

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. K. Pfeffer

**Parasit- und wirtsabhängige Determinanten  
der Interleukin-12 Antwort von Makrophagen auf  
ein sekretorisches Produkt von *Toxoplasma gondii***

**Dissertation**

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

Bartholomäus Schade  
2006

---

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Prof. Dr. Nürnberg (Dekan)

Referentin: PD Dr. G. Reichmann

Korreferent: Prof. Dr. Sebastian Jander

---

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefaßten Ergebnisse wurden in der Zeit von Januar 1998 bis September 2000 im Labor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erarbeitet.

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert:

**Fischer, H. G., Dörfler, R., Schade, B. and Hadding, U.** (1999). „Differential CD86/B7-2 expression and cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice.“ Int Immunol **11**(3): 341-9.

**Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G. and Fischer, H. G.** (2001). „Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins.“ Microbes Infect **3**(9): 689-99.

**Schade, B. and Fischer, H. G.** (2001). „*Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype.“ Vet Parasitol **100**(1-2): 63-74.

# 1. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt Determinanten der Interleukin-12 Antwort muriner Makrophagen auf eine Stimulation durch *Toxoplasma gondii*.

Es wurde eine Präparationsmethode für *T. gondii*-Lysat etabliert. Dieses Lysat induzierte in Makrophagen eine Zytokinantwort. Der Mechanismus, über den *T. gondii* in Makrophagen Interleukin-12 induziert, wurde weiter charakterisiert. Es wurde gezeigt, daß diese Aktivität durch lösliche Proteine vermittelt wird, die von *T. gondii* - auch in Abwesenheit von Makrophagen - sezerniert werden.

Makrophagen aus Mäusen unterschiedlicher Genotypen wurden mit dem Lysat aus *T. gondii* stimuliert. Je nach genetischem Hintergrund reagierten die Makrophagen mit unterschiedlich starker Interleukin-12 Sekretion. Die Unterschiede stehen im Zusammenhang mit Genen des H-2 Komplex auf Chromosom 17.

Darüberhinaus wurde eine Korrelation der Interleukin-12 Induktion mit der Virulenz der Toxoplasmen gezeigt. Erkrankten Mäuse an einer akuten Toxoplasmose, korreliert eine verstärkte Mortalität mit einem erhöhten Interleukin-12 Niveau. Daraus wurde abgeleitet, daß Interleukin-12 ein Pathogenitätsfaktor während der akuten Phase der murinen Toxoplasmose sein kann.

## 2. Einleitung

### 2.1. *Toxoplasma gondii*

#### 2.1.1 Bedeutung als Infektionserreger und Geschichte

Die Infektion mit *Toxoplasma gondii* ist eine der häufigsten parasitären Infektionen des Menschen und anderer Warmblüter. Sie kommt weltweit vor und beinahe ein Drittel der Menschheit ist dem Erreger ausgesetzt. Bei den meisten Erwachsenen führt die Infektion zu keiner schwerwiegenden Erkrankung, aber bei kongenital infizierten Kindern kann sie zu Blindheit und geistiger Retardierung, bei Immundefizienten zu einer Erkrankung mit tödlichem Ausgang führen. Bei Ziegen und Schafen führt die Infektion mit *T. gondii* häufig zu Aborten (Dubey 1998).

*Toxoplasma gondii* wurde als Pathogen in Nagern 1908 von Nicolle und Manceaux (Nicolle et al. 1908; Nicolle et al. 1909) in Tunesien, und unabhängig davon von Splendore (Splendore 1908) in São Paulo, Brasilien, entdeckt. Als menschliches Pathogen wurde es 1939 von Wolf, Cowen und Paige (Wolf et al. 1939) erkannt, die von einer kongenitalen Toxoplasmose bei einem Kind berichteten. Der komplette Lebenszyklus von *T. gondii* wurde erst 1970 aufgeklärt (Dubey et al. 1970a; Dubey et al. 1970b; Frenkel et al. 1970).

#### 2.1.2 Klassifikation

*Toxoplasma gondii* wird taxonomisch zu den Protozoa (Einzeller) und hier zum Stamm der Apicomplexa, ehemals Sporozoa, gezählt. *Toxoplasma gondii* ist somit durch die zur Infektion führenden "Sporen" und durch einen Generationswechsel zwischen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Formen gekennzeichnet sowie durch einen Apikalkomplex (Mehlhorn et al. 1989). Innerhalb der Apikomplexa gehört *T. gondii* zur Unterklasse Coccidia, obligat intrazellulären Parasiten.

#### 2.1.3 Struktur und Lebenszyklus

Im Lebenszyklus von *T. gondii*, in dem ein Wirtswechsel stattfindet, werden drei Stadien des Parasiten unterschieden: die schnell wachsenden Tachyzoiten, die Bradyzoiten der Gewebezysten im Zwischenwirt sowie die Sporozoiten, die in Oozysten vom Endwirt ausgeschieden werden (Frenkel 1973). Alle drei Entwicklungsstadien besitzen gemeinsame morphologische Charakteristika.

Der Name *Toxoplasma* (*toxon* = Bogen, *plasma* = Form) leitet sich von der gekrümmten Form des Tachyzoitenstadiums ab.

Der Parasit besitzt die typischen Organellen eukaryontischer Organismen und ist von

einer dreischichtigen Pellicula umgeben, deren äußere Membran ihn vollständig umschließt.

Die beiden dicht aufeinanderliegenden inneren Membranen enden am anterioren und posterioren Polring. Das Zytoskelett enthält 22 subpelliculäre Mikrotubuli, die vom Polring fast die gesamte Zelle durchziehen. Actin- u. Myosinmikrofilamente, die bevorzugt im apikalen Teil des Parasiten zu finden sind, dienen der Motilität der Parasiten und der Wirtszellinvasion (Dubey 1977; Dubey et al. 1993).

Der Apikalkomplex besteht aus dem Konoid, den Rhoptrien und den Mikronemen und ist entscheidend für die Wirtszellinvasion. Der kegelförmige Konoid ist ein Hohlkörper aus spiralig gewundenen Mikrotubuli und kann bei der Zellinvasion vorgeschoben werden. Die Rhoptrien sind keulenförmige sekretorische Zellorganellen, deren spitzes Ende im Konoid endet. Zwischen den Rhoptrien liegen die vesikulären Mikronemen, deren Sekret zusammen mit dem der Rhoptrien die Invasion und Penetration der Wirtszelle erleichtern soll (Carruthers 2002).

Der Tachyzoit dringt aktiv in die Wirtszelle ein. Während des Invasionsprozesses wird die Wirtszellmembran eingestülpt und bildet letztlich die Membran der parasitophoren Vakuole. Diese wird vom Erreger derart modifiziert, daß eine Fusion mit dem endozytischen Netzwerk der Wirtszelle verhindert wird (Sibley et al. 2000). In dieser Vakuole findet die asexuelle Vermehrung durch wiederholte Endodyogenie statt bis die Wirtszelle mit Parasiten angefüllt ist.

Bereits nach wenigen Teilungen können Gewebezysten entstehen. Gewebezysten enthalten zwei bis mehrere hundert Bradyzoiten, die sich strukturell kaum von Tachyzoiten unterscheiden.

Die Unterschiede sind lediglich ultrastruktureller und antigenetischer Natur. So besitzen die Bradyzoiten mehr amyloidhaltige Speichergranula und Mikronemen. Die Rhoptrien haben eine dichtere Struktur und der Zellkern liegt am posterioren Ende – im Gegensatz zu dem von Tachyzoiten, der eher zentral liegt (Ferguson et al. 1987). Antigenetische Unterschiede bestehen in der Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern (Kasper 1989). So exprimieren vor allem Tachyzoiten die Oberflächenmoleküle 'surface antigen' 1 und 2. Zu den Bradyzoiten-spezifischen Antigenen gehören unter anderen das 'matrix antigen' 1 und das 'bradyzoite antigen' 1 bzw. 5 (Parmley et al. 1994; Bohne et al. 1995; Parmley et al. 1995; Yang et al. 1995).

Bradyzoiten-haltige Zysten können prinzipiell in allen Geweben entstehen, zeigen jedoch eine deutlich höhere Prävalenz im neuralen und muskulären Gewebe. Intakte Zysten führen zu keiner akuten Pathologie und können im Wirt lebenslang bestehen bleiben.

Die Faktoren, welche die Entstehung von Gewebezysten beeinflussen, sind nicht vollständig geklärt. Gewebezysten treten in der chronischen Phase der Erkrankung, nachdem bereits eine Immunität erworben wurde, weitaus häufiger auf als in der akuten Phase.

Die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* ist hochspezifisch für den Endwirt und findet

ausschließlich im Darmepithel von Katzen statt. Zu dieser Vermehrung kommt es nach der Aufnahme einer der 3 infektiösen Formen, d.h. Tachyzoiten, Bradyzoiten oder Sporozoiten. Erstere sind allerdings nur bei parenteraler Aufnahme infektiös, da sie die saure Magenpassage nicht überleben. Die Infektiosität von Gewebezysten ist am höchsten (Dubey und Frenkel 1976).

Nach Verschmelzung der Gameten bilden sich Sporozoiten und werden mit dem Faeces ausgeschieden, woraufhin weitere End- oder Zwischenwirte infiziert werden können. In Zwischenwirten werden die Sporozoiten nach Infektion des Darmepithels zu Tachyzoiten, die fast keine Wirts- und Zellspezifität mehr aufweisen und sich in allen kerntragenden Zellen des Wirts vermehren können (Frenkel 1988).

#### **2.1.4 Toxoplasmenisolate und ihre unterschiedliche Virulenz**

Während bei einigen Toxoplasmenisolaten bereits wenige Erreger ausreichen, um Mäuse innerhalb von Tagen zu töten, führt die Infektion mit einer größeren Menge anderer Toxoplasmenisolate zu einer chronischen Toxoplasmose. Diese Beobachtung hat dazu geführt, *T. gondii*-Isolate in „mausvirulente“ und „schwachvirulente“ zu unterteilen. Untersuchungen zur Antigenstruktur und zur Ausprägung von Allelen verschiedener Strukturgene haben schließlich zur Klassifikation in drei speziesinterne Gruppen geführt. (Sibley et al. 1992; Parmley et al. 1994; Cristina et al. 1995; Howe et al. 1995)

Die Gruppe I besteht aus extrem mausvirulenten Stämmen, die signifikant höhere Parasitämien zur Folge haben. Eine Infektion mit 10 oder weniger Tachyzoiten führt bereits zu einer tödlich verlaufenden akuten Infektion (Denkers 1999). Toxoplasmenstämme aus der Gruppe I bilden in der Maus normalerweise kaum Bradyzoiten, somit wird eine experimentelle Infektion mit diesen Isolaten selten chronisch, bei einer Infektion vorimmunisierter Mäuse kann es jedoch dazu kommen (Yap et al. 1998).

Isolate der Gruppen II und III sind weniger mausvirulent. Diese *T. gondii*-Stämme führen bei subletalen Dosen zu einer persistierenden latenten Infektion mit hohen Zahlen an Gewebezysten. Stämme dieser Gruppe stellen den Großteil der Erreger humaner Toxoplasmosen (Howe et al. 1995; Howe et al. 1997).

Darüberhinaus existieren einige *T. gondii*-Stämme, welche in ihrer Virulenz verändert worden sind. Dazu gehört der temperaturabhängige ts-4 Stamm, der durch chemische Mutagenese (unter Verwendung von N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin) aus dem Typ I Stamm RH hervorgegangen ist (Pfefferkorn et al. 1976). Diese Mutante zeigt normales Wachstum *in vitro* bei 33°C, doch bei höheren Temperatur stagniert das Wachstum. Der Stamm ist bei immunkompetenten Mäusen avirulent, bildet keine Zysten und ist einige Monate nach Infektion nicht mehr nachweisbar (Waldeland et al. 1983). Dennoch kann ein Kontakt mit diesem Stamm eine nachfolgende Immunität gegenüber hochvirulenten Toxoplasmen induzieren (Pfefferkorn et al. 1976; Suzuki et al. 1988).

Andere Mutanten des RH Stammes wurden durch wiederholte Passagen der Erreger

in Mäusen, welche mit *T. gondii*-Lysat und komplettem Freundschens Adjuvans immunisiert worden waren, erzeugt. Diese Mutanten haben die hohe Virulenz des RH Stammes verloren, sie bilden Zysten und können in den infizierten Tieren eine Immunität gegenüber dem original RH Stamm induzieren (Yano et al. 1986).

## 2.2. Klinische Bedeutung

Eine *T. gondii*-Infektion ist unter Menschen weit verbreitet, mit Prävalenzen zwischen 16-40% in den USA und Großbritannien und 50-80% in Europa, Zentralamerika und Südamerika (Dubey et al. 1988). Dabei kommt es zu einer altersentsprechenden Steigerung der Seroprävalenz von etwa einen Prozent pro Lebensjahr. Die Infektion kann intrauterin oder postnatal erworben werden.

### 2.2.1 Die kongenitale Infektion

Zu einer intrauterinen Infektion kommt es, wenn eine Frau sich während einer Schwangerschaft infiziert. Eine Infektion vor der Schwangerschaft stellt nur dann ein Risiko dar, wenn diese wenige (maximal 3) Monate vor dem Schwangerschaftsbeginn stattgefunden hat (Gavinet et al. 1997; Vogel et al. 1996). Der Schweregrad der Erkrankung hängt vom Alter der Schwangerschaft zum Zeitpunkt der Infektion ab. Die schwerwiegendsten Verläufe treten bei Infektionen während des ersten Trimenons auf (Daffos et al. 1988). Etwa ein Drittel aller Frauen, die sich während der Schwangerschaft infizieren, geben die Infektion an das Kind weiter.

Obwohl die Mutter in den seltensten Fällen Symptome zeigt, so liegt doch eine temporäre Parasitämie vor. Es kann zu fokalen Läsionen in der Plazenta kommen und somit zu einer Infektion des Fötus. Dieser ist zuerst generell infiziert, im weiteren Verlauf befällt der Parasit aber nur das Nervensystem. Das Spektrum der Ausprägung der Erkrankung ist sehr groß. Während es in den mildesten Fällen nur zu einer leichten Visusminderung kommt, ist in schweren Fällen die volle Tetrade an Symptomen zu beobachten: Retinochorioiditis, Hydrozephalus, Krämpfe und intrazerebrale Verkalkungen (Remington et al. 1995a und 1995b). Die charakteristischste Störung ist dabei die Retinochorioiditis, bei der es zu singulären oder multiplen Läsionen der Retina und der Choroidea kommt. Sind dabei Bereiche der Makula betroffen, kann eine Erblindung die Folge sein. Bei einem Befall der Augenmuskulatur kommt es zum Schielen.

