP-Hydrolyse verursachte Konformationsänderung beider Mitofusine wird so die Fusion der OMM garantiert. Die Mitofusine können allerdings auch durch eine JNK-vermittelte Phosphorylierung und eine folgende Ubiquitin-Markierung abgebaut werden (Chen et al., 2003; Leboucher et al., 2012). Die Fusion der inneren Membran wird durch OPA-1 induziert, welches unter anderem durch OMA-1 reguliert wird (Cipolat et al., 2004; Head et al., 2009). Möglicherweise greift Jak2 mittels einer Regulation der Mitofusine, OPA-1 oder deren Regulatoren wie JNK oder OMA-1 in die mitochondriale Fusionsmaschinerie ein. Der Aktivierungszustand, die Mengen und die Lokalisation dieser Proteine sollten daher zukünftig untersucht werden. Die Fission der Mitochondrien wird hauptsächlich durch den Faktor DRP1 eingeleitet (Kasahara and Scorrano, 2014). Getrieben durch eine Phosphorylierung von zytosolischem Calcineurin transloziert DRP1 an die OMM (Sheridan et al., 2008; Sheridan and Martin, 2010). Dieser Prozess wird durch eine Inhibition von DRP1, vermittelt über die PKA, inhibiert (Sheridan et al., 2008; Sheridan and Martin, 2010). So wäre auch ein Einfluss von Jak2 auf die Regulation der Fissionsmaschinerie denkbar, wodurch eine fehlende Fission zu einer Hyperfusion der Mitochondrien in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs führen könnte. Weiterhin ist bekannt, dass einige Mitglieder der Bcl-2 Familie ebenfalls einen Einfluss auf die Fusions- und Fissions-Maschinerie der Mitochondrien besitzen (Martinou and Youle, 2011). So konnte u.a. für Bcl-X<sub>L</sub> beschrieben werden, dass es sowohl an der Fusion als auch an der Fission von Mitochondrien beteiligt ist (Martinou and Youle, 2011). Da innerhalb dieser Dissertation beschrieben werden konnte, dass Jak2 Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert, steht zu vermuten, dass Jak2 auch über die Mitglieder der Bcl-2-Familie auf die dynamischen Prozesse der Mitochondrien einwirkt.

Erste Untersuchungen innerhalb dieses Projektes zur Funktionalität der Fissionsmaschinerie wurden unter zur Hilfenahme von FCCP durchgeführt (s. Abb. 4.26 und Abb. 4.27). FCCP ist ein Ionophor, welches als mobiler Ionentransporter die ATP-Synthese unterbricht (Benz and McLaughlin, 1983; Luvisetto et al., 1987). Folglich führt der Abbruch der ATP-Synthese und der oxydativen Phosphorylierung zu einem Abfall des Membranpotentials der IMM. Die OMM wird permeabilisiert und die Fission der Mitochondrien eingeleitet (Benz and McLaughlin, 1983; Luvisetto et al., 1987). So führt FCCP zu einer Fragmentierung der Mitochondrien (Benz and McLaughlin, 1983; Luvisetto et al., 1987). Tatsächlich bilden die Mitochondrien von Wildtyp-MEFs in nahezu 100% der

Fälle nach einer Behandlung mit FCCP kleine Fragmente, welche häufig zu kleinen „Donut“-ähnlichen Ringen zusammengeslossen sind. Aufgrund einer anzunehmenden Beeinträchtigung der Mitochondrien in Jak2-defizienten MEFs konnte daher entweder eine zunehmende Fragmentierung oder keine Veränderung in diesen Zellen erwartet werden. Anders als angenommen wurde durch die Behandlung die hyper-fusionierte Struktur der Mitochondrien aber lediglich teilweise aufgehoben. So bildeten die Mitochondrien von Jak2-defizienten MEFs zu 80% große Fragmente, die sich zu großen „Donut“-Ring-Strukturen zusammengeslossen hatten. Da teilweise eine Fission der Mitochondrien vollzogen wurde, ist auszuschließen dass Jak2 einen essentiellen Einfluss auf die Fissionsmaschinerie ausübt. Aufgrund der hier identifizierten protektiven Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose erscheint es zweckmäßig, in Zukunft zu untersuchen, welche Morphologie die Mitochondrien von Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs einnehmen, nachdem Apoptose durch einen Todesrezeptor induziert wurde.

Allerdings wurde bereits die Funktionalität der Mitochondrien während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose durch eine Messung des mitochondrialen Membranpotentials untersucht (s. Abb. 4.28 und 4.29). Bei der Analyse des Membranpotentials der IMM fiel auf, dass nach Zugabe von FasL oder auch FCCP die Anzahl der Zellen mit einem Verlust des Membranpotentials in Jak2-defizienten MEFs deutlich höher war als in Wildtyp-MEFs. Zudem akkumulierten Jak2-defiziente MEFs nach FasL-Stimulation eine große Menge an mROS (s. Abb. 4.30). Der Verlust des Membranpotentials der IMM entsteht während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose hauptsächlich durch die Permeabilisierung der OMM (Tait and Green, 2010). Durch die Aktivierung von Bax und Bak, u. a. durch tBid, oligomerisieren Bax und Bak in der OMM und formen die charakteristischen Poren (Korsmeyer et al., 2000). Dies hat zur Folge, dass Faktoren des Intermembranraumes (zwischen OMM und IMM) in das Zytosol entlassen werden (Chipuk and Green, 2008). Darauf tragen jene Faktoren wie Cytochrom C zur Aktivierung von Caspasen bei, welche die ATP-Synthese durch den Abbau weiterer Intermembranproteine unterbrechen (Chipuk and Green, 2008). Durch den Abbruch der ATP-Synthese bricht schließlich das Membranpotential der IMM zusammen (Chipuk and Green, 2008). Durch die Aufhebung der respiratorischen Kette werden die als Intermediate gebildeten mROS innerhalb des Mitochondriums verstärkt freigesetzt (Fleury et al., 2002). Die Freisetzung von ROS führt schließlich zu einer Verstärkung pro-apoptotischer Faktoren (Fleury et al., 2002). Somit weitete sich der identifizierte Apoptose-protektive Effekt von Jak2 auf die Regulation der Permeabilisierung und damit auf den mitochondrialen Amplifikations-Loop aus. Höchstwahrscheinlich reguliert Jak2 dies über seinen Einfluss auf die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Gerade für das durch Jak2 regulierte Bcl-2 ist bekannt, dass es durch die Blockade von Bax die Permeabilisierung der OMM verhindert, gleichzeitig aber auch einen inhibierenden Effekt auf die Produktion massiver mROS besitzt (Chipuk and Green, 2008; Fleury et al., 2002). Zusätzlich könnte auch eine erhöhte ATP-Synthese infolge von Zell-Stress (hyper-fusionierte Mitochondrien der Jak2<sup>-/-</sup> MEFs) und zusätzlicher Stimulation zu einer höheren Freisetzung von mROS führen. Aufgrund dessen konnte ebenfalls eine größere Anzahl an Zellen mit Verlust des Potentials der IMM nach FCCP-Behandlung beobachtet werden. So führt FCCP zu einem Abbruch der respiratorischen Kette, einer massiven Freisetzung von mROS und dem Verlust des IMM-Potentials (Benz and McLaughlin, 1983). Daher könnte sowohl eine Regulation der Bcl-2-Proteine durch Jak2, als auch ein Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus zur identifizierten protektiven Funktion von Jak2 beitragen.

Es ist festzustellen dass Jak2 zum einen die Funktionalität und zum anderen die Morphologie von Mitochondrien beeinflusst. Anders, als aufgrund der vorherigen Erkenntnisse erwartet, besitzt Jak2 jedoch keine protektive Funktion während der intrinsischen Apoptose. Die intrinsische Apoptose aktiviert Effektor-Caspasen ausschließlich über die Mitochondrien (Strasser et al., 1995). Weder die durch Mitomycin C induzierte Apoptose über Schädigung der DNA (Abb. 4.31) noch die durch Thapsigargin induzierte Apoptose über Stress des ER (Abb. 4.33) (Happo et al., 2012) führten zu einer Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen oder der Menge an aktiver Caspase-3 in Jak2-defizienten MEFs gegenüber Wildtyp-MEFs. Auch ließen sich keine Unterschiede in der Anzahl der Zellen mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie einer Akkumulation von mROS (s. Abb. 4.32) im Vergleich von Jak2<sup>+/+</sup> und Jak2<sup>-/-</sup> MEFs erkennen. Folglich besitzt Jak2 innerhalb der Todesrezeptor-induzierten Signalwege der Apoptose eine protektive Funktion, die zudem oberhalb des mitochondrialen Weges ausgeführt wird. Da zuvor identifiziert wurde, dass Jak2 trotzdem einen Einfluss auf das Mitochondrium hat, könnte dies abermals durch eine duale Funktion von Jak2 erklärt werden. Jak2 ist einerseits Teil eines membranständigen oder zytosolischen Komplexes und trägt dazu bei, die Aktivierung der Caspase-8 zu blockieren, wodurch auch die Aktivierung von tBid inhibiert wird. Andererseits transloziert Jak2 nach Todesrezeptor-Induktion in den Nukleus und reguliert die Expression anti-apoptotischer Faktoren. Dass dies ein rein Todesrezeptor-abhängiger Prozess ist, konnte im Rahmen der Fortführung dieses Projektes bereits bewiesen werden (siehe Anhang: Publikation). Hierbei translozierte Jak2 in den Nukleus nach TNFR- und DR4/5-Aktivierung, jedoch nicht nach Mitomycin C-Stimulation. Dass der mitochondriale Phänotyp der hyper-fusionierten Mitochondrien in Jak2-defizienten MEFs nicht zu einer erhöhten Apoptoserate nach intrinsischer Stimulation führt, könnte alternativ folgende Ursachen haben: Entweder ist dieser Phänotyp nicht mit Apoptose assoziiert, oder die durch Zell-Stress möglicherweise angehobene ATP-Synthese führt zu einer Verzögerung der Translokation von Bax an die Membran und dient als Schutzmechanismus. Dieser Schutz ist jedoch während der extrinsischen Apoptose durch die Caspase-8 und das Ungleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine aufgehoben.

### **5.1.7 Die Dualität der Janus Kinase 2 während der Todesrezeptor induzierten Apoptose**

Wie bereits ausführlich innerhalb dieser Dissertation beschrieben, führte auch die Verwendung von Jak2-Inhibitoren in Kombination mit einer anschließenden FasL-Stimulation zu einer erhöhten Apoptoserate (siehe Abschnitt 5.1.2). Da die verwendeten Jak2-Inhibitoren (NVP-BSK805 und Z3) ATP-kompetitive Eigenschaften aufweisen (Baffert et al., 2010; Sayyah et al., 2008), sind möglicherweise die Kinase- und die Pseudokinase-Domäne essentiell für die Ausführung der protektiven Funktion von Jak2 während des Todesrezeptor-induzierten Signalweges.

Auch die direkte Analyse von MEFs mit einer Jak2<sup>FF/FF</sup>-Mutation, bei welcher ein Austausch der Tyrosine 1007/1008 durch jeweils ein Phenylalanin zu einem Kinase-inaktivem Jak2 führt (Keil et al., 2014), zeigte eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen und eine größere Menge von aktiver Caspase-3 nach FasL-Stimulation (s. Abb. 4.34). Dies unterstützt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Kinase-Domäne wichtig für die Ausübung der protektiven Funktion von Jak2 ist. Jedoch ist sowohl die induzierte

Apoptoserate, als auch die Menge an aktiver Caspase-3 in Jak2<sup>FF/FF</sup> MEFs deutlich geringer als in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs. Überraschenderweise zeigte sich zudem, dass Wildtyp-MEFs keine Phosphorylierung der Tyrosine 1007/1008 nach FasL-Stimulation aufweisen, die wiederum essentiell für die Aktivierung der Kinase-Domäne und deren katalytische Aktivität sind (Abb. 4.35) (Keil et al., 2014; LaFave and Levine, 2012). Diese identifizierte partielle Abhängigkeit der protektiven Funktion von Jak2 von der Kinase-Domäne ist ein weiterer Hinweis auf eine Dualität von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose. Wie durch Keil *et al.* beschrieben, besitzt Jak2 am IFNGR eine „Scaffold“-Funktion (Keil et al., 2014). So führt Jak2 neben der kanonischen Signalweiterleitung durch die Phosphorylierung von Stats auch eine Gerüst-bildende Funktion aus, die zur Stabilisierung des IFNGR beiträgt (Keil et al., 2014). Daher kann die duale Funktion von Jak2 während des Todesrezeptor-induzierten Signalweges folgendermaßen hypothetisch erweitert werden: Zum einen ist Jak2 Teil eines Komplexes an der Membran bzw. innerhalb des Zytoplasmas. Innerhalb dieses Komplexes ist die Kinase-Domäne für die Ausführung der Inhibition von pro-apoptotischen Faktoren nicht essentiell. Hier wären beispielsweise stützende Funktionen von Jak2 vorstellbar, die zu einer Stabilität der jeweiligen anti-apoptotischen Komplexe beitragen. Zum anderen transloziert Jak2 nach Fas-Aktivierung in den Nukleus, um dort Gen-regulatorische Eigenschaften auszuüben. Durch zahlreiche Studien konnten bisherige Nukleus-assoziierte Funktionen von Jak2 nur mit einer Kinase-Aktivität in Verbindung gebracht werden (Dawson et al., 2009; Hewetson et al., 2002; Nilsson et al., 2006). Dass die Phosphorylierung der Tyrosine 1007/1008 bisher nach FasL-Stimulation nicht nachgewiesen werden konnte, könnte auch rein technisch über eine fehlende Eigenschaft des verwendeten Lysepuffers, der keine Nukleus-Proteine freisetzt gedeutet werden. Daher sollten zukünftig andere Lysepuffer getestet werden.