Einige Daten zeigen, daß Kinder, die infiziert, aber bei Geburt normal sind, eine höhere Wahrscheinlichkeit von Lernbehinderungen haben. Sehbeeinträchtigungen sowie Krämpfe können bei diesen Kindern auch noch im späteren Leben auftreten (Remington 1995).

### 2.2.2 Die postnatale Infektion

Eine postnatal erworbene Infektion bei immunkompetenten Individuen kann lokalisiert oder generalisiert verlaufen. Die häufigste Form ist dabei die Lymphadenitis, meist der



tiefen zervikalen Lymphknoten, die tastbar und leicht dolent erscheinen. In 20 bis 30% aller postnatalen Infektionen tritt eine generalisierte Lymphadenopathie auf. Weitere Symptome können Fieber, allgemeine Schwäche, Muskelschmerzen, Hals- und Kopfschmerzen sein. Es kommt innerhalb von Wochen bis Monaten zu einer spontanen Klärung der Infektion. In seltenen Fällen kann sich eine okuläre Toxoplasmose im Rahmen einer akuten Infektion entwickeln (Montoya et al. 1996; Holland et al. 1999).

Bei Immunsupprimierten findet meist eine Reaktivierung einer latenten Infektion statt. Fallen die  $CD4^+$ -Zellen unter  $100/mm^3$ , kann es zu einer nekrotisierenden Enzephalitis kommen, der wichtigsten Manifestationsart der Toxoplasmose bei diesen Patienten. Unbehandelt kann die Erkrankung schnell fatal enden (Luft et al. 1984). Fokale und nonfokale Funktionsstörungen treten auf, eine Enzephalopathie, Meningoenzephalopathie oder Massenläsionen können sich entwickeln. Zu den Symptomen zählen Kopfschmerzen, Desorientiertheit, Müdigkeit, Hemiparesen, geänderte Reflexe und Krampfanfälle bis hin zum Koma.

Obwohl alle Regionen des ZNS betroffen sein können, sind meist der Hirnstamm, die Basalganglien, die Hypophyse und der kortikomedulläre Übergang befallen. Der Hirnstammbefall kann für Funktionsstörungen wie Hirnnervenstörungen, Dysmetrie und Ataxie verantwortlich sein. Infolge von Veränderungen der Basalganglien kann es zu einem Hydrozephalus, zu choreiformen Bewegungsstörungen und zur Choreoathetose kommen (Montoya et al. 2004). Störungen der Hypophyse können zu Panhypopituitarismus und Hyponatriämie infolge übermäßiger Ausschüttung von anti-diuretischem Hormon führen (Kasper 1994).

In 40-70% der 'acquired immunodeficiency syndrome' (AIDS)-Patienten kommt es zur Beteiligung der Lungen, im Sinne einer interstitiellen Pneumonitis (Mariuz et al. 1997) und des Herzens mit fokalen nekrotischen Herden.

Die Toxoplasmose hat einen wichtigen Stellenwert bei den Erkrankungen, welche im Rahmen von AIDS zum Tode führen. Ungefähr 10% der AIDS-Kranken in den USA und bis zu 30% der Erkrankten in Europa sterben wahrscheinlich an den Folgen einer zerebralen Toxoplasmose (Luft et al. 1992; Luft et al. 1993; Rabaud et al. 1994). Die meisten an Toxoplasmose erkrankten AIDS-Patienten klagen über bilaterale, schwerwiegende und persistierende Kopfschmerzen, welche kaum auf Analgetika ansprechen. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu zunehmender Verwirrung, Lethargie, Ataxie und schließlich zum Koma.

Auch Fälle eines septischen Schocks als Folge einer *T. gondii*-Infektion bei 'human immunodeficiency virus' -Infizierten wurden berichtet (Lucet et al. 1993).

### 2.2.3 Pathologie

Der Mensch infiziert sich mit Toxoplasmen durch Verzehr von Gewebezysten im Fleisch oder durch die Aufnahme von Katzenkot mit verunreinigter Nahrung oder Wasser (Cook et al. 2000; Dubey et al 2002; Teutsch et al. 1979; Bowie et al. 1997). Selten kommt es zu einer direkten Übertragung durch Blutprodukte oder

Organtransplantationen (Israelski et al. 1993). Nach Penetration der Epithelzellen des Darmes durch Bradyzoiten (Barragan et al. 2002), deren lokaler Vermehrung und Umwandlung zu Tachyzoiten, findet über das Blut und die Lymphe ein Befall der Mesenteriallymphknoten statt. Später kann es zum systemischen Befall von Lymphknoten kommen, und in vielen Organen können nekrotische Foci entstehen. Für das klinische Bild ist besonders der Organbefall der Augen, des Herzens, der Nebennieren und des Hirns entscheidend (Holland et al. 1996; Montoya et al. 1997; Luft et al 1983). Die Nekrose ist dabei allein Folge der Toxoplasmenvermehrung und der Wirtszellyse. *T. gondii* produziert keine Toxine.

Der Nekrose infizierter Zellen folgt normalerweise eine Inflammation des Gewebes mit Einwanderung von Monozyten. Mit der Entstehung von Gewebezysten in Muskeln und Nervengewebe schwindet auch die Entzündung. Bei immunkompetenten Individuen liegt dieser Zeitpunkt etwa 3 Wochen nach der Infektion. Kleine entzündliche Foci können jedoch über Monate oder Jahre persistieren. Im Hirn, Rückenmark und Plazenta können die Tachyzoiten deutlich länger der Immunabwehr entgehen.

Der Erwerb einer Immunität geht nicht mit einer Eradikation der Infektion einher. Gewebezysten können jahrelang überleben. Kommt es zu einer Ruptur einzelner Zysten, verhindert eine effiziente Immunantwort die neuerliche Ausbreitung der Tachyzoiten.

Bei immunsupprimierten Patienten jedoch kann es zu einer Vermehrung der Tachyzoiten und somit zu einem erneuten akuten Ausbruch der Toxoplasmose mit fatalen Folgen kommen (Montoya et al. 2004).

### **2.2.4 Diagnostik**

Zur Diagnostik einer Toxoplasmeninfektion stehen biologische, serologische und histologische Verfahren zur Verfügung. Klinische Zeichen einer Infektion sind unspezifisch und können zu keiner eindeutigen Diagnose führen. Im Falle einer ausgeprägten Enzephalitis bei immundefizienten Patienten kann die neuroradiologische Bildgebung (Computertomografie und Magnetresonanztomografie) von großer Hilfe sein, gegebenenfalls in Verbindung mit einer CT-gesteuerten Punktion zur Hirngewebsbiopsie.

Zu den serologischen Verfahren, mit denen sich Antikörper (Ak) nachweisen lassen, zählen der Sabin-Feldman Test (Sabin et al. 1948), indirekte Hämagglutinationstests (Dannemann et al. 1990), indirekte Fluoreszenz-Antikörper-Assays (Walton et al. 1966), direkte Agglutinationstests, Latexagglutinationstests, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und Immunabsorptions-Agglutinations-Assays (Balsari et al. 1980; Hedman et al. 1989; Montoya et al. 2002b). Die Titer der Antikörper erreichen normalerweise ein Maximum nach 6 bis 8 Wochen, um dann langsam auf einen leicht erhöhten Spiegel abzufallen, der das ganze Leben erhöht bleibt. Somit sagt der Nachweis von Antikörpern im Serum aus, daß das Individuum sich zu irgendeinem Zeitpunkt in der Vergangenheit infiziert hatte. Eine akute Infektion liegt vor, wenn eine zweite Serumprobe, abgenommen in einem Abstand von 2-4 Wochen, einen deutli-

chen Anstieg des Antikörpertiters zeigt. Ebenso kann die Differenzierung zwischen IgM und IgG helfen, die Akuität der Infektion zu beurteilen. Eine IgM Erhöhung spricht für eine frische Infektion, eine isolierte IgG Erhöhung für eine chronische Infektion (Naot et al. 1981; Siegel et al 1983).

Des Weiteren kann *T. gondii* auch aus Körperflüssigkeiten und Geweben, z. B. durch Punktion von befallenen Lymphknoten, isoliert und im Tierversuch angezüchtet werden. Auch ein mikroskopischer Nachweis ist möglich, sowie der Nachweis von toxoplasmaler DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Grover et al. 1990). Gerade die PCR hat die Diagnostik revolutioniert, indem sie – korrekte Handhabung vorausgesetzt – eine beinahe 100%ige Spezifität bei einer Sensitivität von 65-100% liefert (Montoya et al. 2002a). Zudem ermöglicht sie die pränatale Diagnose einer kongenitalen Toxoplasmose (Romand et al. 2001).

Gewebeproben können histologisch aufgearbeitet werden. Geeignet sind dazu einfache Giemsa-Färbungen. Bradyzoiten zeigen eine starke Periodat-Leukofuchsin-positive Reaktion. Eine immunhistologische Markierung der Präparate mit fluoreszierendem anti-*T. gondii*-Antiserum kann die histologische Diagnostik stark vereinfachen (Conley et al. 1981).

### 2.2.5 Therapie

Immunologisch kompetente Erwachsene und ältere Kinder bedürfen keiner Therapie. Patienten mit okulärer Toxoplasmose sollten, falls der Schweregrad der Chorioretinitis dies erfordert, einen Monat mit Sulfadiazin, Pyrimethamin und ggf. Prednison behandelt werden oder alternativ mit einer Kombination aus Clindamycin und Pyrimethamin (Montoya et al. 2004).

Patienten mit AIDS sollten im Falle einer akuten Toxoplasmose behandelt werden, ebenso Schwangere.

Zu den am weitesten verbreiteten Chemotherapeutika gehören Sulfadiazin und Pyrimethamin (Georgiev 1994; Guerina et al. 1994). Beide Medikamente blockieren synergistisch den p-Aminobenzoesäure-Zyklus und den Folsäurezyklus. Sie sind nur in der akuten Phase der Infektion wirksam und können gut die Parasitenvermehrung hemmen, vermögen jedoch nicht den Parasit völlig zu eliminieren und sind in der subklinischen, chronischen Phase kaum wirksam.

Zu den Medikamenten, die die Proteinsynthese des Parasiten inhibieren, gehören Clindamycin, Chlortetracyclin und Azithromycin. Auch diese Medikamente hemmen das Wachstum von *T. gondii*.

Das Antibiotikum Hydroxynaphthoquinon (BW566C80 oder Atovaquon), welches in den Pyrimidinstoffwechsel eingreift, zeigt sich sowohl gegen Tachyzoiten als auch gegen Zysten wirksam (Araujo et al. 1992; Kovacs 1992).

Die Standard-Kombinationstherapie einer Toxoplasmen-Enzephalitis besteht aus der Gabe von Pyrimethamin und Sulfadiazin für 4 bis 6 Wochen. Folsäure wird begleitend verabreicht, um der Knochenmarkstoxizität von Pyrimethamin entgegenzuwirken. Es folgt eine lebenslange – bzw. für die Dauer der Schwangerschaft –

Suppressionstherapie mit beiden Medikamenten in niedriger Dosierung, gegebenenfalls mit Pyrimethamin allein. Wird Sulfadiazin nicht toleriert, kann alternativ die Kombination aus Pyrimethamin und Clindamycin verabreicht werden (Montoya et al. 2004). Die Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazole scheint bei AIDS-Patienten ebenso wirksam zu sein (Torre et al. 1998). Bei einem Wiederanstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellen im Blut von AIDS-Patienten über 200 pro ml und einer reduzierten Virenkonzentration für einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten, kann erwogen werden, die sekundäre Prophylaxe zu stoppen (Kaplan et al. 2002).

Kongenital infizierte Kinder können neben diesen Kombinationstherapien auch erfolgreich mit Spiramycin plus Prednison behandelt werden (Kasper 1994). Spiramycin wird alternativ auch bei einer Infektion der Mutter in der frühen Schwangerschaft eingesetzt, obwohl ein Nutzen kontrovers diskutiert wird (Gilbert et al. 2001a; 2001b).

Eine große Anzahl anderer Therapeutika haben ihre Effektivität in Tier- und Zellversuchen gezeigt. Dazu gehören Diaminodiphenylsulfon (Dapson), chlorierte Lincomycin-Analoga, Piritrexim und Roxithromycin (Georgiev 1994).

### **2.2.6 Impfung**

Für den Menschen ist zur Zeit keine effektive Impfung gegen die Toxoplasmose verfügbar.

Es gibt Versuche mit attenuierten Bradyzoiten an Katzen. Nach oraler Gabe dieser Bradyzoiten gelang es in 84% der Fälle, eine Vermehrung der Erreger und die Ausscheidung von Oozysten zu verhindern (Frenkel et al. 1991).

Für Schafe existiert eine kommerzielle Impfung auf der Grundlage eines Tachyzoiten-Stammes, der keine Gewebezysten bildet. Sie gewährleistet eine 18-monatige Immunität (Wilkins et al. 1988; Buxton et al. 1993).

## **2.3. Die Immunabwehr gegen *T. gondii***

Die sofortige Reaktion der Immunabwehr des Wirtes auf eine Erstinfektion mit *T. gondii* macht die akute Phase der Toxoplasmose aus. Diese Phase dauert bei der Maus ca. 14 Tage und wird von einer lebenslangen chronischen Phase abgelöst.

In der Akutphase spielen Zellen der angeborenen Immunabwehr eine entscheidende Rolle, insbesondere das Zusammenspiel von natürlichen Killer (NK)-Zellen und Makrophagen (M $\phi$ ) (Gazzinelli et al. 1993; Hunter et al. 1994), sowie neutrophilen Granulozyten (Bliss et al. 2000).

T- und B-Lymphozyten haben hingegen eine bedeutende Funktion während der chronischen Phase der Infektion (Gazzinelli et al. 1998).

Beim Zusammenspiel dieser Zellen sind im wesentlichen die Zytokine Interleukin-12 (IL-12), Interferon (IFN)  $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , IL-4 und IL-10 beteiligt.

Der Parasit wird entweder durch gezielte Lyse der infizierten Zellen oder durch die Aktivierung von antiparasitären Effektormechanismen in diesen Zellen aus fast allen Geweben entfernt.

### 2.3.1 Angeborene Immunität

*Toxoplasma gondii* induziert eine ausgesprochen starke unspezifische Immunantwort, die selbst T-Zell-unabhängig ist, aber die Ausbildung einer Parasiten-spezifischen T-Zellantwort induziert. Die Auswirkungen der unspezifischen Immunantwort zeigen sich deutlich z.B. in der Kontrolle einer Koinfektion durch *Listeria monocytogenes* und *Schistosoma mansoni* oder durch bestimmte Viren oder in der Kontrolle experimentell induzierter Tumoren (Ruskins et al. 1968; Hibbs et al. 1971; Mahmoud et al. 1976; Gazzinelli et al. 1991b).

Makrophagen sind die wichtigsten Effektorzellen in der Akutphase der Toxoplasmose. Sie können Toxoplasmen phagozytieren und mikrobizid wirkende Sauerstoffradikale und Stickoxid (NO) produzieren. In niedrigen Konzentrationen induziert NO die Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten (Bohne et al. 1994).

Ferner spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Aktivierte Makrophagen produzieren IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-12 und TNF $\alpha$ , darüber hinaus die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und 'transforming growth factor' (TGF)- $\beta$ . Makrophagen die den Granulozyten Marker Gr-1 tragen gehören zu den ersten Zellen, die auf eine peritoneale Infektion von Mäusen mit *T. gondii* hin rekrutiert werden (Mordue et al. 2003).

NK-Zellen hingegen können infizierte Zellen erkennen und ihre Autolyse einleiten. Sie sind die initialen Produzenten von IFN $\gamma$ , welches zur optimalen Aktivierung der IL-12-Produktion nötig ist (Flesch et al. 1995).

IL-12 ist eines der Schlüsselzytokine in der Reaktionskaskade, welche den Entzündungsprozess einleitet. Neben Makrophagen sind Dendritische Zellen (DC) die Hauptproduzenten von IL-12 (Sher et al. 1998). CD8a<sup>+</sup> DC können sogar ohne vorheriges 'priming' durch IFN $\gamma$  oder andere kostimulatorische Faktoren direkt auf Stimulation mit *T. gondii* hin IL-12 produzieren (Sousa et al. 1997). DC wiederum können aus Monozyten/Makrophagen hervorgehen (Banchereau et al. 1998; Chakraborty et al. 1999). Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, schnell große Mengen an IL-12 aus Speichergranula freizusetzen (Bliss et al. 2000).

Die IL-12-Antwort auf *T. gondii* ist außergewöhnlich stark und bisher sind zwei unabhängige Signalwege bekannt, über welche diese Antwort induziert wird (Sher et al. 2003; Denkers 2003a). Zum einen ist der Zystein-Zystein Chemokin Rezeptor (CCR)5 beteiligt. Dies konnte an Dendritischen Zellen aus Mäusen ohne diesen Rezeptor gezeigt werden, welche nach Stimulation mit dem Parasiten nur 20-40% der Menge an IL-12 produzieren wie vergleichbare Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Aliberti et al. 2000). Zum anderen ist ein 'myeloid differentiation factor 88' (MyD88)-abhängiger Signalweg beteiligt, der Rezeptoren aus der 'Toll-like receptor' (TLR) Familie beinhaltet. Die Infektion von MyD88-defizienten Mäuse führt zu einer erhöhten Parasitenreplikation bei deutlich reduzierten Plasmaspiegeln an IL-12 (Scanga et al. 2002). Insbesondere der TLR2 scheint die Induktion von IL-12 zu vermitteln, während der TLR4 für die IL-4 und IL-10 Induktion zuständig ist (Mun et al. 2003).

In Versuchen mit 'severe combined immunodeficiency' (SCID) Mäusen, die keine



Lymphozyten haben, und somit als einzige IFN $\gamma$ -Quelle NK-Zellen besitzen, wurde gezeigt, daß die Neutralisation von IL-12 durch anti-IL-12 Antikörper eine deutliche Erhöhung der Suszeptibilität der Tiere für eine Toxoplasmose zur Folge hat (Gazzinelli et al. 1994). Eine Gabe von IL-12 in der akuten Phase einer murinen Toxoplasmose erhöht signifikant die Überlebensrate der Tiere (Khan et al. 1994).

Durch Makrophagen produziertes IL-12 induziert zusammen mit TNF $\alpha$  die Freisetzung von IFN $\gamma$  in NK-Zellen. IFN $\gamma$  aktiviert – wahrscheinlich synergistisch mit TNF $\alpha$  (Gazzinelli et al. 1993) – weitere Makrophagen und erhöht die Ausschüttung von IL-12. Zu den Zellen, welche ebenfalls in der Lage sind, IFN $\gamma$  zu produzieren, gehören CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Nakano et al. 2001a). Die IFN $\gamma$ -Produktion ist stark abhängig von der Aktivierung von CD44, einem Glycoprotein auf der Oberfläche vieler Zelltypen (Blass et al. 2001).

Protektive Effekte von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  während der Akutphase der Toxoplasmose konnten klar in Mäusen nachgewiesen werden, denen die Rezeptoren für diese Zytokine fehlen (Alexander et al. 1996), sowie durch Versuche mit anti-IFN $\gamma$  Antikörpern, deren Gabe eine Resistenz gegenüber der Toxoplasmose auslöschte (Gazzinelli et al. 1991a; Gazzinelli et al. 1994).

Neben IL-12 ist auch IL-18 für die Aktivierung einer ausreichend starken und frühen IFN $\gamma$ -Produktion notwendig. Yap et al. (2001) haben bei Infektionen eines Substammes von B10.Q/J Mäusen (B10.Q-H-2-q/SgJ) mit Toxoplasmen eine erhöhte IL-12-Produktion bei einer stark verminderten IFN $\gamma$ -Produktion beobachtet. Diese Mäuse haben einen rezessiv autosomalen Defekt der IL-12/IFN $\gamma$ -Kaskade. Die Tiere verstarben nach der Infektion infolge unkontrollierten Parasitenwachstums. Durch frühzeitige Verabreichung von IL-18 wurde das Parasitenwachstum aber kontrollierbar. Es kam zur Induktion von adäquat hohen Spiegeln an IFN $\gamma$ . Zwar zeigten auch Cai et al. (2000) eine unterstützende Funktion von IL-18 in der IFN $\gamma$ -Induktion, jedoch beobachteten diese Autoren nach Infektion von SCID-Mäusen mit *T. gondii* und einer Neutralisation des IL-18 nur einen kurzzeitigen Abfall der IFN $\gamma$ -Produktion und keine Abnahme der Resistenz gegenüber dem Parasiten.

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF $\beta$ , ebenfalls von Makrophagen produziert, wirken dem entgegengesetzt. TGF $\beta$  inhibiert direkt die IFN $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen, während IL-10 die IL-12 Sekretion in Makrophagen hemmt – nicht hingegen die von IL-18 (Zediak et al. 2003) – und somit die Stimulation von NK-Zellen durch IL-12 ausschaltet. Durch diesen Mechanismus ist die Möglichkeit zur Regulation der Immunantwort gegeben. Der fatale Verlauf einer akuten *T. gondii*-Infektion in suszeptiblen Mäusen beruht wahrscheinlich auf einem Versagen dieses Regulationsmechanismus (Gazzinelli et al. 1992; D'Andrea et al. 1993; Hsieh et al. 1993; Gazzinelli et al. 1996a; Alexander et al. 1997; Bliss et al. 2000; Suzuki et al. 2000; Mordue et al. 2001 und diese Arbeit).

### 2.3.2 Adaptive Immunität

Die adaptive Immunantwort setzt nach der angeborenen Immunantwort ein und ist ins-

besondere für eine dauerhafte Immunität in der chronischen Phase einer Toxoplasmeninfektion von Bedeutung. Effektorzellen sind T- und B-Lymphozyten.

Nach Konfrontation der Lymphozyten mit parasitärem Antigen, welches von Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen präsentiert wird, werden T-Lymphozyten aktiviert.

Auch hier liegt eine Schlüsselrolle bei IL-12, welches zusammen mit  $\text{IFN}\gamma$ , aber von diesem unabhängig, für die Weichenstellung bei der Differenzierung von Vorläufer T-Helfer (Th)-Zellen, bzw.  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in Richtung Th1-Subtyp verantwortlich ist (Mountford et al. 1999).

Th-Zellen werden in den Th1- und Th2-Typ unterschieden. Jeder dieser Subtypen produziert, angepaßt an seine Aufgaben, unterschiedliche Zytokine. Th1-Zellen spielen bei der zellvermittelten Entzündungsreaktion eine Rolle: Die Zytokine IL-2, IL-3,  $\text{IFN}\gamma$  sowie  $\text{TNF}\beta$  und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor aktivieren zytotoxische und inflammatorische Funktionen.

Th2-Zellen hingegen produzieren die Zytokine IL-4, 5, 6, 9 und 10 und stimulieren insbesondere die Antikörperproduktion, während sie die Bildung von Th1-Zellen inhibieren (Gazzinelli et al. 1992; Mosmann et al. 1996). Umgekehrt hemmt  $\text{IFN}\gamma$  aus Th1-Zellen bzw. NK-Zellen die Differenzierung von Th2-Zellen. So findet eine Polarisierung der Lymphozyten statt.

Auch die Th1-Immunantwort unterliegt einer Gegenregulation, die bereits in der Frühphase der Infektion eingeleitet wird. NO aus Makrophagen induziert die Apoptose in Th1-Zellen (Gazzinelli et al. 1996a). Können sich mehr Th2-Zellen entwickeln, sorgt das von ihnen sezernierte IL-4 und IL-10 zusammen mit dem von Makrophagen gebildeten IL-10 dafür, daß die Differenzierung weiterer Th2-Zellen gefördert und die Produktion von IL-12 in Makrophagen und DC gehemmt wird.

Die Bedeutung einer Th1-Immunantwort für das Überleben des Wirtsorganismus nach *T. gondii*-Infektion wurde durch den adoptiven Transfer von Toxoplasma-spezifischen Th1-Lymphozyten in Toxoplasmose-suszeptible Mäuse gezeigt (Khan et al. 1996). So immunisierte Mäuse widerstehen einer sonst tödlichen Infektion mit dem Parasiten.

$\text{CD8}^+$  T-Zellen, deren Differenzierung aus Vorläuferzellen ebenfalls IL-12-abhängig ist, können als zytotoxische T-Lymphozyten direkt infizierte Wirtszellen durch Perforin-abhängige Zytolyse zerstören. Ob allerdings bei der Wirtszellyse intrazelluläre Parasiten überleben oder abgetötet werden, ist unklar (Khan et al. 1991; Nakano et al. 2001b). Insgesamt wird der zytolytischen Aktivität für die Immunkompetenz des Wirtes eine geringere Bedeutung zugemessen als der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, denn Perforin knock-out (KO)-Mäuse überleben durchaus eine Infektion mit *T. gondii* (Walsh et al. 1994; Denkers et al. 1997b), während  $\text{IFN}\gamma$  KO-Mäuse eine vergleichbare Infektion nicht überleben (Scharton-Kersten et al. 1996; Denkers et al. 1997a).  $\text{CD8}^+$  T-Zellen sind aber auch in der Lage  $\text{IFN}\gamma$  zu sezernieren.

Besonders  $\text{CD8}^+$  T-Zellen erhalten die Immunität des Wirts aufrecht, während  $\text{CD4}^+$  T-Zellen die Hauptrolle bei der Entstehung der Immunität spielen, unter anderem indem sie IL-2, welches für die Reifung von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen notwendig ist, produzieren

(Kobayashi et al. 1989; Gazzinelli et al. 1991a; D'Andrea et al. 1992). Allerdings zeigten neuere Untersuchungen, daß CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Tieren ohne das 'common cytokin receptor  $\gamma$ -chain' Gen, die kaum NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen, durchaus die Rolle der IFN $\gamma$ -produzierenden Effektorzellen übernehmen können (Scharton-Kersten et al. 1998).

Hat einmal eine Umwandlung der Tachyzoiten in Bradyzoiten stattgefunden, geht die Infektion in eine chronische Phase über. Während der chronischen Phase der Infektion ist eine kontinuierliche kompetente Immunantwort notwendig, sonst kommt es zu einer Reaktivierung der Infektion. Dies wurde an chronisch infizierten Tieren gezeigt, bei denen die Gabe von anti-IFN $\gamma$ -Antikörper und anti-TNF $\alpha$ -Antikörper zu einer Erhöhung der Zahl freier Tachyzoiten und einer gesteigerten Menge an Gewebezysten führte (Denkers et al. 1998). Ebenso ist eine kontinuierliche Präsenz von IL-12 während der chronischen Phase notwendig, um die einmal aufgebaute Immunität aufrechtzuerhalten. Yap et al. (2000) zeigten, daß in dieser Phase der Infektion die T-Zell-abhängige IFN $\gamma$ -Produktion ohne IL-12 ausbleibt. Infizierte Tiere verstarben dann an einer Enzephalitis. Ob die Immunantwort verhindert, daß Bradyzoiten in Tachyzoiten konvertieren, oder ob spontan entstandene Tachyzoiten rasch wieder kontrolliert werden, konnte bisher experimentell nicht unterschieden werden.

Zusätzlich zu der zellvermittelten Immunität spielt in der chronischen Phase der Infektion auch die humorale Immunität eine Rolle, deren Bedeutung noch widersprüchlich eingestuft wird.

B-Zellen produzieren Antikörper, die das Eindringen der Toxoplasmen in die Wirtszellen verhindern und die Phagozytose der Parasiten durch Makrophagen erleichtern können. Ein Transfer von Serum chronisch infizierten Tieren auf naive Empfänger reicht jedoch nicht aus, um diese vor einer nachfolgenden Toxoplasmeninfektion zu schützen (Frenkel 1967). Auch können Tiere nach Neutralisation von IgM eine Infektion noch immer kontrollieren (Reyes und Frenkel 1987), und das Opsonieren von Tachyzoiten durch IgG kann die Penetration in Makrophagen und die intrazelluläre Vermehrung in manchen Fällen nicht verhindern (Fadul et al. 1995).

Neuere Versuche an B-Zell-defizienten Tieren, welche die chronische Phase der Infektion nicht überlebten, konnten jedoch die Bedeutung Antikörper-vermittelter Abwehrmechanismen aufzeigen (Kang et al. 2000; Sayles et al. 2000). Insbesondere die Rolle von IgA-Antikörpern als Element der Mucosa-vermittelten Immunität bei einer oralen Infektion scheint von Bedeutung (Chardes et al. 1990).