Nach FasL-Stimulation konnte keine aktivierende Phosphorylierung von Stat1 nachgewiesen werden. Zudem wies auch die Analyse von phosphoryliertem Stat3 keine Unterschiede zwischen Wildtyp-MEFs und Jak2-defizienten MEFs auf (Abb. 4.35). Stat1 wird hauptsächlich durch die Aktivierung von Signalmechanismen der Interferone induziert, sorgt jedoch auch, wie Stat3, innerhalb des GH-Signalweges für Proliferations-fördernde und daher anti-apoptotisch wirkende Signale (O'Shea et al., 2002; Rosner et al., 2006). Aufgrund dessen und der Tatsache, dass Jak2<sup>-/-</sup> MEFs keine Sensitivität gegenüber intrinsischen Apoptose-Induktoren zeigen, kann ausgeschlossen werden, dass ein sekundärer Effekt durch einen Mangel von Wachstums-fördernden Signalen durch Hormon-Rezeptoren oder Interferonen zu einer erhöhten Apoptoserate in Jak2-defizienten MEFs führen.

So kann die durchgeführte Analyse zu einer Beteiligung von MAPK bei der Apoptose diese Hypothese unterstützen. Die MAPK JNK und p38 vermitteln innerhalb apoptotischer Signalmechanismen Zelltod-fördernde Signale, jedoch gleichzeitig auch starke anti-apoptotische Signale über die Signalmechanismen von Wachstumsfaktoren (z.B. GH, IL-6) (Jung et al., 2004; Ogata et al., 1997; Rausch and Marshall, 1997; Tournier et al., 2000). Die gesteigerte Phosphorylierung von JNK und p38 nach FasL Stimulation in Jak2-defizienten MEFs gegenüber Wildtyp-MEFs (s. Abb. 4.36) ließ vermuten, dass JNK und p38 pro-apoptotische Signalmechanismen unterstützen. Jedoch konnte dies aufgrund einer Analyse mit einem JNK-Inhibitor sowie einem p38-Inhibitor widerlegt werden (s. Abb. 4.37). Ferner konnte die kombinierte Verwendung der Inhibitoren weder die Fas-induzierte Apoptose von Jak2<sup>+/+</sup> MEFs, noch von Jak2<sup>-/-</sup> MEFs blockieren. Daher ist zu

vermuten, dass durch JNK und p38 Mechanismen aktiviert wurden, die Proliferationsfördernde Signale induzieren, um der eingeleiteten Apoptose entgegenzuwirken.

## 5.2 Die Funktion von Jak2 während parasitärer Infektionen

Seit der Identifizierung einer durch die Mutation Jak2V617F hervorgerufenen konstitutiven Aktivität von Jak2 in Patienten mit MPN ist die Aufklärung Jak2-vermittelter karzinogener Mechanismen in den Vordergrund getreten (LaFave and Levine, 2012). Seither wurden zahlreiche Inhibitoren entwickelt, um die konstitutive Aktivität von Jak2 in Patienten mit MPN zu unterdrücken (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Erste klinische Studien bewiesen einen Therapieerfolg nach Behandlung von MPN-Patienten mit dem Jak2-Inhibitor Ruxolitinib (Jakavi®) (LaFave and Levine, 2012; O'Shea et al., 2015). Gleichzeitig zeigten einige der mit Jakavi® behandelten Patienten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionserkrankungen mit zoster Viren oder Mykobakterien (Hopman et al., 2014; Vannucchi et al., 2015). Mithin blockiert der Jak2-Inhibitor nicht nur die hyperaktive Mutante der malignen Zellen, sondern inhibiert möglicherweise auch endogenes Jak2 nicht veränderter Zellen. Dies verdeutlicht, dass Jak2-vermittelte Signalmechanismen für den Aufbau einer intakten Immunantwort essentiell sind. Da ein konventioneller Knockout von Jak2 aufgrund einer blockierten adulten Erythropoese bereits nach Tag 12.5 zu einer embryonalen Letalität führt (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998), ist die direkte Aufklärung der Funktionen von Jak2 während Infektionen *in vivo* kaum beschrieben. Aufgrund dessen stellte die Untersuchung eines konditionalen Knockouts von Jak2 während einer parasitären Infektion mit *T. gondii* einen zentralen Aspekt dieser Dissertation dar.

Für den Aufbau einer Immunantwort gegen *T. gondii* sind zelluläre Mechanismen des angeborenen Immunsystems essentiell. Durch zahlreiche Studien konnten Makrophagen, inflammatorische Monozyten und Granulozyten als Haupteffektorzellen identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde innerhalb dieser Arbeit durch eine Verpaarung von Jak2<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit LysM<sup>cre</sup> Mäusen ein konditioneller Knockout von Jak2 in Makrophagen, Monozyten und Granulozyten erzielt: Jak2<sup>fl/flx</sup>LysM<sup>cre</sup>. Jak2 ist an den zytosolischen Teil des GM-CSF Rezeptors assoziiert (Quelle et al., 1994). Durch einschlägige Studien konnte beschrieben werden, dass die Induktion von GM-CSFR für die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen in ausgereifte Makrophagen, Granulozyten und Monozyten von großer Bedeutung ist (Hamilton, 2008). Eine Analyse dieser Zellpopulationen sowie der Gesamtzellzahl in der Milz und den inguinalen Lymphknoten der generierten Tiere mit unterschiedlichen Genotypen förderte keine Unterschiede zwischen Jak2<sup>fl/flx</sup>LysM<sup>cre</sup> und den jeweiligen Kontrollgruppen (wt, Jak2<sup>fl/fl</sup> und LysM<sup>cre</sup>) zu Tage (s. Abb. 4.38 und Abb. 4.39). So kann ein möglicher Defekt bei der Differenzierung zu Granulozyten, Makrophagen und Monozyten, verursacht durch einen Mangel von Jak2, ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis bestätigend zeigte bereits die Analyse von GM-CSF<sup>-/-</sup> Mäusen keinen Defekt in der Differenzierung der analysierten Zellpopulationen (Stanley et al., 1994). Auffällig war jedoch, dass die Funktionalität einer Subpopulation von Makrophagen in der Lunge (alveolare Makrophagen) deutlich reduziert war (Paine et al., 2001; Stanley et al., 1994). Eine zukünftige Untersuchung der Zellpopulationen von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten in der Lunge von Jak2<sup>fl/flx</sup>LysM<sup>cre</sup> erscheint daher zweckmäßig. Weiterhin beschreiben verschiedene Studien eine eher geringe Expression von Lysozym M in gewebeständigen Makrophagen

(besonders der Milz), die jedoch nach einer Infektion deutlich zunimmt (Clausen et al., 1999). Daher steht zu vermuten, dass die Expression der unter dem LysMcre-Promotor stehenden Cre-Rekombinase in naiven Mäusen nicht ausreicht, um einen vollständigen Knockout von Jak2 in residenten Makrophagen zu generieren. Auch die Studie von Abram *et al.* weist in die gleiche Richtung. Durch die Verpaarung von LysMcre mit ROSA-EYFP Tieren wurden Zellen mit aktiver Cre-Rekombinase mittels der Analyse der Expression von YFP identifiziert (Abram et al., 2014). Dabei konnte beschrieben werden, dass lediglich 40% der in der Milz befindlichen Makrophagen YFP+ waren (Abram et al., 2014). Dagegen rekombinierten neutrophile Granulozyten der Milz zu fast 80%. Weiterhin konnte durch Abram *et al.* beschrieben werden, dass nahezu 100% der alveolaren sowie der sich im Peritoneum befindlichen Makrophagen YFP+ waren (Abram et al., 2014). Daher erscheint es sinnvoll, zukünftig neben Zellpopulationen der Lunge ebenfalls die Populationen von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen des Peritoneums von naiven Jak2fl/flxLysMcre zu untersuchen.

Um schließlich die Funktionalität der Granulozyten, Monozyten und Makrophagen der Jak2fl/flxLysMcre Tiere zu untersuchen, wurden die Tiere und Kontrollen mittels einer Infektionsstudie mit *T. gondii* untersucht. Durch die Analyse des Überlebens von Jak2fl/flxLysMcre Tieren und Tieren der Kontrollgruppen wurde deutlich, dass Jak2fl/flxLysMcre Tiere gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* hoch suszeptibel waren (s. Abb. 4.40). So waren bereits nach 8 Tagen nach der Infektion mit *T. gondii* 75% der Jak2fl/flxLysMcre verstorben, wobei wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tiere an Tag 8 keinen Phänotyp zeigten. Schließlich wurde in Jak2fl/flxLysMcre Tiere eine 100%ige Rate der Mortalität bis Tag 10 nach der Infektion beobachtet. Somit sind Jak2-vermittelte Signalmechanismen in Granulozyten und Makrophagen als essentiell für den Aufbau einer intakten Immunantwort gegen *T. gondii* einzustufen. Durch eine Depletion von Granulozyten mittels GR1-Antikörper konnte bereits bewiesen werden, dass Granulozyten zu Beginn einer *T. gondii*-Infektion entscheidende Funktionen ausüben (Bliss et al., 2001). Kontrovers wurde dies von Dunay *et al.* diskutiert. Demnach wird durch eine GR1-Antikörper-vermittelte Depletion nicht ausschließlich die Anzahl von Granulozyten verringert, sondern auch jene von GR-1-positive Monozyten (Dunay et al., 2010). So identifizierte diese Studie inflammatorische und GR-1 positive Monozyten als die Schlüsselmoleküle zu Beginn einer *T. gondii*-Infektion (Dunay et al., 2008; Dunay et al., 2010). Ähnlich verhielten sich IFNGR<sup>-/-</sup> Tiere. Für IFNGR-Knockout-Mäuse ist beschrieben, dass diese eine hohe Suszeptibilität gegenüber *T. gondii* sowie anderen Pathogenen besitzen (Deckert-Schluter et al., 1996; Huang et al., 1993). Aus diesem Grund wurden IFNGR-defiziente Tiere als Positiv-Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion mit *T. gondii* mitgeführt. Auffällig ist, dass IFNGR<sup>-/-</sup>-Tiere eine zu Jak2fl/flxLysMcre um 2-3 Tage verzögerte 100%ige Mortalität erreichten, die zudem signifikant war. Jak2 ist an den zytosolischen Teil des IFNGR-Komplexes assoziiert und für die zytosolische Signalweiterleitung essentiell (O'Shea et al., 2002). Da IFN- $\gamma$  einer der Hauptmediatoren während der Immunantwort gegen *T. gondii* ist, konnte hier auch ein identischer Krankheitsverlauf erwartet werden. (Nathan et al., 1983). Es ist beschrieben, dass Jak2 auch an den IL-12R assoziiert ist (Yamamoto et al., 1999). Ebenso konnte beschrieben werden, dass durch die Bindung von IL-12 an den IL-12R von Makrophagen deren immunologische Funktionen, wie z.B. die Präsentation von prozessierten Antigenen, erhöht wird (Grohmann et al., 2001). Folglich führt ein autokriner Signalweg von IL-12 zu einer gesteigerten Antigen-präsentierenden Funktion (Grohmann et al., 2001). Daher ist anzunehmen, dass ein Defekt des autokrinen IL-12R-Signalwegs zu einem schwereren