### **2.3.3 Interaktion zwischen Toxoplasmen und Makrophagen**

Die Wirtszellinvasion ist ein Prozess, der eine auf Aktin-Myosin basierende parasitäre Motilität erfordert, um aktiv die Wirtszelle zu penetrieren (Dobrowolski et al. 1996). Beim Eindringen in die Wirtszelle stülpt sich die Zellmembran der Zelle um den Parasiten und wird als Membran der parasitophoren Vakuole von der übrigen



Zellmembran weg in Richtung des Zellkerns mitgenommen. Dort wird die Vakuole von Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum umrahmt (Sinai et al. 1997). Diese parasitophore Vakuole entgeht der Fusion mit Endosomen bzw. Lysosomen, weshalb das Milieu in der Vakuole neutral bleibt (pH 6,8) (Mordue et al. 1997; Mordue et al. 1999a; Mordue et al. 1999b).

Während des Invasionsprozesses und der Bildung der parasitophoren Vakuole sezernieren Microneme, Rhoptrien und 'dense granules' (GRA) in genau regulierter Weise (Carruthers et al. 1997). Proteine aus den Micronemen, wie der MIC2-M2AP-adhesives Protein Komplex, sind für eine schnelle Invasion notwendig - eine Invasion dauert weniger als 30 Sekunden (Carruthers et al. 1999; Garcia-Reguet et al. 2000; Brecht et al. 2001; Huynh et al. 2003; Carruthers et al. 2002). Die Inhalte der Rhoptrien werden während der Penetration in das Zytoplasma sezerniert und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung der parasitophoren Vakuole (Hakansson et al. 2001).

Sobald die Invasion abgeschlossen ist, finden weitere Rezeptionsprozesse statt, um die Vakuole an die Bedürfnisse des Parasiten anzupassen (Sibley et al. 1988; Charif et al. 1990; Beckers et al. 1994). Transmembranäre Proteine der Wirtszellmembran werden entfernt (Mordue et al. 1999a) und parasitäre Proteine eingebaut, wie z.B. transmembranäre Proteine die den freien Fluß von Molekülen bis 1300 Da erlauben und so die Versorgung der Parasiten mit Nährstoffen ermöglichen (Schwab et al. 1994).

Ganz anders stellt sich die Situation dar, wenn der Tachyzoit mit spezifischen Antikörpern opsonisiert ist (Joiner et al. 1990; Mordue et al. 1997). Ein solcher Erreger wird mittels Rezeptor-vermittelter Phagozytose von der Zelle aufgenommen und die so entstandene Vakuole verschmilzt mit Endosomen und Lysosomen. Der Inhalt der Vakuole wird angesäuert und der Erreger lysiert (Sibley et al. 1999). Dennoch kann das Opsonisieren von Tachyzoiten durch IgG nicht immer die Penetration in Makrophagen verhindern (Fadul et al. 1995).

*T. gondii* greift auch in die Signalwege der Immunantwort einer infizierten Zelle ein. Durch Blockade des Transportes von 'nuclear factor'  $\kappa$ B in den Nukleus wird die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12 gestoppt (Butcher et al. 2001). Der zugrundeliegende Mechanismus besteht wahrscheinlich in einer unspezifischen Blockade des nuklearen Importes, möglicherweise durch 'heat shock' Proteine (Feinstein et al. 1997). Vermutlich über den gleichen Mechanismus wird auch der IFN- $\gamma$  getriggerte 'signal transducer and activator of transcription' 1 an der Translokation in den Kern gehindert (Lüder et al 2001), und es kommt zu einer Abnahme der MCH Klasse II Expression. Das hat eine reduzierte Antigenpräsentation an T-Lymphozyten zur Folge (Lüder et al 1998).

### **2.3.4 Antigenität von *Toxoplasma gondii***

Als intrazellulärer Parasit entzieht sich *T. gondii* dem direkten Angriff des humoralen Immunsystems, die Hauptsäule der Immunabwehr liegt damit beim zellulären System.

Dennoch wurde für einige Proteine des Parasiten gezeigt, daß sie in der Lage sind, eine antigene Aktivierung von T-Zellen zu induzieren.

Das 'surface antigen' 1 ist ein Oberflächenprotein der Tachyzoiten, welches eine starke T- und B-Zell Antwort hervorruft (Khan et al. 1988). Mit diesem Protein wurden Mäuse, unter Zuhilfenahme entsprechender Adjuvantien, erfolgreich immunisiert (Bulow et al. 1991; Khan et al. 1991).

Ferner sind für viele exkretorisch/sekretorische Proteine des Parasiten antigene Eigenschaften beschrieben. Das gilt sowohl für Proteine aus den Rhoptrien (Saavedra et al. 1991a und 1991b), als auch für GRA Proteine (Duquesne et al. 1991; Brinkmann et al. 1993; Chardes et al. 1993). Solche exkretorisch/sekretorische Antigene (ESA) konnten zum Teil erfolgreich für Impfungen herangezogen werden (Sharma et al. 1984). Interessanterweise können ESA *in vitro* durch Inkubation von Tachyzoiten in zellfreiem Medium gewonnen werden (Cesbron-Delauw et al. 1996; Fischer et al. 1998b und diese Arbeit).

Da ESA sowohl von Bradyzoiten als auch von Tachyzoiten sezerniert werden, könnte ihnen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Immunität in der chronisch/latenten Phase einer Infektion zukommen (Capron et al. 1988).

## **2.4. Die Mäusegenetik vor dem Hintergrund einer *T. gondii*-Infektion**

### **2.4.1 Der 'Major Histocompatibility Complex' der Maus**

Der 'major histocompatibility complex' (MHC) ist ein genomischer Abschnitt, den jedes Säugetier trägt und dessen Produkte, die MHC-Moleküle, für die interzelluläre Erkennung und die Selbst/Fremd-Unterscheidung essentiell sind. Dem MHC kommt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung sowohl der humoralen als auch der zellgebundenen Immunität zu.

In der Maus liegen die Gene des MHC in einem langen kontinuierlichen Abschnitt auf Chromosom 17, der als H-2 Komplex bezeichnet wird. Dieser MHC ist unterteilt in Regionen, deren Gene für verschiedene Molekülklassen kodieren: MHC Klassen I bis III.

In der Klasse I Region liegen die Gene K, D und L. Diese Gene kodieren für Glycoproteine, die auf der Oberfläche fast jeder kernhaltigen Zelle liegen und antigene Peptide an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren. Klasse II-Gene (Region IA und IE) kodieren für Glycoproteine auf antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, DC, B-Zellen), die zur Präsentation antigener Peptide für Th-Zellen dienen.

Klasse III-Gene (Region S) kodieren unter anderem für Proteine des Komplementsystems sowie für die Zytokine TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ .

Bei Inzuchtmäusen sind die H-2 Loci homozygot und verschiedene Inzuchtstämme werden nach dem Haplotyp, für den deren Gene kodieren, bezeichnet (Kuby 1994).

### 2.4.2 Suszeptibilität/Resistenz von Mäusen gegenüber einer *T. gondii*-Infektion

Erste Studien zum Einfluß des genetischen Hintergrunds auf das Überleben von Mäusen nach Infektion mit Toxoplasmen wurden 1976 von Araujo et al. durchgeführt (Araujo et al. 1976). Später wurde gefunden, daß Suszeptibilität bzw. Resistenz gegen *T. gondii* mit dem H-2 Haplotyp korreliert: so sind Mäuse mit dem H-2*b* Haplotyp suszeptibel und solche mit dem H-2*a* (McLeod et al. 1989) oder H-2*d* Haplotyp resistent (Suzuki et al. 1991). Mit Hilfe kongener Mausstämmen wurde die Resistenz bezüglich der Entwicklung einer Toxoplasmen-Enzephalitis zunächst auf die D-Region des H-2 Komplex eingegrenzt (Suzuki et al. 1991). Später wurde das H-2L-Gen eindeutig als Resistenzgen identifiziert (Brown et al. 1995). Mäuse, die das H-2L-Gen im *d*-Haplotyp tragen, haben weniger Gewebezysten und weniger enzephalitische Veränderungen als solche Mäuse ohne das entsprechende Allel.

Auch Gene außerhalb des H-2 Komplex stehen im Verdacht zur Suszeptibilität/Resistenz gegen *T. gondii* beizutragen, so z.B. der H-13 Locus auf Chromosom 2 und der Wnt1 Locus (McLeod et al. 1993).

## 2.5. Das Zytokin IL-12

Interleukin 12 wurde ursprünglich als ein Faktor identifiziert, der durch humane Epstein-Barr Virus transformierte B-Zell Linien produziert wird. Gleichzeitig wurde es von einer anderen Gruppe als 'natural killer cell stimulatory factor' charakterisiert (Lamont et al. 1996).

IL-12 hat eine heterodimere Struktur und besteht aus zwei N-glycosylierten Polypeptidketten von ungefähr 40 kD (p40) und 35 kD (p35), die mittels einer Disulfidbrücke zum bioaktiven Molekül IL-12p70 verbunden sind. Menschliches p40 besteht aus 306 Aminosäuren und p35 aus 197 Aminosäuren. Murines p40 hat 70%ige, p35 60%ige Identität mit dem humanen Molekül. Murines IL-12 zeigt sowohl in Mäusen als auch in Menschen Aktivität, das humane Molekül allerdings nur bei Menschen (Wolf et al. 1991; Schoenhaut et al. 1992).

Bestimmte Anteile der IL-12p35 Sequenz ähneln stark der Sequenz von IL6 und Granulozyten Kolonie-Stimulierendem Faktor, was darauf schließen läßt, daß p35 mit diesen Zytokinen gemeinsamer Abstammung ist (Merberg et al. 1992).

Der p35 Anteil ist an der Rezeptorbindung beteiligt und determiniert größtenteils die Bioaktivität von IL-12 (Zou et al. 1995), während p40 hauptsächlich für die Rezeptorbindung wichtig ist, ohne ein biologisches Signal zu induzieren (Lamont et al. 1996). Um das bioaktive IL-12 Heterodimer zu erzeugen, ist die Synthese beider Ketten innerhalb einer Zelle notwendig (Gubler et al. 1991).

Ein Homodimer aus zwei p40 Molekülen bindet an den IL-12 Rezeptor mit einer ähnlich hohen Affinität wie das IL-12 Heterodimer und kann dessen biologische Wirkung sehr wirksam inhibieren (Gillesen et al. 1995). Es sind 10 bis 100fache Überschüsse an IL-12(p40)<sub>2</sub> nötig, um eine 50 bzw. 90%ige Reduktion der IL-12-Wirkung zu erzie-

len (Germann et al. 1995). In der Tat wird 10- bis 100mal mehr IL-12p40 gebildet als bioaktives IL-12p70 (D'Andrea et al. 1992; Cassatella et al. 1995). Inwieweit diese Tatsache einen biologischen Regulationsmechanismus darstellt, ist nicht völlig geklärt.

## 2.6. Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von Vorbefunden, daß nicht nur lebende *T. gondii* Parasiten sondern auch deren Bestandteile in der Lage sind, eine Zytokinantwort in murinen Makrophagen zu induzieren, stellte sich die Frage, inwieweit ein Lysat aus Toxoplasmen auch diese Aktivität besitzt. Sollte eine reproduzierbare und stabile Aktivität gefunden werden und diese einem Protein zugeordnet werden können, so wäre eine weitere Charakterisierung und Isolierung des Moleküls denkbar.

Arbeiten mit exkretorisch/sekretorischen Produkten von *T. gondii* haben die Bedeutung von ESA für das intrazelluläre Überleben des Erregers gezeigt. Dementsprechend sollte geprüft werden, ob die IL-12-induzierende Aktivität des Erregers über ein exkretorisch/sekretorisches Produkt vermittelt wird.

Stimuliert man Makrophagen verschiedener Mausstämme mit Toxoplasmen zeigen sich quantitative Unterschiede in der IL-12 Antwort. Werden Makrophagen eines Mausstammes mit verschiedenen Toxoplasmenisolaten stimuliert, werden ebenso unterschiedliche IL-12 Antworten bestimmt. Diese Beobachtungen sollten systematisch überprüft und ein Einfluß des genetischen Hintergrundes der Mäuse wie auch der Toxoplasmen auf die IL-12-Induktion in Makrophagen herausgearbeitet werden.

Diese *in vitro* erhobenen Befunde sollten mit *in vivo* Eigenschaften von Mäusen und Toxoplasmen korreliert werden. Dazu gehört die Suszeptibilität bzw. Resistenz von unterschiedlichen Mausstämmen einer Toxoplasmosis gegenüber und die hohe bzw. niedrige Virulenz von unterschiedlichen Toxoplasmenisolaten im Rahmen einer Infektion von Mäusen.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Sterile Werkbank

Gelaire HF BSB 4A (Flow Lab., Meckenheim)

CO<sub>2</sub>-begaster Brutschrank

EK/CO<sub>2</sub> B5060 (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge

J6B (Beckmann, München), Rotanta 96 RC (Hettich, Tuttlingen)

Tischzentrifuge

15415 C (Eppendorf, Hamburg)

Waagen

Precisa 600C (Oehmen Labortechnik, Essen)

JL-180 (Chyo Balance Corp., Kyoto, Japan)

pH-Meter

761 Calimatic (Knick, Berlin)

Magnetrührer

IKAmag RCT (Janke & Kunkel, Staufen)

Tischrüttler

Vortex VF2 IKA (Janke & Kunkel)

Wasserbad

Typ 3041 (Köttermann, Häningsen)

Heizblock

TCS-Metallblock-Thermostat (Barkey, Bielefeld)

Horizontale Elektrophoresekammer

(Schleicher & Schüll, Dassel)

Mikroskope

Zeiss IM35, Zeiss Axiovert 100 (Carl Zeiss, Jena)

ELISA-Photometer

SLT Spectra (SLT Labinstruments, Crailsheim)

FACScan

Becton Dickinson (Heidelberg)

Beta Counter

1205 Betaplate (LKB Wallac, Turku, Finnland)

Dampfdrucksterilisator

Autoklav P23 (Melag, Düsseldorf)

French Press

mini French Press Aufschlußzelle und Presse (SLM, Urbane, USA)

Netzgeräte

PS 3002, PS ST 504 und PS LKB GPS 200/400 (Gibco BRL, Eggenstein),

### 3.1.2 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden, falls nicht anders angegeben, steril bezogen.

Bakteriologische Petrischalen (Greiner, Nürtingen)

Ø 10 cm, zur Adhärenz von Peritonealmakrophagen.

Zellschaber (Greiner, Costar)

Zellkulturflaschen (Costar Tecnomara, Fernwald)

25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> mit belüfteten Deckel, zur Kultivierung von Fibroblasten und Toxoplasmen

Mehrfachkulturschalen

24 well-Platten mit Transwelleinsätzen mit 0,1 µm Porengröße (Costar) für Ko-Kulturen

48 well-Platten (Costar) für Stimulationsansätze

Mikrotiterplatten

96 well-Platten (Greiner) für Proliferationsansätze

96 well-ImmunoPlate MaxiSorp F96, unsteril (Nunc, Wiesbaden) für ELISA

Zentrifugenröhrchen

15 ml Spitzboden (Sarstedt, Nümbrecht), 50 ml Spitzboden (Greiner)

PS-Rundbodenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson) für FACS-Färbungen

Cryotubes

1,8 ml (Nunc, Wiesbaden) zur Kryokonservierung von Zellen

Eppendorf-Caps, unsteril

0,75 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf)

Einmalspritzen

1 ml (Ersta, Asik, Dänemark), 5 ml, 10 ml, 20 ml (Luer Amefa, Kriftel)

10 ml Plastikpipetten (Greiner)

Kanülen

0,4 x 12 mm (Sherwood Medical, Schwalbach),

0,9 x 40 mm, 1,2 x 40 mm (Becton Dickinson, Heidelberg)

Einmalspitzen

10 µl (Eppendorf), 200 µl (Polylab, Seoul, Korea) und 1000 µl (Greiner)

Sterilfilter (Millipore, Molsheim, Frankreich)

### 3.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia/Uppsala, Schweden, Merck/Darmstadt, Roth/Karlsruhe und Sigma/Deisenhofen in p.A.-Qualität bezogen. Kulturmedien und Zusätze wurden, falls nicht anders angegeben von den Firmen Gibco/Eggenstein, Boehringer/Mannheim und Amersham Pharmacia bezogen. Das Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit einer Anlage der Firma Millipore entmineralisiert.

### 3.1.4 Zellkulturmedien

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) mit Phenolrot als pH-Indikator wurde in Form von Trockenpulver von Gibco (BRL, Eggenstein) bezogen, in aqua dest. gelöst und mit 3,024 g/l NaHCO<sub>3</sub> sowie 50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) versetzt. Anschließend wurde das Medium über 0,2 µm Membranfilter (Millipore, Bedford, MS, USA) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Zur Kultivierung aller Nicht-Mφ Zellen wurde IMDM mit 2 mM L-Glutamin (Gln, Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) und 5% hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min), fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert.

Zur Kultivierung von Mφ wurde obiges Medium mit 10% statt 5% FCS supplementiert. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) Basismedium ohne Phenolrot wurde mit 2 mM L-Glutamin und 10% FCS supplementiert und für die Kultur von Hirnzellen verwendet.

PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.3, steril) für die Anwendung in der Zellkultur wurde von Serag Wiessner, Naila bezogen.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1 Zellpräparationen

#### 3.2.1.1 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gezüchtet. Ursprünglich wurden Zuchtpaare der Mausstämme C57BL/10, BALB/c und BALB.B aus dem Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover, bezogen; Mäuse der Stämme C57B/6, CBA, C3H/J, A/J, DBA/2 und BALB/c H-2<sup>dm2</sup> wurden aus den Biologischen Forschungslaboratorien, Füllinsdorf, Schweiz bezogen. Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Für die Präparation von Peritonealmakrophagen, adulten Hirnzellen und zur Passage von Toxoplasmen wurden Mäuse im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Für die Gewinnung neonataler Hirnzellen wurden neugeborene Mäuse im Alter von 0-2 Tagen präpariert.



### 3.2.1.2 Peritonealexsudat-Makrophagen

Durch intraperitoneale Injektion von 1 ml sterilem 1%igem Thioglycollat-Medium (Difco/Detroit, USA) wurde die Einwanderung inflammatorischer Makrophagen in die Bauchhöhle der Maus induziert. Vier Tage später wurde das Tier getötet und die Bauchwand unter Schonung des Peritoneums eröffnet. Anschließend wurde die Bauchhöhle mehrfach mit 10 ml eiskaltem Medium (IMDM, 2 mM Gln, 1 mM Pyruvat, 5% FCS) gespült und die so gewonnene Zellsuspension in einer Petrischale für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden mit dem Überstand abgesaugt, adhärenente Zellen mit eiskaltem Medium abgespült und zweimal gewaschen. Die Population adhärenenter Zelle enthält über 95% Makrophagen (Beller et al. 1980). Die durchschnittlichen Ausbeute betrug  $5 \times 10^6$  Zellen/Maus. Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C3H  $L^d$  wurden uns von R. McLoad, University of Chicago, zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte wie hier beschrieben. Die Zellen für die einzelnen Versuchsansätze wurden aus Tieren des gleichen Alters und Geschlechtes gewonnen.

### 3.2.1.3 Neonatale Hirnzellen

Hirnzell-Primärkulturen wurden für die Vermehrung zystenbildender *T. gondii*-Isolate benötigt. Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeit besser für die Kultivierung der langsam wachsenden Toxoplasmen als L929-Zellen. Zur Präparation von Hirnzellen wurden neugeborene Mäuse (0-2 Tage alt) verwendet.

Bei einer durch CO<sub>2</sub>-Insufflation getöteten Maus wurde der Kopf abgetrennt, die Kopfhaut abgelöst und nach Entfernung der Schädelkalotte das Gehirn entnommen. Anschließend wurde der Kortex der Großhirnhemisphären abgelöst, unter dem Mikroskop von den Hirnhäuten befreit und mit eiskaltem Medium (DMEM, 2 mM Gln, 10% FCS) bedeckt. In einem nächsten Präparationsschritt wurde das Hirngewebe mit einer Schere zerkleinert und zweifach durch Zugabe von eiskaltem Medium und anschließender Sedimentation (10 min auf Eis) gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml Medium mit 0,3 U/ml Kollagenase D (Boehringer Mannheim) aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Sediment mit 0,2 mg/ml DNAse I (Boehringer Mannheim) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurden die Zellen zweimal mit kaltem Medium gewaschen und mit einer Zelldichte von  $2-4 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturplatten oder 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät.

## 3.2.2 Zellkulturen

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Langzeitkultivierte Zellen und Toxoplasmenkulturen wurden regelmäßig nach dem Verfahren von Schmitt et al. (1988) auf Kontamination durch Mykoplasmen getestet.



### 3.2.2.1 Fibroblasten

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten-Linien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) bezogen. Zur Kultivierung wurde IMDM mit 2 mM GlN, 1 mM Na-Pyruvat und 5% FCS verwendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4–6 x 10<sup>4</sup>/ml in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät und nach Ausbildung eines dichten Zellrasens mit Hilfe eines Zellschabers geerntet.

Die aus murinem Subkutangewebe isolierte Fibroblastenlinie L929 (Sanford et al. 1948) wurde nach 2–3 Tagen Kultur bei einer Zelldichte von etwa 10<sup>6</sup> Zellen/ml bzw. 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> passagiert. Diese schnellwachsenden Fibroblasten dienen als Wirtszellen für *T. gondii* Tachyzoiten.

Die Fibroblastenlinie HS27 entstammt normal differenzierter Haut eines Menschen (Suss-Toby et al. 1996). Diese langsam wachsenden, stark adhären Zellen wurden in Intervallen von 1-2 Wochen (2 Mediumwechsel/Woche) mit Hilfe von Trypsin/EDTA (0.05% Trypsin/0.02% EDTA von Biochrom/Berlin, 15 min, 37°C) bei einer Zelldichte von etwa 2–3 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml geerntet und als Wirtszellen für zystenbildende *T. gondii*-Isolate verwendet.

### 3.2.2.2 Toxoplasmen

Die für diese Arbeit verwendeten *T. gondii*-Isolate wurden uns von M. Saathof, Inst. für Med. Parasitologie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung der Toxoplasmen erfolgte sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* durch Passage in Mäusen.

#### 3.2.2.2.1 Stamm BK

Das *T. gondii*-Isolat BK (speziesinterne Gruppe I) wurde ursprünglich aus dem Liquor eines an Toxoplasmose erkrankten Kindes gewonnen (Winser et al., 1948). Eine Infektion mit diesen Toxoplasmen verläuft in Mäusen letal.

Zur Kultivierung wurden L929-Fibroblasten in IMDM (2 mM GlN, 1 mM Na-Pyruvat, 5% FCS) mit einem Wirtszell-Parasit-Verhältnis von 1/10 infiziert. Zwei bis drei Tage nach Infektion waren alle Wirtszellen lysiert. Extrazelluläre Toxoplasmen wurden durch Zentrifugation (5 min, 50 x g, RT) weitgehend von Wirtszellen und Debris befreit und dann in einem zweiten Zentrifugationsschritt (15 min, 600 x g, RT) aus dem Überstand sedimentiert.

Zur Kontrolle und um Toxoplasmen zu erhalten, welche eher den natürlich vorkommenden gleichen, wurde dieses Isolat auch *in vivo* passagiert. Dazu wurden einer Maus 10<sup>7</sup> Tachyzoiten in 500 µl PBS intraperitoneal injiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurde die Maus getötet, die Bauchwand unter Schonung des Peritoneums eröffnet, und die Bauchhöhle zweimal mit 7 ml 37°C warmem PBS gespült. Die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Parasiten wurden in PBS gewaschen (15 min, 600 x g, RT).

#### 3.2.2.2.2 Stamm DX

Der *T. gondii* Stamm DX (speziesinterne Gruppe II) wurde ursprünglich aus einem an Toxoplasmose erkrankten Schwein isoliert (Schlüter et al. 1991). Eine Infektion mit diesen Toxoplasmen führt bei Mäusen zu einer chronischen Toxoplasmose mit Bildung

von Gewebezysten.

Für die Vermehrung dieser auch *in vitro* zystenbildenden Toxoplasmen wurden Kulturen neonataler muriner Hirnzellen oder HS27 Zellen verwendet. Aufgrund ihres langsamen Wachstums eignen sich diese Zellen besser als Wirtszellen für die Kultivierung der sich langsam vermehrenden Toxoplasmen als die vergleichsweise schnell wachsende Zelllinie L929. Konfluente Wirtszellkulturen wurden mit 0,1-1 Bradyzoiten/Zelle inokuliert. Innerhalb der folgenden 2-3 Wochen entwickeln sich intrazelluläre Zysten. Zystenhaltige Wirtszellen wurden durch vorsichtiges Resuspendieren geerntet und abzentrifugiert (5 min, 50 x g, Raumtemperatur). Das Sediment wurde in 200 µl PBS aufgenommen und mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Enzymbehandlung wurden die enzymstierten Bradyzoiten innerhalb von 10-20 min freigesetzt. Nach vollständiger Lyse der Zysten (mikroskopische Kontrolle) wurde der Prozeß durch Zugabe von 300 µl FCS gestoppt und die Toxoplasmen in Kulturmedium gewaschen. Durchschnittlich wurden pro Zyste zwischen 500 und 1000 Bradyzoiten gewonnen.

Für die *in vivo* Passage wurden erwachsene Mäuse mit 3-5 gereinigten Gehirnzysten in 100 µl PBS intraperitoneal infiziert. In der chronischen Phase der Infektion (etwa 4 Wochen post infectionem) wurden die Gehirne dieser Mäuse entnommen und mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in 15 ml Medium (DMEM, 2 mM Glu, 10% FCS) aufgenommen, mit 10 ml Ficoll-Paque unterschichtet und für 30 min bei 800 x g, 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Im Sediment befindliche Zysten wurden nach Lyse der Erythrozyten in 0,83% NH<sub>4</sub>Cl (2 ml, 3 min, RT) gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Aus einer BALB/c Maus wurden etwa 4 Wochen nach Infektion durchschnittlich 1000 Zysten gewonnen.

Toxoplasmen des DX Stammes bilden unter den oben genannten *in vitro* Bedingungen zwar hauptsächlich zystenbildende Formen (Bradyzoiten) aber ein kleiner Anteil an Toxoplasmen, welche die Wirtszellen lysieren, wurde separat kultiviert. Diese Tachyzoiten wurden durch weitere Passagen in Wirtszellekulturen vermehrt und auf ein schnelles Wachstum hin selektioniert.

#### 3.2.2.2.3 GFP exprimierende Toxoplasmen

Toxoplasmen des Stammes RH (speziesinterne Gruppe I), welche stabil ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren (Striepen et al. 1998), wurden uns von Boris Striepen, Athens, Georgia, USA zur Verfügung gestellt.

Das GFP stammt aus der pazifischen Qualle *Aequoria victoria* und ist ein natürlich fluoreszierendes Protein. Toxoplasmen, die dieses Protein exprimieren, können leicht mittels eines 'Fluorescence-activated Cell Sorter' (FACS) identifiziert werden, und zwar nicht nur als extrazelluläre Parasiten, sondern auch nach Invasion der Wirtszellen.

Die Kultivierung dieser Parasiten erfolgte wie in 3.2.2.2.1 für die Kultur der Toxoplasmen des Stammes BK beschrieben.

### 3.2.3 Toxoplasmenproliferationstest

Die intrazelluläre Toxoplasmenproliferation wurde über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uracil in die parasitären Nukleinsäuren gemessen. Toxoplasmen besitzen im Gegensatz zu Säugerzellen das Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase und sind somit in der Lage externes Uracil für die Nucleotidsynthese zu nutzen (Pfefferkorn et al. 1977). Daher wird  $^3\text{H}$ -Uracil selektiv in die RNA und DNA intrazellulärer Parasiten eingebaut. Zur Quantifizierung der Toxoplasmenproliferation wurden Peritonealexsudat-Makrophagen in 96 well-Platten mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro well ausgesät und mit 0,16 bis 20 Toxoplasmen/Wirtszelle infiziert. Nach 16 Stunden wurden die Ansätze mit 1  $\mu\text{Ci/well}$  (37 kBq/well)  $^3\text{H}$ -Uracil ( $3',5'$ - $^3\text{H}$ -Uracil, 125  $\mu\text{Ci/ml}$ ) für 24 Stunden pulsmarkiert und dann bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren, um so die Zellmembranen zu zerstören und die Nukleinsäuren freizusetzen. Für die Messung des inkorporierten  $^3\text{H}$  wurden die Testkulturen aufgetaut und der Inhalt der wells mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter (Preprint Filtermat/LKB Wallac) übertragen. Die Filter wurden ca. 20 min bei  $100^\circ\text{C}$  in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) einzeln in Plastikfolie eingeschweißt. Die Auswertung erfolgte in einem Beta-Counter, der die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkov-Strahlung mißt und in 'counts per minute' (cpm) errechnet. Die Summe der pro Ansatz errechneten cpm gilt als Maß für die Stärke der Toxoplasmenproliferation. Für jede Versuchsbedingung wurden sechs Parallelansätze angelegt, deren arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung als Ergebnis angegeben ist.