Verlauf der Infektion in Jak2fl/flxLysMcre Tieren als in IFNGR<sup>-/-</sup> Tieren führt. Auch die Analyse des Körpergewichtes an Tag 7 nach der Infektion bewies, dass sich Jak2fl/flxLysMcre Tiere deutlich von den Kontrollgruppen abgrenzen. Während wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tiere keine Veränderung des Körpergewichtes zeigten, verloren Jak2fl/flxLysMcre Tiere im Durchschnitt bis zu 5% ihres Gewichtes. Dagegen hatten IFNGR-Knockout Tiere bereits ca. 10% ihres Körpergewichtes verloren. Folglich zeigen Jak2fl/flxLysMcre Tiere und IFNGR<sup>-/-</sup> Tiere bereits hier eine unterschiedliche Manifestation des Krankheitsverlaufes. Somit können weiteren Jak2-assoziierten Rezeptoren oder Mechanismen bedeutende Funktionen zugesprochen werden, die für den Aufbau einer Granulozyten- und Makrophagen-vermittelten Immunantwort notwendig sind. Überraschenderweise überlebten bis Tag 60 nur 40% der Jak2fl/fl Tiere und grenzten sich damit leicht gegenüber wt (68%) und LysMcre (57%) Tieren ab. Durch die Analyse der Jak2 Proteinexpression der Milzen der verschiedenen Gruppen konnte aufgeklärt werden, dass Jak2fl/fl Tiere hier eine leicht reduzierte Jak2 Expression besitzen (Abb. 4.60). Möglicherweise beeinträchtigen die eingefügten *loxP*-Sequenzen die Genexpression. Dennoch zeigt die Untersuchung des Körpergewichtes sowie weitere Analysen, die innerhalb dieses Projektes durchgeführt wurden, dass es zu keiner Ausprägung eines relevanten Phänotyps von Jak2fl/fl Tieren während der Infektion mit *T. gondii* kommt.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden, dass ein Defizit von Jak2 in immunologisch relevanten Zellen, wie Granulozyten und Makrophagen, essentiell für die Protektion gegen *T. gondii* ist. Daher könnte die Blockierung von Jak2 durch Jak2-Inhibitoren zu einer Immunsuppression in MPN Patienten und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber *T. gondii* führen. Menschen stellen mögliche Zwischenwirte von *T. gondii* dar (Jones and Dubey, 2012). Eine Infektion von *T. gondii* des Menschen wird durch die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser oder Zysten-haltigem rohen Fleisch verursacht (Jones and Dubey, 2012). Bei Menschen verläuft eine Toxoplasmose in den meisten Fällen asymptomatisch oder ist durch milde Symptome wie Fieber und geschwollene Lymphknoten gekennzeichnet (Hunter and Sibley, 2012). Jedoch werden Toxoplasmen nicht vollständig eliminiert und überdauern als Zysten im Gehirn des infizierten Menschen. Zudem ist bekannt, dass eine Infektion von *T. gondii* bei immuninkompetenten Individuen ein beträchtliches Risiko darstellt (Hunter and Sibley, 2012; Jones and Dubey, 2012). So könnte die Inhibition von Jak2 in MPN-Patienten einerseits die Manifestation einer schweren akuten Toxoplasmose, möglicherweise jedoch auch die Reaktivierung von Toxoplasmen aus Gehirn-überdauernden Zysten während einer chronischen Infektion zur Folge haben.

### 5.2.1 Die zelluläre Immunantwort während der Toxoplasmose

Immunantworten werden durch zelluläre Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems vermittelt (Murphy et al., 2008). Während einer Infektion mit *T. gondii* sind die immunologischen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten, Makrophagen und auch DCs, essentiell, um eine kompetente Immunantwort einzuleiten (Yarovinsky, 2014). Eine spätere Migration der immunkompetenten Zellen in die peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten sorgt für die Aktivierung und Rekrutierung der Effektorzellen des adaptiven Immunsystems (Murphy et al., 2008). Somit stellen auch Granulozyten und Makrophagen eine wichtige Brücke bei der Aktivierung der zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems dar.

Die Analyse der Gesamtzellzahl der Milzen zeigte, dass die Zellzahl der Milzen und der inguinalen Lymphknoten von wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren an Tag 7 nach der Infektion deutlich zugenommen hatte (s. Abb. 4.44). Da Toxoplasmen während der Infektion Organe wie die Milz, aber auch Leber, Lunge und Gehirn befallen, ist hier eine Zunahme immunologischer Effektorzellen zu erwarten. Andererseits führt eine Migration immunologischer Zellen in die peripheren lymphatischen Organe oder die Proliferation Gewebe-ständiger Effektorzellen des Immunsystems zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl. Im Gegensatz zu den drei Kontrollgruppen nahm die Gesamtzellzahl der Milz in Jak2fl/flxLysMcre Tieren ab. Auch die Anzahl der Zellen in den inguinalen Lymphknoten stieg im Vergleich zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren nur gering an. Somit führt ein Defizit von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu einem Ausstrom und keinem Einstrom immunologischer Effektorzellen aus der Milz. Möglicherweise findet jedoch keine Zellproliferation statt und die Zellzahl verringert sich aufgrund eingeleiteter Apoptose. Während einer Infektionsstudie mit einem hoch virulenten Stamm von *T. gondii* (RH) konnte bereits gezeigt werden, dass eine schnelle Replikation von Tachyzoiten in der Milz zu einer massiven Induktion von Apoptose in T-Zellen, B-Zellen aber auch in Granulozyten führt (Gavrilescu and Denkers, 2003). Möglicherweise sind diese Zellpopulationen in Jak2fl/flxLysMcre Tieren ebenfalls durch eine Induktion von Apoptose reduziert. Weiterhin konnte nach der Behandlung von MPN-Patienten mit verschiedenen Jak2-Inhibitoren eine Verkleinerung der Milz festgestellt werden (Cervantes et al., 2013). Dieser Effekt konnte auf die Inhibition von Vorläuferzellen zurückgeführt werden, welche vor allem nicht zu Granulozyten differenzieren konnten (Cervantes et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass Patienten mit einer Jak2-Inhibitor-Behandlung aufgrund reduzierter Granulozyten-Differenzierung sensitiver gegenüber einer *T. gondii* Infektion sind.

Eine Infektion mit *T. gondii* aktiviert Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen, die als erste Effektorzellen an den Ort der Infektion, in infiziertes Gewebe und in die drainierenden Lymphknoten migrieren, um dort weitere immunologische Zellen zu aktivieren (Bliss et al., 2000; Dunay et al., 2008; Liu et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003). Eine Analyse dieser Zellpopulationen nach einer *T. gondii* Infektion zeigte, dass die Anzahl von Granulozyten in der Milz und den inguinalen Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre Mäusen an Tag 7 zunimmt, aber gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre deutlich reduziert war (s. Abb. 4.45). Granulozyten sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und werden früh während der Infektion über einen Chemokingradienten zum Infektionsherd geführt (Bliss et al., 2000). Dort werden Toxoplasmen durch anti-parasitäre Mechanismen zerstört (Dupont et al., 2012). Somit könnte die geringere Anzahl von Granulozyten auf einen Defekt in der anti-parasitären Antwort von Jak2fl/flxLysMcre Tieren hindeuten. Ob die Proliferation oder die Migration von Granulozyten gehemmt ist oder Apoptose zu einer Reduktion von Granulozyten führt, sollte in nachfolgenden Untersuchungen analysiert werden.

Besonders auffällig war die reduzierte Anzahl von Monozyten in der Milz und besonders in den drainierenden Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre an Tag 7 nach der Infektion mit *T. gondii* (Abb. 4.46). Inflammatorische Monozyten und Makrophagen sind als eine der Haupteffektorzellen während der Immunantwort gegen *T. gondii* beschrieben (Dunay et al., 2008; Dunay et al., 2010). So migrieren proinflammatorische Monozyten über den Blutstrom zum Infektionsort bzw. in infiziertes Gewebe (Mordue and Sibley, 2003). Dort sind Monozyten für anti-parasitäre Mechanismen verantwortlich; jedoch vor allem für die

Produktion der Zytokine IL-12 und TNF, um weitere Effektorzellen des angeborenen Immunsystems über eine T-Zell-vermittelte Immunantwort zu aktivieren (Dunay et al., 2010; Mordue and Sibley, 2003). Daher ist zu vermuten, dass die starke Reduktion von Monozyten zu einer inadäquaten und unvollständigen Immunantwort und so zu einem Proliferationsvorteil von *T. gondii* führt. Auch hier sollte zukünftig untersucht werden, ob die Proliferation oder die Migration von Monozyten blockiert ist oder eine Induktion von Apoptose zu einer Reduktion von Monozyten führt.

Im Gegensatz zu Granulozyten und Monozyten zeigten sich keine Unterschiede in den Zellpopulationen von Makrophagen in der Milz und in den inguinalen Lymphknoten in *Jak2fl/flxLysMcre* gegenüber den mitgeführten Kontrollgruppen (Abb. 4.47). Dennoch konnte festgestellt werden, dass im Verlauf der Infektion Makrophagen die Milz und die inguinalen Lymphknoten verlassen oder z.B. durch Apoptose dezimiert werden.

Zukünftig sollten die Populationen von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen innerhalb des Peritoneums analysiert werden. Da das Peritoneum nach einer intraperitonealen Injektion von *T. gondii* der erste Infektionsort ist, wird hier eine initiale Immunantwort durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten, inflammatorische Monozyten und DCs aufgebaut (Bliss et al., 2000; Dunay et al., 2008; Liu et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003). Weil durch die Studie von Abrams *et al.* zudem bewiesen wurde, dass vor allem die peritonealen Populationen von Makrophagen und Monozyten von einer Cre-vermittelten Deletion betroffen waren (Abram et al., 2014), könnten *Jak2fl/flxLysMcre* bereits zu Beginn der Infektion einen Defekt bei der Generierung der immunologischen Antwort besitzen.

Neben Granulozyten, Makrophagen und Monozyten gelten vor allem konventionelle DCs (cDCs) als Hauptproduzenten von IL-12 (Liu et al., 2006). DCs erkennen unter anderem über TLR-11 Profilin von *T. gondii* (Yarovinsky et al., 2005). DCs prozessieren aufgenommene Toxoplasmen und präsentieren den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems diese als Antigene über MHC-Komplexe in peripheren lymphatischen Organen (Yarovinsky et al., 2006). Bei der Analyse der Populationen von cDCs und pDCs (plasmozytoide DCs) im Verlauf der Infektion mit *T. gondii* konnte vor allem festgestellt werden, dass die Anzahl von cDCs der inguinalen Lymphknoten und die Anzahl von pDCs in der Milz in *Jak2fl/flxLysMcre* Tieren an Tag 7 deutlich reduziert war (Abb. 4.48). Dies ist besonders hervorzuheben, da auch pDCs im Verlauf einer *T. gondii* Infektion Antigen-präsentierende Eigenschaften zugesprochen werden und diese daher auch am Aufbau einer IL-12-vermittelten Immunantwort beteiligt sind (Yarovinsky et al., 2006). Aufgrund der reduzierten DC-Zellzahlen (cDCs: Lymphknoten Tag 7; pDCs: Milz Tag 7) wäre zu vermuten, dass *Jak2fl/flxLysMcre* Tiere einen Defekt der cDC-vermittelten als auch der pDC-vermittelten Abwehrmechanismen besitzen. Zudem konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten Funktionen von DCs unterstützen und so die T-Zell-vermittelte Antwort steigern (van Gisbergen et al., 2005a; van Gisbergen et al., 2005b). Da innerhalb dieser Dissertation bereits beschrieben wurde, dass die Milz und die inguinalen Lymphknoten weniger Granulozyten beinhalten, könnte dies möglicherweise durch eine fehlende Chemokinproduktion, mit einer verminderten Anzahl an cDCs oder pDCs in Verbindung stehen.