### 3.2.4 Antigenpräparationen

#### 3.2.4.1 Herstellung eines Toxoplasmenlysates mittels French Press (TgL)

Frisch geerntete Toxoplasmen des Stammes BK wurden zweimal in PBS gewaschen (15 min, 600 x g,  $4^\circ\text{C}$ ) und in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^9$  Toxoplasmen/ml in PBS resuspendiert. In einer Aufschlußzelle (French Press) wurde die Toxoplasmensuspension bei einem Druck von 18000 psi (etwa 2565 bar) hohen Scherkräften ausgesetzt. Die mikroskopische Kontrolle der Präparation zeigte einen vollständigen Aufschluß der Toxoplasmen. Das auf diese Weise gewonnene Toxoplasmenlysate (TgL) wurde einer 20 minütigen UV-Bestrahlung unterzogen und durch zweifaches Zentrifugieren (15 min, 10000 x g,  $4^\circ\text{C}$  und 1 h, 100000 x g, RT) von nicht löslichen Bestandteilen befreit. Mittels der BCA-Methode wurde wie in 3.2.5 beschrieben der Proteingehalt der gewonnenen Überstände bestimmt. Durchschnittlich wurden 1 mg Protein aus  $10^9$  Toxoplasmen gewonnen.

#### 3.2.4.2 Herstellung eines wässrigen Toxoplasmenlysates (STAg)

Frisch geerntete Toxoplasmen des Stammes BK wurden zweimal in PBS gewaschen (15 min, 600 x g,  $4^\circ\text{C}$ ), und danach in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  schockgefroren. Die gefrorenen Pellets wurden aufgetaut und in aqua dest. zu einer Konzentration von

10<sup>9</sup> Parasiten/ml aufgenommen. Die Suspension wurde wiederholt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Nach zehn Einfrier/Auftau-Zyklen zeigte die mikroskopische Kontrolle der Präparation Toxoplasmendebris, der durch zweifaches Zentrifugieren (20 min, 800 x g, 4°C und 15 min 10000 x g, 4°C) entfernt wurde. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde der Überstand aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Durchschnittlich wurden 2 mg Protein aus 10<sup>9</sup> Toxoplasmen gewonnen.

#### **3.2.4.3 Herstellung eines Tachyzoiten-konditionierten Mediums (TkM)**

Frisch geerntete Toxoplasmen des Stammes BK wurden in IMDM (2 mM Gln, 1 mM Na-Pyruvat, 5% FCS) in einer Konzentration von 1x10<sup>8</sup> Toxoplasmen/ml aufgenommen und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Toxoplasmen und Debris durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, 600 x g, RT) pelettiert. Der klare Überstand wurde als Tachyzoiten-konditioniertes Medium abpipettiert.

#### **3.2.5 Bestimmung des Proteingehaltes**

Der Proteingehalt von Antigenpräparationen wurde nach der BCA-Methode (Smith et al. 1985) gemessen. Sie beruht auf einer Komplexbildung von Proteinen und Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die Cu<sup>2+</sup>-Ionen des Komplexes werden zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden, dessen Intensität der Proteinkonzentration proportional ist. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.5 µg Protein/ml.

Für den Test wurden die Proben seriell in PBS verdünnt. Rinderserumalbumin (Pierce) in einer Verdünnungsreihe von 20-2000 µg/ml PBS diente als Standard, PBS und die BCA-Gebrauchslösung als Leerwert. In Dreifach-Ansätzen wurden Standard bzw. Proben 1/10 mit BCA-Gebrauchslösung (Pierce) versetzt und in einer 96 well-Mikrotiterplatte für 30-60 min bei 37°C inkubiert. In einem ELISA-Photometer wurde die Extinktion der Ansätze bei 550 nm gemessen. Bei der Auswertung wurden die Extinktionswerte der Standardverdünnungen gegen deren Proteinkonzentration aufgetragen und aus der resultierenden Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe des Programms Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA) bestimmt.

#### **3.2.6 Proteinase K-Verdau (Lysate und TkM)**

Um Proteine ihrer biologischen Aktivität zu berauben, wurden diese einem Proteinase-K-Verdau ausgesetzt. Die Menge der zugesetzten Proteinase K wurde in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Proben so festgesetzt, daß ein vollständiger Proteinverdau zu erwarten war.

Zum Verdau des TgL mittels Proteinase K wurden 1,25 mg TgL mit 187,5 µg Proteinase K versetzt und für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Sodann wurden 200 µl FCS zugesetzt und weitere 60 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Proteinase K zu verbrauchen. Als Kontrolle wurde obiges Prozedere ohne den Zusatz

von TgL durchgeführt.

25 µg einer TgL-Probe, welches mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden sollte, wurde mit 6,25 µg Proteinase K versetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde im Brutschrank auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde durch Hinzufügen des SDS-PAGE Probenpuffers (25 % Glyzerin, 0,375 M Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, Bromphenolblau) die Proteinase K inaktiviert.

Zum Verdau des TkM wurden 200 µl TkM mit 1,25 µg Proteinase K versetzt und weiter analog zum TgL Verdau für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Sodann wurden 50 µl FCS zugesetzt und weitere 60 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Proteinase K zu verbrauchen. Analog wurde die Kontroll-Lösung hergestellt, wobei hier kein TgL zugestzt wurde.

### 3.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit diskontinuierlichen Gelen nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Nach Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Proteingemischen bilden sich stark negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode, wobei sie durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Trenngel: 12% Acrylamid, 0,32% Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% Ammoniumperoxodisulfat

Sammelgel: 3% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% Ammoniumperoxodisulfat

Zwischen zwei Glasplatten wurde ein 12% Polyacrylamidgel (0,5 mm bzw. 1,5 mm, Trennstrecke 11 cm) gegossen, welches mit n-Butanol überschichtet innerhalb von 30 bis 60 min polymerisiert. Nach Entfernung des n-Butanols wurde auf das feste Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die zu trennenden Proteine zum gleichmäßigen Einwandern in das Trenngel konzentriert werden. Die Proben wurden mit 0,2 Volumenanteilen des Probenpuffers (25% Glyzerin, 0,375 M Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95°C bzw. 15 min bei 80 °C erhitzt und umgehend auf das Gel aufgetragen.

Für die Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurde dem Probenpuffer 5% β-Mercaptoethanol zugefügt. Bei jeder SDS-PAGE wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (low molecular weight marker, Biorad, München) mitgeführt: Phosphorylase β (97,4 kD), bovines Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31 kD), Trypsininhibitor (21,5 kD), Lysozym (14,4 kD). Die Elektrophorese erfolgte in Kammerpuffer (50 mM Tris, 0,4 M Glycin, 0,1% SDS) bei 100 V im Sammelgel bzw. bei 250 V im Trenngel und wurde beendet, wenn die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.



### 3.2.7.1 Coomassie-Färbung

Die Färbung mit Coomassie Brillant Blau beruht auf der Anlagerung des Farbstoffes an die NH<sub>2</sub>-Gruppen von Proteinen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie Brillant Blau R-250 in 40% Ethanol, 7,5% Essigsäure) inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung (20% Ethanol, 7,5% Essigsäure). Mit dieser Methode können Proteinmengen von 200-400 ng/Bande nachgewiesen werden.

### 3.2.8 Bestimmung des Lipopolysaccharidgehaltes

Da Lipopolysaccharid (LPS) schon im Nanogrammbereich Makrophagen zur Produktion von IL-12 stimuliert, war es nötig, die Test-Stimuli auf Kontamination mit LPS zu kontrollieren. Zur Anwendung kam der *Limulus* Amöbozytenlysat (LAL)-Test, der die sensitivste Methode zur Bestimmung von Endotoxinen gram-negativer Bakterien darstellt. Es wurde das LAL-Kit von BioWhittaker verwendet. Der Test basiert auf der katalytischen Aktivierung eines Proenzym durch Endotoxin, welches dann in einer Farbreaktion ein chromogenes Substrat umsetzt. Der Farbumschlag wird bei 405-410 nm im Photometer gemessen.

Für die Durchführung des Tests wurde eine ELISA-Platte mit einem Probenvolumen von je 20 µl/well befüllt. Nach Zugabe von 20 µl/well LAL wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden 40 µl/well der Substrat-Lösung zugegeben und weitere 6 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer 10%igen (w/v) SDS-Lösung gestoppt. Alle Ansätze wurden als dreifache Parallelansätze durchgeführt.

Die Proben wurden austitriert und in Doppelbestimmungen gemessen. Alle LPS-Konzentrationen lagen deutlich unterhalb von 1 Endotoxin-Unit/ml, was, je nach LPS-Typ, einer Konzentration von 80-250 pg/ml entspricht.

### 3.2.9 Analyse der Zytokininduktion durch *T. gondii*

#### 3.2.9.1 Makrophagenstimulation *in vitro*

Frisch gewonnene Peritonealexsudat-Makrophagen wurden auf 48 well-Platten mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät. Es wurden entweder frisch gewonnene Toxoplasmen oder Toxoplasmenlysate in unterschiedlichen Mengen hinzugegeben. Die wells wurden mit IMDM (2 mM Gln, 1 mM Na-Pyruvat, 10% FCS) auf ein Volumen von jeweils 1 ml aufgefüllt. Die Platten wurden 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen. Alle Ansätze wurden mindestens als zweifache Parallelansätze durchgeführt.

#### 3.2.9.2 Transwell-Kokultur von Toxoplasmen mit Makrophagen

Frisch gewonnene Peritonealexsudat-Makrophagen wurden auf 24 well Platten mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät. Die wells wurden mit IMDM (2 mM Gln, 1 mM Na-

Pyruvat, 10% FCS) auf ein Volumen von jeweils 1 ml aufgefüllt. In diese wells wurden Transwelleinsätze mit einer Porengröße von 0,1 µm eingesetzt. Die Einsätze wurden mit frisch gewonnenen Toxoplasmen vom Stamm BK mit  $3 \times 10^7$  Parasiten in 100 µl obigen Mediums befüllt. Als Kontrolle wurden leere Transwells eingesetzt. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert. Nach 1 bis 3 h wurden die Transwelleinsätze entfernt und nach 24 h die Überstände aus den Kulturen gewonnen. Alle Ansätze wurden mindestens als zweifache Parallelansätze durchgeführt.

#### **3.2.9.3 Ex vivo Analysen nach Infektion von Mäusen mit Toxoplasmen**

Mäuse wurden intraperitoneal mit  $1 \times 10^5$  Toxoplasmen in 0,5 ml PBS infiziert. Nach 5 Tagen wurden die Tiere getötet und die Bauchwand unter Schonung des Peritoneums eröffnet. Anschließend wurde die Bauchhöhle mehrfach mit insgesamt 2 ml PBS gespült. In der so gewonnenen Spüllösung wurden Zytokine bestimmt.

#### **3.2.10 Zytokin-enzyme-linked immunosorbent assays**

ELISAs sind Mikrotiterplattentests zum Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern. Dabei werden Antigene, bzw. beim Sandwich-ELISA Antigen-spezifische Antikörper, an die Polystyrol- oder Polyvinylchlorid-Oberfläche spezieller Mikrotiterplatten gekoppelt und anschließend mit Antikörpern bzw. Antigen inkubiert. Gebundene Primärantikörper bzw. Antigene werden mit Hilfe von enzym-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Der Nachweis der Bindung der Sekundärantikörper erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion.

Es wurden ELISA Kits der Firma Genzyme, Cambridge, USA eingesetzt und entsprechend den beiliegenden Protokollen benutzt.

IL-12: Total Mouse IL-12 Duo Set, Part # 80-4400-00

IL-12p70: Mouse IL-12 p70 Duo Set, Part # 80-4365-00

IL-1 $\alpha$ : Mouse IL-1 $\alpha$  ELISA Kit, Part # 1900-01

IL-10: Mouse IL-10 ELISA Kit, Part # 80-3749-01

#### **3.2.11 FACS-Analyse**

Der 'Fluorescence-activated Cell Sorter' (FACS) ermöglicht es, Zellen, welche Fluorochrom-markiert sind, zu zählen. Die Zellen werden in die Probenkammer des FACS eingefüllt. Nun werden durch einen kleinen vibrierenden Auslaß Mikrotropfen erzeugt, welche jeweils eine einzige Zelle enthalten. Diese Tropfen fallen durch einen Laserstrahl, welcher das Fluorochrom anregt. Die Intensität der Fluoreszenz, die jeder einzelne Tropfen ausstrahlt, wird von einem Detektor gemessen und auf einem Oszilloskop dargestellt.

Frisch gewonnene Peritonealexsudat-Makrophagen wurden in einem Medium ohne Phenolrot in unterschiedlichen Wirtszell/Parasit-Verhältnissen mit Toxoplasmen des Stammes RH, welche GFP exprimieren, versetzt. Nach 1 Stunde wurden extrazelluläre Parasiten entfernt. 16 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen in PBS mit 1%

EDTA gewaschen, geerntet und mit einem FACScan (Becton Dickinson) analysiert. Pro Probe wurden 10.000 Ereignisse aufgezeichnet und mittels der Lysis II Software (Becton Dickinson) analysiert. Die Ergebnisse sind angegeben als Histogramm der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. Zellen aus uninfizierten Kontrollen wurden benutzt, um das Autofluoreszenz-Hintergrundsignal zu ermitteln.

### **3.3. Statistik**

Alle Experimente wurden dreimal oder öfter wiederholt und die Proben doppelt gemessen. Die präsentierten Daten stellen mittlere Werte samt Standardabweichungen aus repräsentativen Experimenten dar. Paarweise Vergleiche zwischen den Werten wurden mittels des Student t Tests unter Berücksichtigung unterschiedlicher Varianzen vorgenommen. Unterschiede wurden, wenn nicht anders angegeben, als signifikant eingestuft wenn der P Wert  $< 0,1$  war.

Alle Diagramme wurden mittels der Software DeltaGraph 4 (RockWare, Golden, CO, USA) erstellt, Student t Tests erfolgten mittels Microsoft Excel (Microsoft, Redmont, CA, USA).



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ein Lysat aus *T. gondii* induziert in Makrophagen eine Zytokinantwort

Für eine Antigen-Präparation von *T. gondii* mit möglichst vollständiger Antigenität, wurden Tachyzoiten vom Stamm BK mittels einer French Press lysiert. Der Proteingehalt solcher Lysate (TgL) wurde nach der BCA-Methode bestimmt; im Durchschnitt ließ sich aus  $1 \times 10^9$  Toxoplasmen 1 mg Protein gewinnen.

Um sicherzugehen, daß keine Verunreinigung durch LPS während des Lysierens stattfand, wurde der LPS-Gehalt der Lysate im *Limulus* Amöbozytenlysat-Test bestimmt. Eine Verunreinigung mit LPS ließ sich nicht feststellen.

Die so gewonnenen Präparationen von TgL wurden genutzt, um in Kulturen von Makrophagen ( $M\phi$ ) eine Zytokinproduktion zu induzieren.

Dazu wurden Peritonealexsudat-Makrophagen von Mäusen des Stammes C57BL/10 in 48 well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro well ausgesät. Die  $M\phi$  wurden anschließend mit unterschiedlichen Mengen an TgL versetzt.

Als Negativkontrolle wurden  $M\phi$  ohne TgL inkubiert sowie mit einem äquivalent gewonnenen Lysat aus L929 Zellen, den Zellen, in denen die Toxoplasmen *in vitro* kultiviert wurden. Ferner wurde auch Kulturmedium der Lyse-Prozedur unterzogen und das so behandelte Kulturmedium als weitere Negativkontrolle eingesetzt.

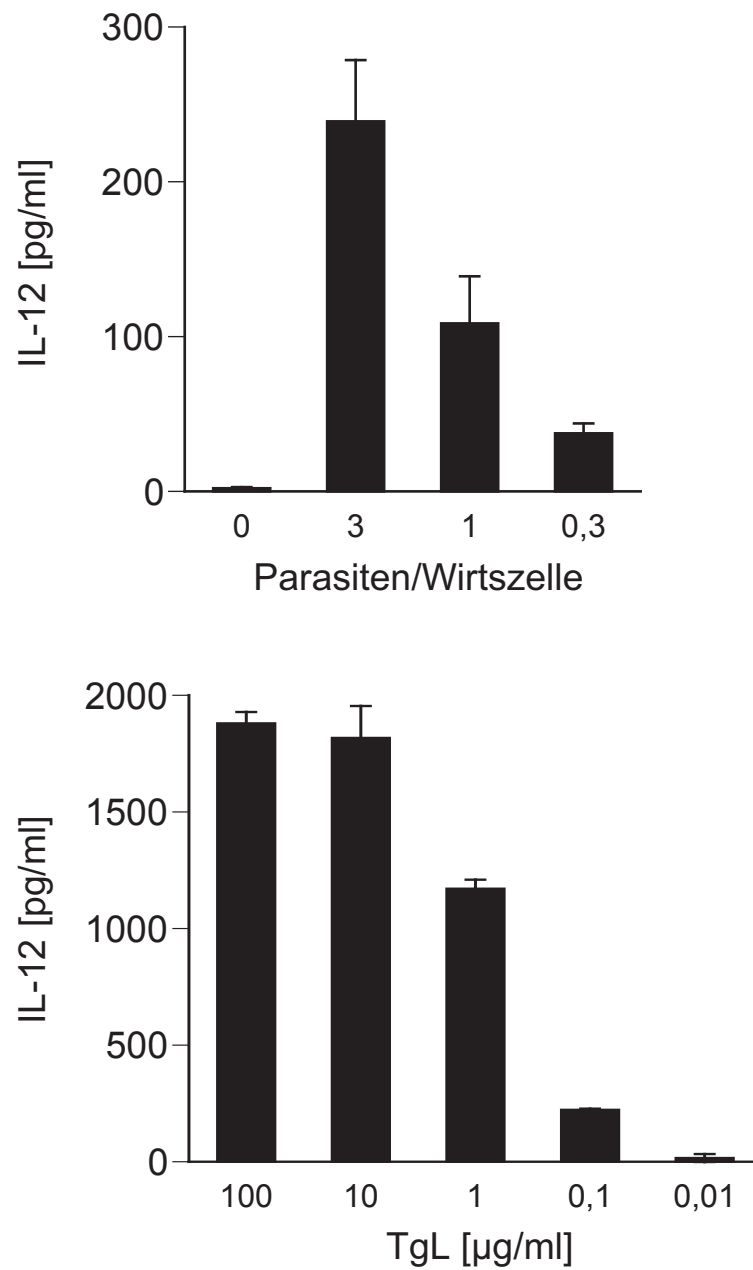
Um einen Vergleich zwischen TgL und lebenden Toxoplasmen bezüglich der Fähigkeit, Zytokine in  $M\phi$  zu induzieren, zu erhalten, wurden die  $M\phi$  auch mit lebenden Toxoplasmen vom Stamm BK in unterschiedlichen Parasit/Wirtszell-Verhältnissen inkubiert.

Nach 24 h Inkubation wurde der Kulturüberstand abgenommen und die darin enthaltene Konzentration verschiedener Zytokine mittels ELISA bestimmt.

#### 4.1.1 Eine Inkubation mit lebenden Toxoplasmen oder mit TgL induziert in $M\phi$ die Sekretion von IL-12

Im IL-12-ELISA konnte gezeigt werden, daß in den Kulturüberständen IL-12 enthalten war (Fig. 1). Dabei war eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Menge des eingesetzten TgL und der Menge des gemessenen IL-12 zu beobachten: Während eine Konzentration von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Lysat kaum eine IL-12-Antwort in den  $M\phi$  induzierte, führte die Inkubation mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  TgL zu steigenden IL-12 Konzentrationen im Überstand der  $M\phi$ -Kulturen. Eine weitere Erhöhung der Menge an TgL auf 100  $\mu\text{g/ml}$  hatte keinen weiteren Anstieg der IL-12 Konzentration zur Folge.

Bei der Inkubation von  $M\phi$  mit lebenden Toxoplasmen wurden im Kulturüberstand bei einer Infektionsrate von 3 Parasiten pro Wirtszelle in etwa solche IL-12-Spiegel

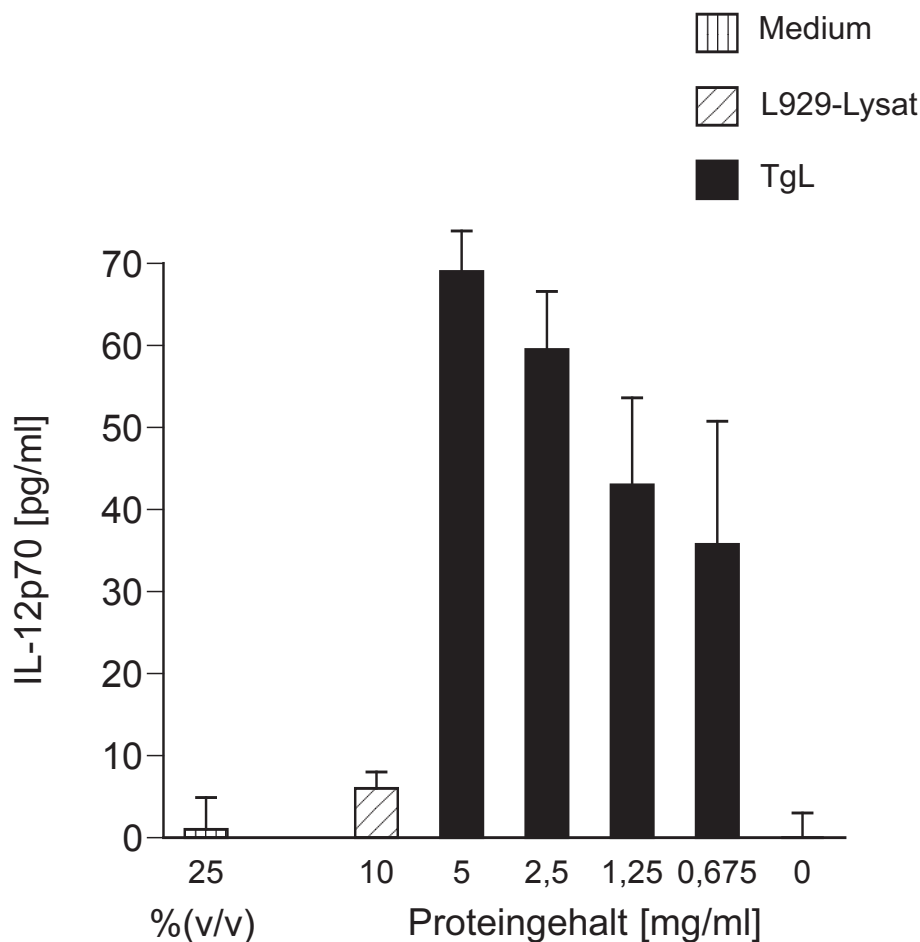


**Fig. 1** Toxoplasmen und TgL induzieren in Makrophagen die Sekretion von IL-12  
Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit Toxoplasmen bzw. mit TgL für 24 h inkubiert. Das im Kulturüberstand enthaltene IL-12 wurde gemessen.

gemessen wie beim Einsatz von TgL mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml.

Das Zytokin IL-12 setzt sich aus den beiden Untereinheiten p35 und p40 zum biologisch aktiven p70 zusammen, wobei p40 im Überschuß von den Zellen produziert wird.

Um den Anteil des biologisch aktiven IL-12p70 zu bestimmen, wurde es mittels eines p70-spezifischen ELISA separat gemessen (Fig. 2). Da die biologisch aktive Form des Zytokins in vielfach niedrigeren Konzentrationen vorliegt, war es hier nötig, TgL in wesentlich höheren Konzentrationen einzusetzen, um meßbare Ergebnisse zu erhalten. So konnte gezeigt werden, daß TgL in Konzentrationen zwischen 0,625 und 5 mg/ml in der Lage ist, dosisabhängig meßbare Mengen des Heterodimers IL-12p70 in Mφ zu induzieren.

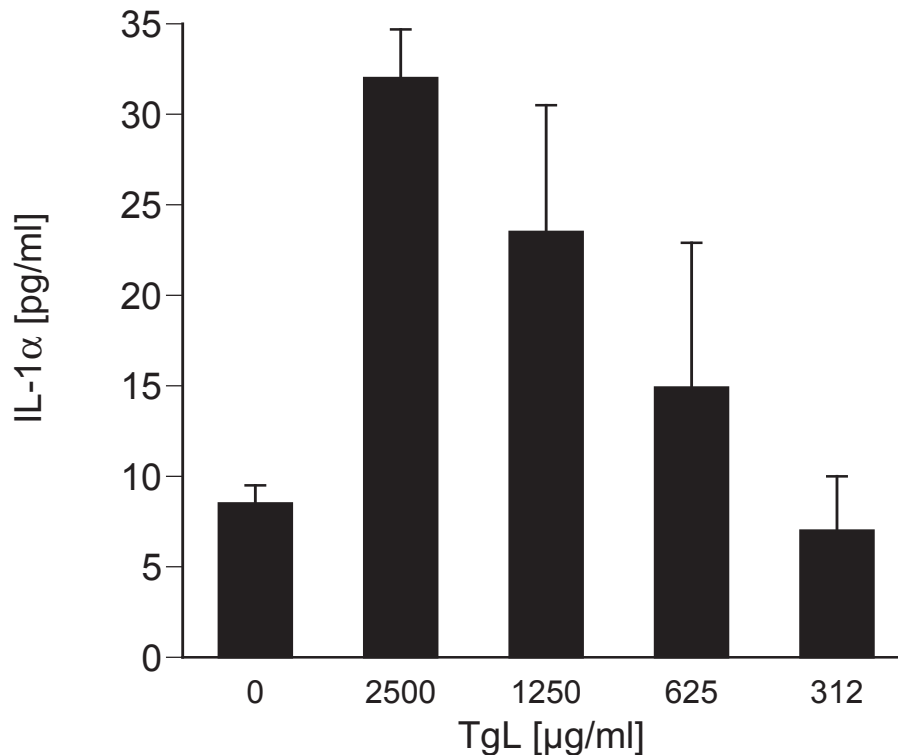


**Fig. 2** TgL induziert in Makrophagen die Sekretion von IL-12p70

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit einem Kontroll-Medium, einen Lysat aus L929 Zellen bzw. mit TgL für 24 h inkubiert. Das im Kulturüberstand enthaltene IL-12p70 wurde gemessen.

### 4.1.2 Das Zytokin IL-1 $\alpha$ wird durch TgL in M $\phi$ induziert

In den Kulturüberständen wurde mittels eines anderen ELISA IL-1 $\alpha$  gemessen. Es zeigte sich dosisabhängig eine Induktion von IL-1 $\alpha$  (Fig. 3).



**Fig. 3** TgL induziert in Makrophagen die Sekretion von IL-1 $\alpha$

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit TgL für 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-1 $\alpha$  gemessen.

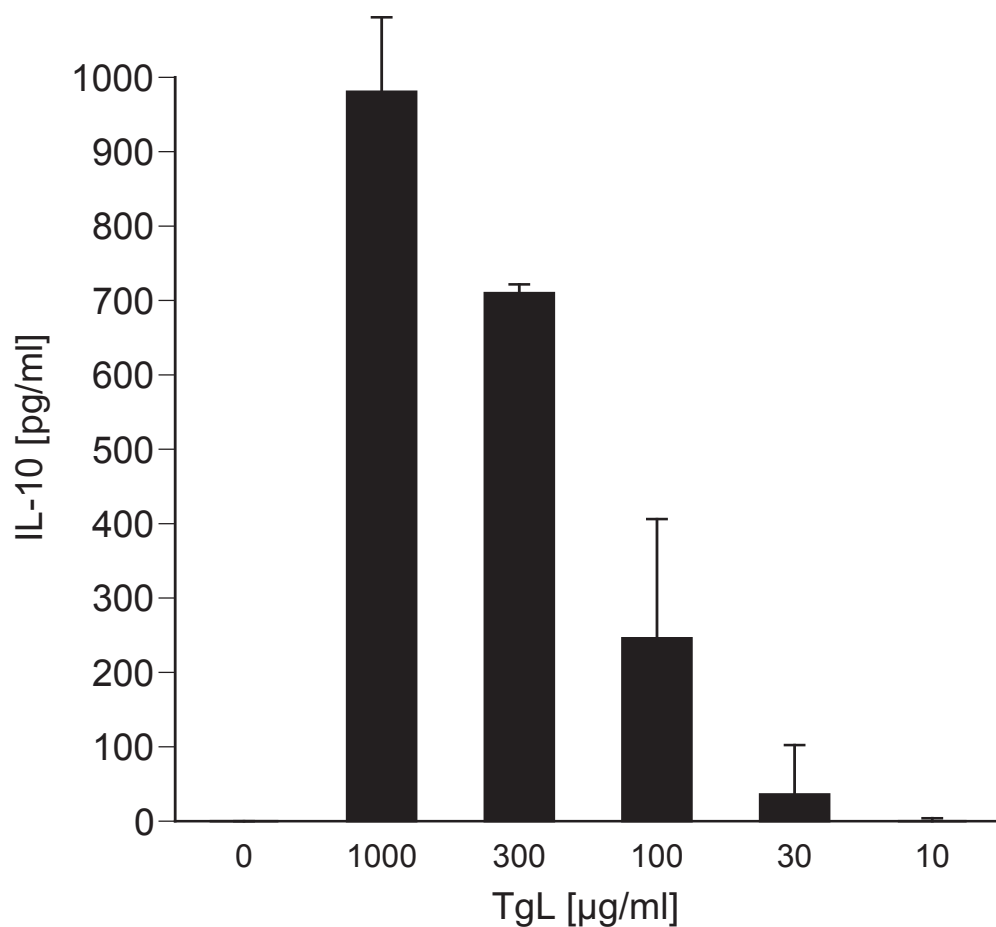
### 4.1.3 Das Zytokin IL-10 wird durch TgL in M $\phi$ induziert

Auf ähnliche Weise wurde IL-10 im Kulturüberstand bestimmt. Auch hier zeigten sich beim Einsatz von TgL dosisabhängige Mengen an IL-10 im ELISA (Fig. 4).