Durch die Sekretion von IL-12 und die Präsentation *T. gondii*-spezifischer Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ: DCs und Makrophagen) werden T-Zellen aktiviert (Guermontprez et al., 2002). Neben T-Zellen werden durch die Sekretion von IL-12

ebenfalls NK-Zellen aktiviert, welche durch die Produktion und Sekretion von IFN- $\gamma$  für die Induktion von anti-parasitären Mechanismen u.a. von Makrophagen verantwortlich sind (Gazzinelli et al., 1993). Trotz reduzierter Zellzahlen der als IL-12 Produzenten beschriebenen Monozyten, Granulozyten und DC's zeigten sich an Tag 7 nach der Infektion keine Unterschiede innerhalb der NK-Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten in Jak2fl/flxLysMcre Tieren gegenüber den Kontrollgruppen (s. Abb. 4.49). Daher sollten Jak2fl/flxLysMcre Tiere eine intakte NK-Zellantwort besitzen. Dennoch könnte eine Untersuchung der Populationen an Tag 3 auf mögliche Veränderungen in den NK-Zellpopulationen hindeuten. Es ist beschrieben, dass NK-Zell-vermittelte Immunantworten an Tag 3 nach der Infektion ihren Höhepunkt finden (Murphy et al., 2008).

Dagegen waren die Anzahl von T-Helfer-Zellen (CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD8+) in den inguinalen Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre an Tag 7 deutlich gegenüber den Kontrollgruppen (wt, Jak2fl/fl und LysMcre) reduziert (Abb. 4.51). Die Milz wies dagegen keine Veränderungen innerhalb der verschiedenen Genotypen auf. Wie bereits erläutert, werden T-Zellen vor allem durch DCs aktiviert; aber auch Makrophagen, Monozyten und Granulozyten tragen zu einer Generierung der T-Zell-vermittelten Antwort bei (Guermontprez et al., 2002). Durch die Präsentation von Antigenen durch DCs und das durch IL-12 geprägte Zytokinmilieu expandieren und proliferieren T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen (Yarovinsky et al., 2006). Weiterhin sind zytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen für die Produktion von IFN- $\gamma$  und damit für die Aktivierung von anti-parasitären Mechanismen – besonders in Makrophagen – verantwortlich (Gazzinelli et al., 1993; Gazzinelli et al., 1994). Somit deutet die verringerte Anzahl von zytotoxischen T-Zellen als auch von T-Helfer-Zellen auf einen Defekt von Jak2fl/flxLysMcre in dem Aufbau einer intakten Immunantwort hin.

Abschließend deutet die Analyse der B-Zellpopulationen auch auf eine schwächere humorale Antwort in den Milzen von Jak2fl/flxLysMcre Tieren hin. Im Gegensatz zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren, die im Verlauf der Infektion mit *T. gondii* keine Unterschiede in der Anzahl von B-Zellen zeigten, war bei diesen Tieren die Anzahl von B-Zellen an Tag 7 deutlich geringer (s. Abb. 4.52). B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung in Plasmazellen und sind für die Sezernierung von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern verantwortlich (Johnson and Sayles, 2002). Möglicherweise ist daher die Produktion von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern in Jak2fl/flxLysMcre Tieren verringert.

Zusammengefasst führen gestörte Jak2-vermittelte Signalmechanismen in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu Defekten der zellulären Immunantwort gegen *T. gondii*. Durch die Analyse der Zahlen von apoptotischen Zellen der einzelnen Zellpopulationen oder von spezifischen Aktivierungsmarkern sollte im Weiteren aufgeklärt werden, ob dies auf fehlende Zellproliferation oder auf eine Migration der Zellen in andere Organe zurückzuführen ist.

### 5.2.2 Manifestation der akuten Toxoplasmose

Durch eine makroskopische pathologische Beurteilung bestätigte sich der zuvor identifizierte Phänotyp von Jak2fl/flxLysMcre Tieren während der Infektion mit *T. gondii* (s. Abb. 4.41). Während an Tag 1 nach der Infektion noch keine pathologischen Veränderungen im Vergleich zu nicht infizierten Tieren zu erkennen waren, zeigten sich deutliche Symptome an Tag 7 nach der Infektion. Im Gegensatz zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren wiesen Jak2fl/flxLysMcre Tiere zu diesem Zeitpunkt eine visköse

Flüssigkeit (Aszites) innerhalb des Peritonealraumes auf (s. Abb. 4.41). Da wegen der *i.p.* Injektion der *T. gondii* Zysten die Peritonealhöhle den Infektionsort darstellt, deutet dies bereits auf einen Defekt in der frühen angeborenen Immunantwort in Jak2fl/flxLysMcre Tieren hin. So könnte ein Defekt von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen des Peritoneums bereits am Infektionsort die Proliferation von *T. gondii* begünstigen. Granulozyten, Monozyten und Makrophagen werden unter anderem durch IFN- $\gamma$  aktiviert (Nathan et al., 1983). Während der Immunantwort gegen *T. gondii* ist IFN- $\gamma$  das Schlüsselmolekül, um die anti-parasitären Mechanismen von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu aktivieren (Dupont et al., 2012; Yarovinsky, 2014). Zudem ist eingehend beschrieben, dass Jak2 essentiell für die IFNGR-vermittelte Signalweiterleitung ist (Neubauer et al., 1998; O'Shea et al., 2002; Parganas et al., 1998). Daher wäre ein Defekt in der Induktion der anti-parasitären Mechanismen bereits zu Beginn der Infektion vorstellbar. Anders als erwartet, zeigte jedoch die Analyse der RNI (reactive nitrogen species)-Konzentration überraschenderweise keine Abnahme im Serum von Jak2fl/flxLysMcre Tieren im Vergleich zu den Seren von wt, Jak2fl/fl oder LysMcre (s. Abb. 4.55). Durch die Bestimmung von RNI kann ebenfalls auf die gebildete Konzentration von anti-parasitären NO-Metaboliten geschlossen werden. NO (nitric oxide) wird vor allem in Makrophagen nach der Aktivierung von iNOS durch IFN- $\gamma$  induziert (Adams et al., 1990). Jedoch konnte ebenfalls beschrieben werden, dass NO durch TNF induziert wird (Chang et al., 1990). Auch ist eine Produktion von NO durch andere Zelltypen, wie Endothelzellen, während der Infektion mit *T. gondii* möglich (Zocrato et al., 2010). Infektionsstudien einer iNOS-defizienten Mauslinie mit *T. gondii* weisen darauf hin, dass iNOS-vermittelte anti-parasitäre Mechanismen nicht essentiell für das Überleben der Tiere sind (Silva et al., 2009). Durch IFN- $\gamma$  werden jedoch auch weitere anti-parasitäre Mechanismen induziert:

Einerseits sorgt die Induktion von GBPs (Guanylat-bindende Proteine) und IRGs (Immunity-related GTPases) für eine Disruption der PV-Membran von intrazellulären Toxoplasmen und daher zu einem fehlenden Schutz vor dem lysosomalen Abbau (Degrandi et al., 2007; Kravets et al., 2016). Diesbezüglich konnten Degrandi *et al.* beweisen, dass mGBP2-defiziente Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* besitzen (Degrandi et al., 2013).

Zusätzlich induziert IFN- $\gamma$  IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), welche über den Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin das Wachstum von *T. gondii* inhibiert (Pfefferkorn, 1984; Sibley et al., 1994).

Neben Makrophagen besitzen neutrophile Granulozyten ebenfalls anti-parasitäre Mechanismen. Essentiell für die Eliminierung von Pathogenen ist die Sekretion von anti-mikrobiellen Peptiden, vor allem aber die Bildung von NETs (Neutrophil-Extracellular-Traps) (Abi Abdallah et al., 2012; Egan et al., 2008; Konishi and Nakao, 1992). Nach der Aktivierung von Granulozyten werden gezielt NETs entlassen, die aus einer Chromatin-Matrix und verknüpften anti-mikrobiellen Peptiden bestehen. Das „Einfangen“ der Toxoplasmen über die Chromatin-Matrix und deren anschließende Lyse werden als NETose bezeichnet (Amulic et al., 2012; Brinkmann et al., 2004). Ein vollständiger Mangel dieser anti-parasitären Mechanismen, hervorgerufen durch einen Knockout von Jak2 in Granulozyten, Makrophagen und Monozyten, könnte möglicherweise zu einer erhöhten Proliferation von *T. gondii* in diesen Effektorzellen selbst führen. Daher kann eine Ausbreitung von *T. gondii* innerhalb von Jak2fl/flxLysMcre Tieren nicht verhindert werden. Hierauf deutet außerdem hin, dass die Milz, die Leber, die Lunge und das Gehirn von Jak2fl/flxLysMcre Tieren eine drastisch erhöhte Last der Parasiten an Tag 7 nach der Infektion im Vergleich zu wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren aufweisen (s. Abb. 5.53). Die

rasche Verbreitung und Proliferation der Parasiten verdeutlicht die Suszeptibilität von Jak2fl/flxLysMcre Tieren gegenüber einer Infektion mit *T. gondii*. Zugleich waren die Milzen von Jak2fl/flxLysMcre Tieren an Tag 7 deutlich kleiner, zeigten eine geringere Anzahl von Zellen und – wie eine histologische Untersuchung ergab – eine verminderte Anzahl Lymphozyten-infiltrierter Areale (s. Abb. 4.42, Abb. 4.44, Abb. 4.58). Dies deutet auf eine verminderte Sekretion von IL-12 und TNF durch Monozyten und Makrophagen sowie eine damit assoziierte inadäquate Aktivierung von Effektorzellen des adaptiven Immunsystems hin. Jedoch konnte durch die Analyse der verschiedenen Zytokine im Serum nachgewiesen werden, dass in Jak2fl/flxLysMcre Tieren sowohl die Konzentration von TNF als auch von IFN- $\gamma$  deutlich erhöht war (Abb. 4.54). Zusätzlich konnte ein erhöhter Spiegel des Chemokins CXCL-10 nachgewiesen werden, welches nach einer Aktivierung durch IFN- $\gamma$  sezerniert wird, um T-Zellen zu rekrutieren (Dufour et al., 2002). Somit besitzen Jak2fl/flxLysMcre Tiere vermutlich nicht nur einen Defekt in der Aktivierung von anti-parasitären Mechanismen der Effektorzellen, sondern auch eine Überproduktion von Zytokinen, die auch als „Zytokinsturm“ bezeichnet wird. Es ist beschrieben, dass eine IFN- $\gamma$ - und TNF-Überproduktion oft mit einer verminderten Sekretion des Zytokins IL-10 einhergeht (Dogruman-Al et al., 2011). Daher wäre eine Analyse von IL-10 im Serum von Jak2fl/flxLysMcre Tieren sinnvoll. So weist auch die Leber von Jak2fl/flxLysMcre Tieren deutliche Veränderungen gegenüber wt, Jak2fl/fl und LysMcre Tieren an Tag 7 nach der Infektion auf (s. Abb. 4.57). Neben einem geringeren Gewicht ist eine große Anzahl hämorrhagischer Areale zu erkennen, welche auf eine beginnende Schädigung der Leber hinweisen. Ursache hierfür ist vermutlich eine massive Ausschüttung von Zytokinen. Auch die entstandene Peritonitis sowie die damit assoziierte Ablagerung von Fibrin und die Vergrößerung der Peyer'schen Plaques deuten auf eine zusätzliche pro-inflammatorische Überreaktion des Immunsystems hin. Zusätzlich konnte bereits an Tag 7 eine beginnende Enzephalitis in Jak2fl/flxLysMcre Tieren festgestellt werden (s. Abb. 4.56). Eine durch *T. gondii* verursachte Enzephalitis wird durch einen Einstrom von CD4+ T-Zellen in das infizierte Gehirn vermittelt (Israelski et al., 1989). Möglicherweise wird die verringerte Anzahl an CD4+ T-Zellen in den Lymphknoten von Jak2fl/flxLysMcre Tieren dadurch verursacht, dass durch eine erhöhte Parasitenlast eine verstärkte Migration dieser Zellen in das Gehirn induziert wird.

Im Gegensatz zu Jak2fl/flxLysMcre Tieren zeigten IFN- $\gamma$ -defiziente Tiere nach einer *T. gondii* Infektion keine erhöhte Inflammation (Huang et al., 1993). Folglich deutet die festgestellte Überreaktion des Immunsystems in Jak2fl/flxLysMcre Tieren darauf hin, dass nicht nur IFNGR-Jak2-medierte Signalmechanismen essentielle Funktionen von Jak2 während der Immunantwort gegen *T. gondii* darstellen.

### 5.3 Ausblick

Innerhalb des ersten Teilprojektes zur Analyse des programmierten Zelltods konnte eine direkte protektive Funktion von Jak2 während der Todesrezeptor-induzierten Apoptose identifiziert werden. Dabei belegten durchgeführte Lokalisationsstudien, dass Jak2 nach Todesrezeptor-Stimulation in den Nukleus transloziert, während es zu Teilen jedoch auch im Zytosol und an der Membran verbleibt.

Daran anknüpfend sollte zukünftig aufgeklärt werden, mit welchen Faktoren Jak2 in den jeweiligen Kompartimenten der Zelle interagiert. Hierbei könnte eine „Pull-down“-Analyse der einzelnen zellulären Fraktionen von Vorteil sein. Dabei sollte ein His-Tag tragendes

Jak2 und dessen Transfektion in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs die Grundlage bilden. Nach Stimulation der MEFs mit FasL, TRAIL oder TNF sollten die einzelnen Fraktionen (Membran, Zytosol, Nukleus) hergestellt und über eine Ni-NTA-Säule (Nickel-Nitrilotriessigsäure-Säule) aufgereinigt werden. Mögliche Interaktionspartner könnten so mittels einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Alternativ wäre eine Ko-Immunpräzipitation von endogenem Jak2 innerhalb der einzelnen zellulären Fraktionen nach Todesrezeptor-Stimulation sinnvoll. Die präzipitierte Fraktion der Membran sollte mit besonderem Fokus auf die Komponenten des DISC analysiert werden. Innerhalb der zytosolischen Fraktion wäre eine Interaktion von Jak2 mit dem Komplex II möglich, der ebenfalls durch die Aktivierung von Todesrezeptoren induziert wird (Micheau and Tschoop, 2003). Schließlich sollte die Nukleus-Fraktion auf eine Interaktion von Jak2 mit Transkriptionsfaktoren oder Histonen untersucht werden. Eine genauere Analyse könnte zudem eine Chromatin-Immunpräzipitation bieten. Hierbei könnte nicht nur aufgeklärt werden, ob Jak2 Histone modifiziert, sondern auch Gene identifiziert werden, die durch nukleäres Jak2 direkt reguliert werden. Dabei sollte sich die Untersuchung auf Gene konzentrieren, die für anti-apoptotische Faktoren kodieren. Ein genauer Überblick darüber, welche Gene während des Todesrezeptor-induzierten Signalweges durch Jak2 reguliert werden, könnte durch die RNA-Seq Methode gewonnen werden. Durch RNA-Seq (auch „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ genannt) wird in einem Hochdurchsatzverfahren die gesamte gebildete mRNA analysiert (Morin et al., 2008). Zusätzlich sollte aufgeklärt werden, ob die nukleäre Funktion von Jak2 von der Kinase-Domäne abhängig ist. So würde die Analyse der aktivierenden Phosphorylierung der Tyrosine 1007/1008 innerhalb der nukleären Fraktion nach Apoptose-Induktion darüber Aufschluss geben.

Ein zweites Projekt sollte den Einfluss von Jak2 auf die Mitochondrien untersuchen. Hierbei wäre es zielführend, verschiedene mitochondriale Funktionen zu erforschen. Neben der Untersuchung von Faktoren, die an der Fissions- und Fusionsmaschinerie beteiligt sind oder anderen mitochondrialen Mechanismen wie der Mitophagy, sollte hier der Metabolismus der Mitochondrien im Vordergrund stehen. Eine Analyse von Jak2-defizienten MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs mittels „Seahorse-Analyzer“ könnte direkte Aufschlüsse über den Sauerstoff-Verbrauch, Glykolyse, ATP-Synthese und die respiratorische Kapazität der Zellen geben (Wu et al., 2007). Hierbei könnte eine zusätzliche Stimulation oder Veränderung der äußeren Bedingungen über mögliche Auswirkungen z.B. während der Apoptose aufklären. Auch wäre eine Analyse der hyperfusionierten Mitochondrien mittels Elektronenmikroskopie erwägenswert, um die Ultrastrukturen der einzelnen Mitochondrien innerhalb dieser Morphologie verstehen zu können.

Innerhalb des zweiten Teilprojektes zur Aufklärung der Funktion von Jak2 in Granulozyten, Makrophagen und Monozyten während einer Infektion mit *T. gondii*, sollten vor allem die Zellpopulationen innerhalb des Peritoneums an Tag 7 untersucht werden. So deutet die Studie von Abram *et al.* darauf hin, dass vor allem die Makrophagen und Monozyten, aber auch die neutrophilen Granulozyten des Peritoneums, von einem LysMcre-vermittelten Knockout betroffen sind (Abram et al., 2014). Zusätzlich sollte die visköse Peritonealflüssigkeit (Aszites) der Jak2<sup>fl/fl</sup>LysMcre Tiere genauer untersucht werden. Die Bestimmung der Konzentration von pro-inflammatorischen aber auch anti-inflammatorischen Zytokinen könnte hier weitere Hinweise auf Entzündungsreaktionen durch einen Zytokinsturm geben. Um aufzuklären, ob Jak2-defiziente Makrophagen und

Granulozyten anti-parasitäre Eigenschaften verloren haben, sollten Peritoneal-Makrophagen vor allem auf die Expression von mGBPs (qRT-PCR oder Western-Blot) und Granulozyten auf die Bildung von NETs untersucht werden (z.B. durch Visualisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie).

## 6 Zusammenfassung

Die Janus Kinase 2 (Jak2) ist eine Tyrosinkinase, die an zytoplasmatische Domänen von verschiedenen Zytokin-Rezeptoren bindet. Aufgrund dessen sind Jak2-vermittelte Signale während der Entwicklung, der Homöostase, der Differenzierung von Zellen sowie bei der Immunabwehr essentiell. Seit eine konstitutiv aktive Form von Jak2, Jak2V617F, mit der Entstehung von myeloproliferativen Neoplasien (MPN) in Verbindung gebracht wird, ist die Aufklärung von Jak2-vermittelten Zelltod-protaktiven Mechanismen von großem Interesse.

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmalig demonstriert werden, dass Jak2 eine essentielle anti-apoptotische Funktion während der durch Todesrezeptoren-induzierten (Fas, TNFR1, DR4/5) Apoptose besitzt. Die Aufhebung dieser anti-apoptotischen Funktion durch einen Knockout oder eine Inhibition von Jak2 führte in murinen und humanen Zellsystemen zu einer massiven Induktion von Initiator- und Effektor-Caspasen und schließlich zu einer erhöhten Apoptoserate nach FasL, TRAIL und TNF Stimulation. Weiterhin konnte aufgeklärt werden, dass Jak2 während der Fas-induzierten Apoptose (unabhängig von der Kinase- und Pseudokinase-Domäne) in den Nukleus transloziert. Außerdem wurde beobachtet, dass die Expression von Bcl-2, c-FLIP und XIAP in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs nach Fas-Induktion deutlich reduziert ist, wohingegen aktives trankiertes Bid (tBid) signifikant erhöht vorliegt. Dies verdeutlicht, dass Jak2 für die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie von großer Bedeutung ist. Des Weiteren beeinflusst Jak2 die Morphologie und die Funktionalität der Mitochondrien. So konnte in Jak2<sup>-/-</sup> MEFs sowohl eine hyper-fusionierte Morphologie der Mitochondrien, als auch eine massive Depolarisation der inneren Mitochondrien-Membran und eine Akkumulation von mROS nach FasL-Stimulation identifiziert werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass Jak2 keine protektive Funktion nach der intrinsischen Apoptose-Induktion besitzt. Demnach werden Jak2-vermittelte anti-apoptotische Signale oberhalb des von Mitochondrien-medierten Apoptosewegs ausgeführt. Die protektive Funktion von Jak2 konnte in einem *in vivo* Modell bestätigt werden. So wies die Leber von Tieren mit einem konditionalen Knockout von Jak2 in Hepatozyten (L-Jak2KO) eine große Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf. Dies bestätigend waren isolierte L-Jak2KO-Hepatozyten gegenüber einer FasL-Stimulation hochsuszeptibel.

Der zweite Teil dieser Dissertation beschreibt zum ersten Mal den Phänotyp des konditionalen Knockouts von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Jak2<sup>fl/fl</sup>LysM<sup>cre</sup>) während einer Infektion mit *T. gondii*. Es konnte nachgewiesen werden, dass Jak2-vermittelte Signale in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen während einer Infektion mit *T. gondii* eine essentielle Funktion in der Immunabwehr gegen *T. gondii* erfüllen. So wurden in der Milz, der Lunge, der Leber und dem Gehirn von Jak2<sup>fl/fl</sup>LysM<sup>cre</sup> Tieren große Mengen an Parasiten gefunden und Jak2<sup>fl/fl</sup>LysM<sup>cre</sup> Tiere verstarben in der akuten Phase der Toxoplasmose. Hervorzuheben ist, dass ein Knockout von Jak2 in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen nicht zu einer verminderten pro-inflammatorischen Antwort führte, sondern die betroffenen Tiere hohe Konzentrationen von TNF und IFN- $\gamma$  im Serum und eine beginnende Enzephalitis, Schädigung der Leber und eine Peritonitis aufwiesen. Deutlich verminderte Populationen von Granulozyten, Monozyten, cDCs, zytotoxischen T-Zellen sowie T-Helfer-Zellen in den drainierenden Lymphknoten und eine geringere Anzahl von Granulozyten, Monozyten und pDCs in der Milz lassen darauf schließen, dass Jak2<sup>fl/fl</sup>LysM<sup>cre</sup> Tiere im Verlauf der Infektion eine deregulierte Immunantwort besitzen.

## 7 Summary

The Janus kinase 2 (Jak2) is a tyrosine kinase, which binds to cytoplasmic domains of multiple cytokine receptors. Therefore, Jak2-mediated signalling is crucial for development, homeostasis, cell differentiation and host defence. Since a constitutively active form of Jak2, Jak2V617F, is correlated with generation of myeloproliferative neoplasia (MPN), Jak2-mediated survival signalling is of growing scientific interest.

The present thesis demonstrates for the first time, that Jak2 mediates an important anti-apoptotic function during death receptor (Fas, TNFR1 and DR4/5) induced apoptosis. Deficiency of Jak2 in murine and human cells or blocking Jak2 signalling in human cells leads to a massive induction of initiator and effector caspases and results in elevated apoptosis after FasL, TNF and TRAIL stimulation. Furthermore, Jak2 translocated into the nucleus (independently of the kinase and pseudokinase domain) during Fas-induced apoptosis. In addition it was elucidated, that the expression of Bcl-2, c-FLIP and XIAP were clearly decreased, whereas the active truncated form of Bid (tBid) was significantly increased. This illustrates, the importance of Jak2 for balancing pro- and anti- apoptotic factors. Furthermore, Jak2 shapes mitochondrial morphology and influences mitochondrial function. Moreover, Jak2<sup>-/-</sup> MEFs showed a hyperfused morphology of mitochondria, massive depolarization of the inner mitochondrial membrane, and accumulation of mROS was identified after FasL treatment. Interestingly, an anti-apoptotic function of Jak2 during intrinsic apoptosis was not observed. Accordingly Jak2 executes anti-apoptotic signals upstream of mitochondrial apoptosis signalling. Also it was demonstrated that Jak2 is essential for survival signalling *in vivo*. Investigations of the livers of L-Jak2KO mice (conditional knockout of Jak2 in hepatocytes) showed increased numbers of TUNEL positive cells. Reconfirmingly, isolated primary L-Jak2KO hepatocytes were susceptible towards Fas-induced apoptosis.

The second part of the thesis characterises a novel phenotype of a conditional Jak2-knockout in granulocytes, monocytes and macrophages (Jak2fl/flxLysMcre mouse line) during *T. gondii* infection. It was demonstrated, that Jak2 signalling within granulocytes, monocytes and macrophages is important for parasite control. Jak2fl/flxLysMcre mice possessed higher parasite loads in spleens, livers, lungs and brains and rapidly succumbed during the acute phase of infection. In the sera of Jak2fl/flxLysMcre mice the levels of TNF and IFN- $\gamma$  were clearly increased, which was contrary to expectations of a reduced inflammatory response. Furthermore Jak2fl/flxLysMcre mice exhibited *T. gondii* induced encephalitis, liver damage and peritonitis. Together with reduced numbers of granulocytes, monocytes, cDCs, cytotoxic T cells and T helper cells in lymph nodes and diminished populations of granulocytes, monocytes and pDCs in spleens these findings indicate a profoundly deregulated immune response in Jak2fl/flxLysMcre mice.

## 8 Literaturverzeichnis

Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.

Abi Abdallah, D.S., Lin, C., Ball, C.J., King, M.R., Duhamel, G.E., and Denkers, E.Y. (2012). *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 80, 768-777.

Abram, C.L., Roberge, G.L., Hu, Y., and Lowell, C.A. (2014). Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods* 408, 89-100.

Adams, L.B., Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., and Krahenbuhl, J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of immunology* 144, 2725-2729.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30, 459-489.

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.

Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., and Carter-Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237-244.

Baffert, F., Regnier, C.H., De Pover, A., Pissot-Soldermann, C., Tavares, G.A., Blasco, F., Brueggen, J., Chene, P., Drueckes, P., Erdmann, D., *et al.* (2010). Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. *Mol Cancer Ther* 9, 1945-1955.

Bai, X., Williams, J.L., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Aplin, J.D., and Crocker, I.P. (2009). A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta* 30, 855-860.

Barclay, J.L., Nelson, C.N., Ishikawa, M., Murray, L.A., Kerr, L.M., McPhee, T.R., Powell, E.E., and Waters, M.J. (2011). GH-dependent STAT5 signaling plays an important role in hepatic lipid metabolism. *Endocrinology* 152, 181-192.

Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., *et al.* (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061.

- Beg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P.V., and Baldwin, A.S., Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and cellular biology* 13, 3301-3310.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., and Denkers, E.Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *Journal of immunology* 171, 6052-6058.
- Benz, R., and McLaughlin, S. (1983). The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophys J* 41, 381-398.
- Bhardwaj, A., and Aggarwal, B.B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23, 317-332.
- Black, R.A., Kronheim, S.R., and Sleath, P.R. (1989). Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett* 247, 386-390.
- Bliss, S.K., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2000). Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *Journal of immunology* 165, 4515-4521.
- Bliss, S.K., Gavrilescu, L.C., Alcaraz, A., and Denkers, E.Y. (2001). Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* 69, 4898-4905.
- Bliss, S.K., Zhang, Y., and Denkers, E.Y. (1999). Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *Journal of immunology* 163, 2081-2088.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* 11, 529-541.
- Boya, P., Cohen, I., Zamzami, N., Vieira, H.L., and Kroemer, G. (2002). Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell death and differentiation* 9, 465-467.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434-6451.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.
- Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* 15, 362-374.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.

Brooks, A.J., Dai, W., O'Mara, M.L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R.A., Gardon, O., Tunny, K.A., Blucher, K.M., Morton, C.J., *et al.* (2014). Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344, 1249783.

Bunting, J.R. (1992). Influx and efflux kinetics of cationic dye binding to respiring mitochondria. *Biophys Chem* 42, 163-175.

Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., and Boothroyd, J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27, 1787-1792.

Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., *et al.* (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23, 1514-1521.

Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.

Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., and *et al.* (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.

Cervantes, F., Mesa, R., and Harrison, C. (2013). JAK inhibitors: beyond spleen and symptoms? *Haematologica* 98, 160-162.

Chan, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 79-99.

Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal* 21, 3704-3714.

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.

Chapman, R.S., Duff, E.K., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Clarke, A.R., and Watson, C.J. (2000). A novel role for IRF-1 as a suppressor of apoptosis. *Oncogene* 19, 6386-6391.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.

- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* **8**, 705-711.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20327-20332.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **18**, 157-164.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2008). Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**, 10-27.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15927-15932.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265-277.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO journal* **21**, 1616-1627.
- Cui, Y., Hosui, A., Sun, R., Shen, K., Gavrilova, O., Chen, W., Cam, M.C., Gao, B., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2007). Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology* **46**, 504-513.
- Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* **461**, 819-822.
- De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435-492.
- Deak, J.C., Cross, J.V., Lewis, M., Qian, Y., Parrott, L.A., Distelhorst, C.W., and Templeton, D.J. (1998). Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5595-5600.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., *et al.* (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* **179**, 1129-1137.

Deckert-Schluter, M., Bluethmann, H., Rang, A., Hof, H., and Schluter, D. (1998). Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *Journal of immunology* *160*, 3427-3436.

Deckert-Schluter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O.D., Hof, H., and Schluter, 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., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., and Pfeffer, K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *Journal of immunology* *179*, 7729-7740.

Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2013). Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 294-299.

Denkers, E.Y., Butcher, B.A., Del Rio, L., and Bennouna, S. (2004). Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* *34*, 411-421.

Denkers, E.Y., Bzik, D.J., Fox, B.A., and Butcher, B.A. (2012a). An inside job: hacking into Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling cascades by the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* *80*, 476-482.

Denkers, E.Y., Schneider, A.G., Cohen, S.B., and Butcher, B.A. (2012b). Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge. *PLoS Pathog* *8*, e1002794.

Denkers, E.Y., Yap, G., Scharon-Kersten, T., Charest, H., Butcher, B.A., Caspar, P., Heiny, S., and Sher, A. (1997). Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* *159*, 1903-1908.

Derouin, F., Pelloux, H., and Parasitology, E.S.G.o.C. (2008). Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect* *14*, 1089-1101.

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* *13*, 239-252.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal* *17*, 2215-2223.

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* *388*, 300-304.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* *27*, 6245-6251.

- Dogruman-AI, F., Fidan, I., Celebi, B., Yesilyurt, E., Erdal, B., Babur, C., and Kustimur, S. (2011). Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pac J Trop Med* 4, 16-19.
- Dubey, J.P. (1997a). Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 83, 755-757.
- Dubey, J.P. (1997b). Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology* 115 ( Pt 1), 15-20.
- Dubey, J.P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55, 467-475.
- Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press.
- Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* 19, 155-177.
- 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.
- Dufour, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., and Luster, A.D. (2002). IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of immunology* 168, 3195-3204.
- Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306-317.
- Dunay, I.R., Fuchs, A., and Sibley, L.D. (2010). Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* 78, 1564-1570.
- Dupont, C.D., Christian, D.A., and Hunter, C.A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol* 34, 793-813.
- Earnshaw, W.C. (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387, 389.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *The Journal of biological chemistry* 281, 3254-3260.
- Egan, C.E., Sukhumavasi, W., Bierly, A.L., and Denkers, E.Y. (2008). Understanding the multiple functions of Gr-1(+) cell subpopulations during microbial infection. *Immunol Res* 40, 35-48.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H., and Lazebnik, Y. (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *The EMBO journal* 16, 2271-2281.

Fan, Y., Lee, T.V., Xu, D., Chen, Z., Lamblin, A.F., Steller, H., and Bergmann, A. (2010). Dual roles of Drosophila p53 in cell death and cell differentiation. *Cell death and differentiation* 17, 912-921.

Fan, Y., Menon, R.K., Cohen, P., Hwang, D., Clemens, T., DiGirolamo, D.J., Kopchick, J.J., Le Roith, D., Trucco, M., and Sperling, M.A. (2009). Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 284, 19937-19944.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330-349.

Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M., and Ihle, J.N. (1997). Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Molecular and cellular biology* 17, 2497-2501.

Feustel, S.M., Meissner, M., and Liesenfeld, O. (2012). Toxoplasma gondii and the blood-brain barrier. *Virulence* 3, 182-192.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719-7730.

Filippakopoulos, P., Muller, S., and Knapp, S. (2009). SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol* 19, 643-649.

Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* 10, 76-100.

Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.

Fox, B.A., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2004). Toxoplasma gondii lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol* 34, 323-331.

Frank, S.J., Gilliland, G., Kraft, A.S., and Arnold, C.S. (1994). Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* 135, 2228-2239.

- Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. *J Infect Dis* 122, 553-559.
- Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K., and Hirano, T. (1997). An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14, 751-761.
- Galle, P.R., Hofmann, W.J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P.H., and Runkel, L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *The Journal of experimental medicine* 182, 1223-1230.
- Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 780-788.
- Ganten, D., and Ruckpaul, K. (2008). *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer 3. Auflage.
- Garcia-Saez, A.J. (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell death and differentiation* 19, 1733-1740.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
- Gavrilescu, L.C., and Denkers, E.Y. (2003). Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 71, 2577-2583.
- Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6115-6119.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 153, 2533-2543.
- Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322.
- Giordano, V., De Falco, G., Chiari, R., Quinto, I., Pelicci, P.G., Bartholomew, L., Delmastro, P., Gadina, M., and Scala, G. (1997). Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *Journal of immunology* 158, 4097-4103.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 14507-14513.

Grohmann, U., Belladonna, M.L., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2001). Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. *Journal of immunology* 167, 221-227.

Gu, H., Zou, Y.R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-1164.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2005). Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 54, 1024-1033.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* 15, 2760-2770.

Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I., and Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 19, 2286-2295.

Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.

Hammaren, H.M., Ungureanu, D., Grisouard, J., Skoda, R.C., Hubbard, S.R., and Silvennoinen, O. (2015). ATP binding to the pseudokinase domain of JAK2 is critical for pathogenic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 4642-4647.

Happo, L., Strasser, A., and Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *Journal of cell science* 125, 1081-1087.

Hart, S., Goh, K.C., Novotny-Diermayr, V., Hu, C.Y., Hentze, H., Tan, Y.C., Madan, B., Amalini, C., Loh, Y.K., Ong, L.C., *et al.* (2011). SB1518, a novel macrocyclic pyrimidine-based JAK2 inhibitor for the treatment of myeloid and lymphoid malignancies. *Leukemia* 25, 1751-1759.

Hauser, W.E., Jr., and Tsai, V. (1986). Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *Journal of immunology* 136, 313-319.

Havelaar, A.H., Kemmeren, J.M., and Kortbeek, L.M. (2007). Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 44, 1467-1474.

Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., and van der Bliek, A.M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 187, 959-966.

- Helmer, R.A., Panchoo, M., Dertien, J.S., Bhakta, S.M., Hewetson, A., and Chilton, B.S. (2010). Prolactin-induced Jak2 phosphorylation of RUSH: a key element in Jak/RUSH signaling. *Mol Cell Endocrinol* 325, 143-149.
- Hewetson, A., Hendrix, E.C., Mansharamani, M., Lee, V.H., and Chilton, B.S. (2002). Identification of the RUSH consensus-binding site by cyclic amplification and selection of targets: demonstration that RUSH mediates the ability of prolactin to augment progesterone-dependent gene expression. *Mol Endocrinol* 16, 2101-2112.
- Hewetson, A., Moore, S.L., and Chilton, B.S. (2004). Prolactin signals through RUSH/SMARCA3 in the absence of a physical association with Stat5a. *Biol Reprod* 71, 1907-1912.
- Higuchi, Y. (2003). Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 66, 1527-1535.
- Hilkens, C.M., Is'harc, H., Lillemeier, B.F., Strobl, B., Bates, P.A., Behrmann, I., and Kerr, I.M. (2001). A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505, 87-91.
- Hopman, R.K., Lawrence, S.J., and Oh, S.T. (2014). Disseminated tuberculosis associated with ruxolitinib. *Leukemia* 28, 1750-1751.
- 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.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., and Goeddel, D.V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259, 1742-1745.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10, 766-778.
- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., and Remington, J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 62, 2818-2824.

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.

Imada, K., and Leonard, W.J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Molecular immunology* 37, 1-11.

Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

Israelski, D.M., Araujo, F.G., Conley, F.K., Suzuki, Y., Sharma, S., and Remington, J.S. (1989). Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. *Journal of immunology* 142, 954-958.

Ito, M., Nakasato, M., Suzuki, T., Sakai, S., Nagata, M., and Aoki, F. (2004). Localization of janus kinase 2 to the nuclei of mature oocytes and early cleavage stage mouse embryos. *Biol Reprod* 71, 89-96.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148.

Janssen, O., Lengl-Janssen, B., Oberg, H.H., Robertson, M.J., and Kabelitz, D. (1996). Induction of cell death via Fas (CD95, Apo-1) may be associated with but is not dependent on Fas-induced tyrosine phosphorylation. *Immunol Lett* 49, 63-69.

Johansson, E.M., Kannius-Janson, M., Bjursell, G., and Nilsson, J. (2003). The p53 tumor suppressor gene is regulated in vivo by nuclear factor 1-C2 in the mouse mammary gland during pregnancy. *Oncogene* 22, 6061-6070.

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, J.L., and Dubey, J.P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 55, 845-851.

Jung, M.S., Jin, D.H., Chae, H.D., Kang, S., Kim, S.C., Bang, Y.J., Choi, T.S., Choi, K.S., and Shin, D.Y. (2004). Bcl-xL and E1B-19K proteins inhibit p53-induced irreversible growth arrest and senescence by preventing reactive oxygen species-dependent p38 activation. *The Journal of biological chemistry* 279, 17765-17771.

Kang, H., Remington, J.S., and Suzuki, Y. (2000). Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of immunology* 164, 2629-2634.

- Kantari, C., and Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 558-563.
- Kasahara, A., and Scorrano, L. (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol* 24, 761-770.
- Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10, 640-648.
- Kataoka, T., and Tschopp, J. (2004). N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 24, 2627-2636.
- Kaufmann, T., Strasser, A., and Jost, P.J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation* 19, 42-50.
- Keil, E., Finkenstadt, D., Wufka, C., Trilling, M., Liebfried, P., Strobl, B., Muller, M., and Pfeffer, K. (2014). Important scaffold function of the Janus kinase 2 uncovered by a novel mouse model harboring a Jak2 activation-loop mutation. *Blood* 123, 520-529.
- Kerr, J.F. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105, 13-20.
- Kerr, J.F. (1972). Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *J Pathol* 107, 217-219.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 62, 1639-1642.
- Khwaja, A., and Linch, D.C. (1994). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on neutrophil formation and function. *Curr Opin Hematol* 1, 216-220.
- Kim, K., and Weiss, L.M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34, 423-432.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 14, 5579-5588.
- Klingmuller, U., Bauer, A., Bohl, S., Nickel, P.J., Breitkopf, K., Dooley, S., Zellmer, S., Kern, C., Merfort, I., Sparna, T., *et al.* (2006). Primary mouse hepatocytes for systems

biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways. *Systems biology* 153, 433-447.

Knight, R.A., and Melino, G. (2011). Cell death in disease: from 2010 onwards. *Cell death & disease* 2, e202.

Kocob, A.J., and Duckett, C.S. (2015). Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. *FEBS J.*

Kohlhuber, F., Rogers, N.C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B.A., Kotenko, S.V., Pestka, S., Stark, G.R., *et al.* (1997). A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Molecular and cellular biology* 17, 695-706.

Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K., and Yagita, H. (2011). Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 43383-43393.

Konishi, E., and Nakao, M. (1992). Naturally occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 104 ( Pt 3), 427-432.

Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205, 869-882.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* 7, 1166-1173.

Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., and Schmidt, J.A. (1989). Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5227-5231.

Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T.O., Klumpers, V., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., and Pfeffer, K. (2016). Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *Elife* 5.

Krempler, A., Qi, Y., Triplett, A.A., Zhu, J., Rui, H., and Wagner, K.U. (2004). Generation of a conditional knockout allele for the Janus kinase 2 (Jak2) gene in mice. *Genesis* 40, 52-57.

Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J.J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P., and Wajant, H. (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166, 369-380.

- Krieghoff-Henning, E., and Hofmann, T.G. (2008). Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochimica et biophysica acta* 1783, 2185-2194.
- Kroemer, G., and Martin, S.J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-730.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 276, 20633-20640.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of immunology* 171, 4672-4679.
- LaFave, L.M., and Levine, R.L. (2012). JAK2 the future: therapeutic strategies for JAK-dependent malignancies. *Trends in pharmacological sciences* 33, 574-582.
- Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. *Journal of cell science* 118, 265-267.
- Lavrik, I.N., and Krammer, P.H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and differentiation* 19, 36-41.
- Lavrik, I.N., Mock, T., Golks, A., Hoffmann, J.C., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2008). CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *The Journal of biological chemistry* 283, 26401-26408.
- Leboucher, G.P., Tsai, Y.C., Yang, M., Shaw, K.C., Zhou, M., Veenstra, T.D., Glickman, M.H., and Weissman, A.M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular cell* 47, 547-557.
- Lee, D.W., Faubel, S., and Edelstein, C.L. (2015). A pan caspase inhibitor decreases caspase-1, IL-1alpha and IL-1beta, and protects against necrosis of cisplatin-treated freshly isolated proximal tubules. *Ren Fail* 37, 144-150.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
- Levine, P.H., McVerry, B.A., Attock, B., and Dormandy, K.M. (1977). Health of the intensively treated hemophiliac, with special reference to abnormal liver chemistries and splenomegaly. *Blood* 50, 1-9.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., *et al.* (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell* 7, 387-397.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Li, Z.Y., Manthey, C.L., Perera, P.Y., Sher, A., and Vogel, S.N. (1994). *Toxoplasma gondii* soluble antigen induces a subset of lipopolysaccharide-inducible genes and tyrosine phosphoproteins in peritoneal macrophages. *Infect Immun* 62, 3434-3440.

Liu, C.H., Fan, Y.T., Dias, A., Esper, L., Corn, R.A., Bafica, A., Machado, F.S., and Aliberti, J. (2006). Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of immunology* 177, 31-35.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.

Lobie, P.E., Ronsin, B., Silvennoinen, O., Haldosen, L.A., Norstedt, G., and Morel, G. (1996). Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2. *Endocrinology* 137, 4037-4045.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Luisetto, S., Pietrobon, D., and Azzone, G.F. (1987). Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry* 26, 7332-7338.

Lyons, R.E., McLeod, R., and Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 18, 198-201.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146, 3-15.

Malhi, H., Gores, G.J., and Lemasters, J.J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43, S31-44.

- 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.
- Martin-Villalba, A., Llorens-Bobadilla, E., and Wollny, D. (2013). CD95 in cancer: tool or target? *Trends Mol Med* 19, 329-335.
- Martinou, J.C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 21, 92-101.
- Masihi, K.N., and Werner, H. (1976). Rosette-forming cells during immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* 13, 1678-1683.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal* 16, 2794-2804.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 45162-45171.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci* 39, 101-111.
- Mordue, D.G., and Sibley, L.D. (2003). A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol* 74, 1015-1025.
- Morin, R., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., Pugh, T., McDonald, H., Varhol, R., Jones, S., and Marra, M. (2008). Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 45, 81-94.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry* 277, 34287-34294.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science 7, 9-10.
- Muschen, M., Warskulat, U., Douillard, P., Gilbert, E., and Haussinger, D. (1998). Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide

and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Hepatology* 27, 200-208.

Nagata, S. (1996). Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes Cells* 1, 873-879.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* 7, 683-694.

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine* 158, 670-689.

Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.

Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., and Eils, R. (2010). Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol* 6, 352.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.

Nilsson, J., Bjursell, G., and Kannius-Janson, M. (2006). Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 26, 5663-5674.

Nilsson, J., Helou, K., Kovacs, A., Bendahl, P.O., Bjursell, G., Ferno, M., Carlsson, P., and Kannius-Janson, M. (2010). Nuclear Janus-activated kinase 2/nuclear factor 1-C2 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition by repressing Forkhead box F1. *Cancer Res* 70, 2020-2029.

- Nosaka, T., van Deursen, J.M., Tripp, R.A., Thierfelder, W.E., Witthuhn, B.A., McMickle, A.P., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 270, 800-802.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237-3245.
- O'Shea, J.J., Gadina, M., and Schreiber, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl, S121-131.
- O'Shea, J.J., and Plenge, R. (2012). JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36, 542-550.
- O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., and Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual review of medicine* 66, 311-328.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., and et al. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *The Journal of biological chemistry* 267, 10709-10715.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809.
- Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S.P., Urashima, M., Schlossman, R.L., and Anderson, K.C. (1997). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *Journal of immunology* 159, 2212-2221.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-6865.
- Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 532-542.
- Ozturk, S., Schleich, K., and Lavrik, I.N. (2012). Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions. *Exp Cell Res* 318, 1324-1331.
- Paine, R., 3rd, Morris, S.B., Jin, H., Wilcoxon, S.E., Phare, S.M., Moore, B.B., Coffey, M.J., and Toews, G.B. (2001). Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1210-1218.
- 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.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., *et al.* (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.

Park, S.O., Wamsley, H.L., Bae, K., Hu, Z., Li, X., Choe, S.W., Slayton, W.B., Oh, S.P., Wagner, K.U., and Sayeski, P.P. (2013). Conditional deletion of Jak2 reveals an essential role in hematopoiesis throughout mouse ontogeny: implications for Jak2 inhibition in humans. *PloS one* 8, e59675.

Park, S.Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., and Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771-782.

Parrish, J.Z., and Xue, D. (2003). Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Molecular cell* 11, 987-996.

Pepper, M., Dzierszynski, F., Wilson, E., Tait, E., Fang, Q., Yarovinsky, F., Laufer, T.M., Roos, D., and Hunter, C.A. (2008). Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. *Journal of immunology* 180, 6229-6236.

Peter, M.E., Budd, R.C., Desbarats, J., Hedrick, S.M., Hueber, A.O., Newell, M.K., Owen, L.B., Pope, R.M., Tschopp, J., Wajant, H., *et al.* (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129, 447-450.

Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* 10, 26-35.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

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.

Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T., and Gerritsen, M.E. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *The Journal of biological chemistry* 272, 21096-21103.

Pieri, L., Paoli, C., Guglielmelli, P., Fjerza, R., Arena, U., Marra, F., Colagrande, S., Mori, F., Marchioli, R., Pioggiarella, R., *et al.* (2013). A Phase 2 Study Of Ruxolitinib In Patients With Splanchnic Vein Thrombosis Associated With Myeloproliferative Neoplasm. Preliminary Results. *Blood* 122, 1583 - 1583.

Pisitkun, P., Deane, J.A., Difilippantonio, M.J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A.B., and Bolland, S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312, 1669-1672.

- Piya, S., Moon, A.R., Song, P.I., Hiscott, J., Lin, R., Seol, D.W., and Kim, T.H. (2011). Suppression of IRF4 by IRF1, 3, and 7 in Noxa expression is a necessary event for IFN-gamma-mediated tumor elimination. *Mol Cancer Res* 9, 1356-1365.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., and Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 238-259.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., and Johnson, E.M., Jr. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899-914.
- Quelle, F.W., Sato, N., Witthuhn, B.A., Inhorn, R.C., Eder, M., Miyajima, A., Griffin, J.D., and Ihle, J.N. (1994). JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Molecular and cellular biology* 14, 4335-4341.
- Quentmeier, H., MacLeod, R.A., Zaborski, M., and Drexler, H.G. (2006). JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia* 20, 471-476.
- Rao, R.V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., Bredesen, D.E., and Ellerby, H.M. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 21836-21842.
- Rausch, O., and Marshall, C.J. (1997). Tyrosine 763 of the murine granulocyte colony-stimulating factor receptor mediates Ras-dependent activation of the JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology* 17, 1170-1179.
- Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445-455.
- Real, P.J., Cao, Y., Wang, R., Nikolovska-Coleska, Z., Sanz-Ortiz, J., Wang, S., and Fernandez-Luna, J.L. (2004). Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* 64, 7947-7953.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *The Journal of experimental medicine* 186, 1819-1829.
- Remington, J.S. (1970). Toxoplasmosis: recent developments. *Annual review of medicine* 21, 201-218.
- Rensing, L. (1972). Periodic geophysical and biological signals as Zeitgeber and exogenous inducers in animal organisms. *Int J Biometeorol* 16 *Suppl*, 113-125.
- Rhodes, M.M., Kopsombut, P., Bondurant, M.C., Price, J.O., and Koury, M.J. (2005). Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood* 106, 1857-1863.

Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413.

Rinaldi, C.R., Rinaldi, P., Alagia, A., Gemei, M., Esposito, N., Formiggini, F., Martinelli, V., Senyuk, V., Nucifora, G., and Pane, F. (2010). Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. *Blood* 116, 6023-6026.

Robinson, K.M., Janes, M.S., Pehar, M., Monette, J.S., Ross, M.F., Hagen, T.M., Murphy, M.P., and Beckman, J.S. (2006). Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15038-15043.

Rodig, S.J., Meraz, M.A., White, J.M., Lampe, P.A., Riley, J.K., Arthur, C.D., King, K.L., Sheehan, K.C., Yin, L., Pennica, D., *et al.* (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93, 373-383.

Rolland, S.G., and Conradt, B. (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Current opinion in cell biology* 22, 852-858.

Romieu-Mourez, R., Solis, M., Nardin, A., Goubau, D., Baron-Bodo, V., Lin, R., Massie, B., Salcedo, M., and Hiscott, J. (2006). Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer Res* 66, 10576-10585.

Rosner, D., Stoneman, V., Littlewood, T., McCarthy, N., Figg, N., Wang, Y., Tellides, G., and Bennett, M. (2006). Interferon-gamma induces Fas trafficking and sensitization to apoptosis in vascular smooth muscle cells via a PI3K- and Akt-dependent mechanism. *The American journal of pathology* 168, 2054-2063.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO journal* 16, 6914-6925.

Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J., and Mak, T.W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* 14, 854-862.

Sabin, A.B., and Feldman, H.A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108, 660-663.

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Samanta, A.K., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H., and Arlinghaus, R.B. (2006). Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 66, 6468-6472.

Samraj, A.K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 29652-29659.

- Sanceau, J., Hiscott, J., Delattre, O., and Wietzerbin, J. (2000). IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* 19, 3372-3383.
- Sanders, E.J., and Wride, M.A. (1995). Programmed cell death in development. *International review of cytology* 163, 105-173.
- Sattler, M., and Griffin, J.D. (2009). JAK2 gets histone H3 rolling. *Cancer cell* 16, 365-366.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Sayyah, J., Magis, A., Ostrov, D.A., Allan, R.W., Braylan, R.C., and Sayeski, P.P. (2008). Z3, a novel Jak2 tyrosine kinase small-molecule inhibitor that suppresses Jak2-mediated pathologic cell growth. *Mol Cancer Ther* 7, 2308-2318.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *The Journal of biological chemistry* 272, 26953-26958.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274, 1541-1548.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology* 168, 5997-6001.
- Scharton-Kersten, T., Caspar, P., Sher, A., and Denkers, E.Y. (1996a). *Toxoplasma gondii*: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 84, 102-114.
- Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (1996b). In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of immunology* 157, 4045-4054.
- Schmich, K., Schlatter, R., Corazza, N., Sa Ferreira, K., Ederer, M., Brunner, T., Borner, C., and Merfort, I. (2011). Tumor necrosis factor alpha sensitizes primary murine hepatocytes to Fas/CD95-induced apoptosis in a Bim- and Bid-dependent manner. *Hepatology* 53, 282-292.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 19, 621-626.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.

Schweichel, J.U., and Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.

Scorrano, L. (2013). Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *European journal of clinical investigation* 43, 886-893.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

Sedek, M., and Strous, G.J. (2013). SUMOylation is a regulator of the translocation of Jak2 between nucleus and cytosol. *Biochem J* 453, 231-239.

Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Molecular cell* 31, 570-585.

Sheridan, C., and Martin, S.J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 10, 640-648.

Shi, S.Y., Martin, R.G., Duncan, R.E., Choi, D., Lu, S.Y., Schroer, S.A., Cai, E.P., Luk, C.T., Hopperton, K.E., Domenichiello, A.F., *et al.* (2012). Hepatocyte-specific deletion of Janus kinase 2 (JAK2) protects against diet-induced steatohepatitis and glucose intolerance. *The Journal of biological chemistry* 287, 10277-10288.

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.

Siegel, M.R., and Sisler, H.D. (1963). Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* 200, 675-676.

Siegel, M.R., and Sisler, H.D. (1964). Site of Action of Cycloheximide in Cells of *Saccharomyces Pastorianus*. II. The Nature of Inhibition of Protein Synthesis in a Cell-Free System. *Biochimica et biophysica acta* 87, 83-89.

Siegmund, D., Wicovsky, A., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Kreuz, S., Leverkus, M., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., and Wajant, H. (2005). Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Molecular and cellular biology* 25, 6363-6379.

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.

- Slee, E.A., Zhu, H., Chow, S.C., MacFarlane, M., Nicholson, D.W., and Cohen, G.M. (1996). Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* 315 ( Pt 1), 21-24.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sommerfeld, A., Reinehr, R., and Haussinger, D. (2015). Free fatty acids shift insulin-induced hepatocyte proliferation towards CD95-dependent apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 290, 4398-4409.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.
- Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., and Dunn, A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5592-5596.
- Stark, G.R., and Darnell, J.E., Jr. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503-514.
- Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., *et al.* (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of biological chemistry* 273, 27084-27090.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal* 30, 3667-3683.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *The EMBO journal* 14, 6136-6147.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr., and Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943-945.
- Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R., and Cohen, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274, 5053-5060.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G.E. (1996). Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8413-8418.

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.

Tacke, F., Luedde, T., and Trautwein, C. (2009). Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clinical reviews in allergy & immunology* 36, 4-12.

Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621-632.

Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8395-8400.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *The Journal of biological chemistry* 273, 7787-7790.

Takehita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N., and Sugamura, K. (1997). STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* 6, 449-457.

Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B., and Schutze, S. (2011). Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *Eur J Cell Biol* 90, 467-475.

Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18, 1176-1199.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thomis, D.C., Gurniak, C.B., Tivol, E., Sharpe, A.H., and Berg, L.J. (1995). Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 270, 794-797.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., and et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 2, 575-579.

- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., *et al.* (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO journal* 28, 1589-1600.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
- Trambas, C.M., and Griffiths, G.M. (2003). Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 4, 399-403.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Trump, B.F., Berezesky, I.K., Chang, S.H., and Phelps, P.C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 25, 82-88.
- Tsukamoto, A., and Kaneko, Y. (1993). Thapsigargin, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, depletes the intracellular Ca<sup>2+</sup> pool and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Cell Biol Int* 17, 969-970.
- Ueffing, N., Keil, E., Freund, C., Kuhne, R., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2008). Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell death and differentiation* 15, 773-782.
- Uozumi, K., Otsuka, M., Ohno, N., Moriyama, T., Suzuki, S., Shimotakahara, S., Matsumura, I., Hanada, S., and Arima, T. (2000). Establishment and characterization of a new human megakaryoblastic cell line (SET-2) that spontaneously matures to megakaryocytes and produces platelet-like particles. *Leukemia* 14, 142-152.
- Vakil, E., and Tefferi, A. (2011). BCR-ABL1--negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11 Suppl 1, S37-45.
- van de Laar, L., Coffey, P.J., and Woltman, A.M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119, 3383-3393.
- van Gisbergen, K.P., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005a). Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 26, 626-631.
- van Gisbergen, K.P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005b). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* 201, 1281-1292.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., and Festjens, N. (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE* 2006, pe44.

Vannucchi, A.M., Kiladjan, J.J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., *et al.* (2015). Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med* 372, 426-435.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.

Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J. (2006). Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Molecular cell* 21, 701-710.

Villarino, A.V., Kanno, Y., Ferdinand, J.R., and O'Shea, J.J. (2015). Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *Journal of immunology* 194, 21-27.

Vince, J.E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P.D., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Davidson, A.J., Callus, B.A., Wong, W.W., Gentle, I.E., *et al.* (2009). TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\kappa$ b and to prevent tnf-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 35906-35915.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.

Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem* 39, 53-71.

Wang, Y., and Levy, D.E. (2012). Comparative evolutionary genomics of the STAT family of transcription factors. *JAKSTAT* 1, 23-33.

Ware, C.F. (2003). The TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 181-184.

Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177, 439-450.

Watling, D., Guschin, D., Muller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N., and *et al.* (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 366, 166-170.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.

Wilson, G.S., Tian, A., Hebbard, L., Duan, W., George, J., Li, X., and Qiao, L. (2013). Tumoricidal effects of the JAK inhibitor Ruxolitinib (INC424) on hepatocellular carcinoma in vitro. *Cancer letters* 341, 224-230.

Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., and Ihle, J.N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74, 227-236.

- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., *et al.* (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-819.
- Wood, D.E., and Newcomb, E.W. (1999). Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274, 8309-8315.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., *et al.* (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C125-136.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Kim, Y.S., Pan, N., Ong, W.Y., Liu, Z.G., Ong, C.N., and Shen, H.M. (2008). Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy* 4, 457-466.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Ong, C.N., and Shen, H.M. (2009). Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy. *Autophagy* 5, 824-834.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Sun, X.J., Zhu, X., and Shen, H.M. (2011). zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF $\alpha$  mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway. *Cell death and differentiation* 18, 26-37.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7324-7329.
- Yamamoto, K., Shibata, F., Miura, O., Kamiyama, R., Hirose, S., and Miyasaka, N. (1999). Physical interaction between interleukin-12 receptor  $\beta$ 2 subunit and Jak2 tyrosine kinase: Jak2 associates with cytoplasmic membrane-proximal region of interleukin-12 receptor  $\beta$ 2 via amino-terminus. *Biochemical and biophysical research communications* 257, 400-404.
- Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V.E., 3rd, Silvennoinen, O., and O'Shea, J.J. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome biology* 5, 253.
- Yap, G.S., Scharon-Kersten, T., Charest, H., and Sher, A. (1998). Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *Journal of immunology* 160, 1340-1345.
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 14, 109-121.
- Yarovinsky, F., Kanzler, H., Hieny, S., Coffman, R.L., and Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4<sup>+</sup> T cell response. *Immunity* 25, 655-664.

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.

Yeung, P.L., Chen, L.Y., Tsai, S.C., Zhang, A., and Chen, J.D. (2008). Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin alpha3. *J Cell Biochem* *103*, 456-470.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* *400*, 886-891.

Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine* *169*, 1747-1756.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 47-59.

Youlyouz-Marfak, I., Gachard, N., Le Cloennec, C., Najjar, I., Baran-Marszak, F., Reminieras, L., May, E., Bornkamm, G.W., Fagard, R., and Feuillard, J. (2008). Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell death and differentiation* *15*, 376-385.

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular cell* *7*, 673-682.

Yuan, J., and Horvitz, H.R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* *116*, 309-320.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* *75*, 641-652.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine* *182*, 367-377.

Zeiss, C.J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* *40*, 481-495.

Zhong, J., Yang, P., Muta, K., Dong, R., Marrero, M., Gong, F., and Wang, C.Y. (2010). Loss of Jak2 selectively suppresses DC-mediated innate immune response and protects mice from lethal dose of LPS-induced septic shock. *PloS one* *5*, e9593.

Zhou, Y.J., Chen, M., Cusack, N.A., Kimmel, L.H., Magnuson, K.S., Boyd, J.G., Lin, W., Roberts, J.L., Lengi, A., Buckley, R.H., *et al.* (2001). Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Molecular cell* *8*, 959-969.

Zocrato, L.B., Capettini, L.S., Rezende, B.A., Silva, J.F., Rodrigues-Machado Mda, G., Cortes, S.F., and Lemos, V.S. (2010). Increased expression of endothelial iNOS accounts for hyporesponsiveness of pulmonary artery to vasoconstrictors after paraquat poisoning. *Toxicol In Vitro* 24, 1019-1025.



## 9 Anhang

### 9.1 Publikationen

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Liebfried P, Finkenstädt D, Wagner KU, Reichert AS, Bode JG, Pfeffer K, Keil E: Janus kinase 2 antagonizes death receptor induced apoptosis. 2016 *In Revision*

Weitere Publikationen:

Vogel S, Börger V, Peters C, Förster M, Liebfried P, Metzger K, Meisel R, Däubener W, Trapp T, Fischer JC, Gawaz M, Sorg RV.: Necrotic cell-derived high mobility group box 1 attracts antigen-presenting cells but inhibits hepatocyte growth factor-mediated tropism of mesenchymal stem cells for apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2015 Jul;22(7):1219-30

Keil E, Finkenstädt D, Wufka C, Trilling M, Liebfried P, Strobl B, Müller M, Pfeffer K: Important scaffold function of the Janus kinase 2 uncovered by a novel mouse model harboring a Jak2 activation-loop mutation. *Blood.* 2014 Jan 23;123(4):520-9

## 9.2 Danksagung

Zuvorderst gebührt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Betreuung dieses Promotionsvorhabens und die stete Unterstützung und anhaltende Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung bereits seit meiner Zeit als Diplomandin. Insbesondere danke ich ihm für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas und der damit verbundenen Gelegenheit zu eigenständiger wissenschaftlicher Forschung.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt danke ich für die freundliche Betreuung und die damit verbundene Übernahme des Koreferats.

Ein sehr großes Dankeschön gilt Eric für die Unterstützung während der ersten Jahre, die interessante Aufgabenstellung und die konstruktiven Diskussionen über Jaks und Stats.

Bei der Jürgen Manchot Stiftung möchte ich mich für die finanzielle Förderung dieses Promotionsvorhabens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Johannes Bode und Carina Meyer danke ich für die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Hepatozyten-Präparation.

Für die hilfreiche Beurteilung der Mitochondrien-Daten möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Reichert bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Besonders bei David, Karin und Conny, aber vor allem bei Nicole und Julia. Danke für die tolle Unterstützung im Labor, jedes offene Ohr und für die schönen und spaßigen Unternehmungen auch außerhalb des Instituts.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des gesamten Instituts für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Danke für euer Verständnis und den Beistand über die letzten Jahre; dies gilt auch der Donnerstragstruppe: Julia, Margret, Sabine und Verena, sowie für das Freunde-Sein außerhalb des Donnerstags. ;)

Besonders herzlich möchte ich mich bei Alex bedanken. Danke für die stetige Motivation und die vollkommene Unterstützung während der gesamten Zeit.

Schließlich und von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Für die liebevolle und immerwährende Unterstützung in jeder Situation.

### **9.3 Eidesstattliche Erklärung**

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

Düsseldorf, März 2015

---

Pia Liebfried