## 4.2. Die Produktion von IL-12 wird durch ein *T. gondii*-Protein induziert

Um zu erfahren, ob die IL-12-induzierende Aktivität von TgL über ein Protein vermittelt wird, wurde TgL mit Proteinase K vorbehandelt und mit unbehandeltem TgL hinsichtlich seiner Wirkung auf M $\phi$  verglichen.

Peritonealexsudat-Makrophagen von Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  in 48 well-Kulturplatten ausgesät. Den Kulturen wurde TgL mit 1,25  $\mu\text{g/ml}$  oder TgL welches mit Proteinase K vorverdaut worden war, hinzugefügt.



**Fig. 4** TgL induziert in Makrophagen die Sekretion von IL-10

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit TgL für 24 h inkubiert. Das im Kulturüberstand enthaltene IL-10 wurde gemessen.

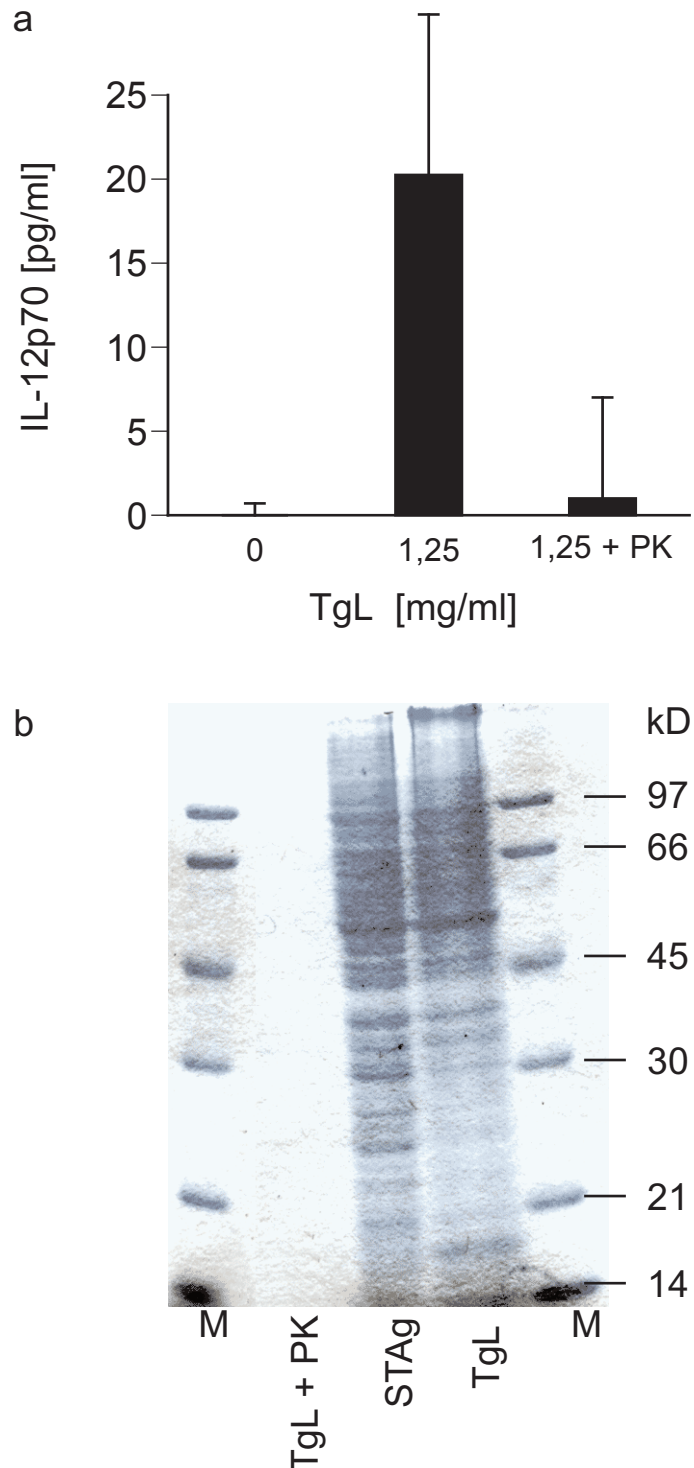
Als Negativkontrolle diente Kulturmedium.

Proben der Kulturüberstände wurden nach 24 h abgenommen und mittels eines ELISA wurde IL-12p70 im Überstand bestimmt (Fig. 5a).

Es zeigte sich ein Rückgang der IL-12-induzierenden Aktivität von TgL nach Verdau mit Proteinase K auf das Niveau der Negativkontrolle ( $P < 0,01$ ).

Um zu prüfen, ob die Proteinase K in der eingesetzten Menge und Art und Weise in der Lage war, die Proteine im TgL vollständig zu verdauen, wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel TgL aufgetrennt. Vergleichend wurde TgL, TgL welches mit Proteinase K vorbehandelt worden war, und ein wässriges *T. gondii*-Lysat (STAg) auf das Gel aufgetragen (Fig. 5b).

Es zeigten sich keine erkennbaren mit Coomassie Blau angefärbte Banden im Laufbereich des mit Proteinase K vorbehandelten TgL. Im Laufbereich des TgL und STAg dagegen zeigte sich das typische Verteilungsmuster parasitärer Proteine mit deutlich angefärbten Banden (Beckers et al. 1994).

**Fig. 5****a** Nach Proteinase K Behandlung verliert TgL seine IL-12-induzierende Aktivität

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes C57BL/10 wurden mit TgL und mit Proteinase K vorbehandeltem TgL für 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-12p70 gemessen. Die Unterschiede zwischen Proteinase K vorbehandeltem TgL und unbehandeltem TgL sind signifikant ( $P < 0,01$ ).

**b** Kontrolle des Proteinase K Verdaus von TgL

In einem SDS-Polyacrylamidgel wurde STAg und TgL (je 25  $\mu$ g Protein) aufgetragen. TgL war z.T. mit Proteinase K (PK) für 1 h vorbehandelt worden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. M - Molekulargewichtsstandard.

### 4.3. Die IL-12-Induktion durch *T. gondii* beruht auf einer exkretorisch/sekretorischen Aktivität

Toxoplasmen besitzen eine exkretorisch/sekretorische Aktivität, sind also in der Lage, bestimmte Proteine aktiv zu sezernieren.

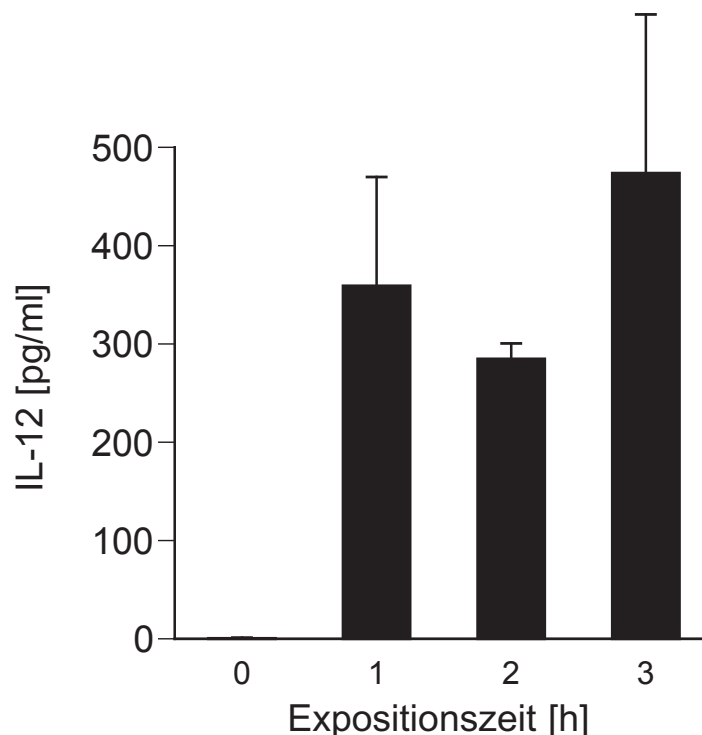
Es stellte sich die Frage, ob die parasitäre Aktivität, die für die IL-12-Induktion in M $\phi$  verantwortlich ist, möglicherweise durch solch ein sezerniertes Protein vermittelt wird.

#### 4.3.1 Zur IL-12-Induktion ist keine Infektion der Makrophagen notwendig

Zunächst galt es zu prüfen, ob M $\phi$  zu einer IL-12 Sekretion angeregt werden können, noch bevor sie durch Toxoplasmen infiziert werden, d.h. bevor die Toxoplasmen in die M $\phi$  eingedrungen sind.

Dazu wurde ein Versuchsaufbau geschaffen, der M $\phi$  und Toxoplasmen räumlich voneinander trennt, bei dem aber das Kulturmedium doch ein gemeinsames ist.

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden in 24 well-Kulturplatten ausgesät. In die wells wurden Einsätze eingehängt, deren Boden aus einer Membran mit 0,1  $\mu$ m Porenweite bestand. Diese Einsätze beherbergten die



**Fig. 6** Toxoplasmen induzieren in Makrophagen die Sekretion von IL-12 ohne diese zu infizieren

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden in Ko-Kultur mit Toxoplasmen für 1 bis 3 h inkubiert. Wirtszellen und Parasiten waren voneinander durch eine Membran mit 0,1  $\mu$ m Porengröße getrennt. Nach der angegebenen Expositionszeit wurde der Transwell-Einsatz mit den Toxoplasmen entfernt. Im Kulturüberstand wurde IL-12 gemessen.

Toxoplasmen. So wurden M $\phi$  und Toxoplasmen in Ko-Kultur, aber getrennt voneinander inkubiert.

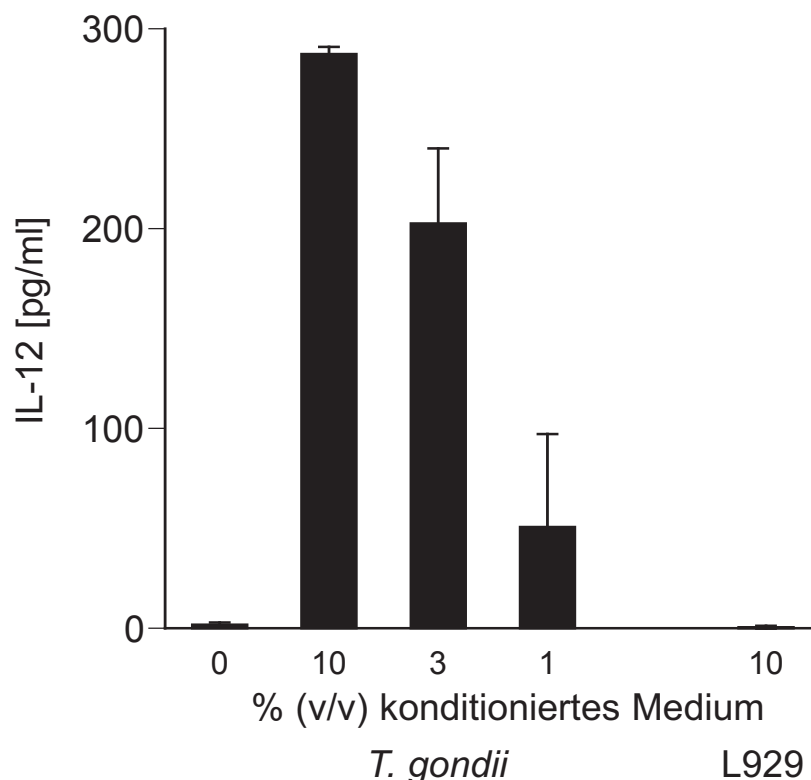
Nach 1, 2 bzw. 3 h Ko-Kultur wurden die Einsätze mit den Toxoplasmen entfernt, nach insgesamt 24 h das Kulturmedium über den M $\phi$  abgenommen, und das darin enthaltene IL-12 bestimmt. In der Negativkontrolle wurde ein leerer Einsatz für 3 h über den M $\phi$  belassen.

Es zeigte sich, daß eine Expositionszeit von 1 h bereits ausreicht, um die M $\phi$  zu einer IL-12-Antwort zu stimulieren (Fig. 6).

#### 4.3.2 Die IL-12-induzierende Aktivität ist Bestandteil von *T. gondii*-ESA

Um zu prüfen, ob die IL-12-Induktion in M $\phi$  durch exkretorisch/sekretorische Produkte der Toxoplasmen verursacht wird, wurde der Versuch unternommen, ein Medium zu erzeugen, welches definierte exkretorisch/sekretorische Antigene (ESA) von *T. gondii* enthält, jedoch nicht die Parasiten selbst.

Dazu wurden frisch geerntete Tachyzoiten in neuem Medium aufgenommen und dann 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Toxoplasmen durch differentielle Zentrifugation entfernt.



**Fig. 7** Von Toxoplasmen konditioniertes Medium induziert in Makrophagen die Sekretion von IL-12

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden mit einem von Tachyzoiten konditionierten Medium bzw. mit einem Kontrollmedium inkubiert. Als Kontrollmedium diente ein von L929 Zellen konditioniertes Medium. Im Kulturüberstand wurde nach 24 h Inkubation IL-12 gemessen.



Dieses so konditionierte Medium wurde nun auf IL-12-induzierende Aktivität hin getestet.

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden in 48 well-Kulturplatten ausgesät und mit 10, 3 und 1 Volumenprozent des konditionierten Mediums versetzt. Zur Kontrolle wurde ein Medium mit L929 Fibroblasten konditioniert und dieses den M $\phi$  mit 10 Volumenprozent zugesetzt.

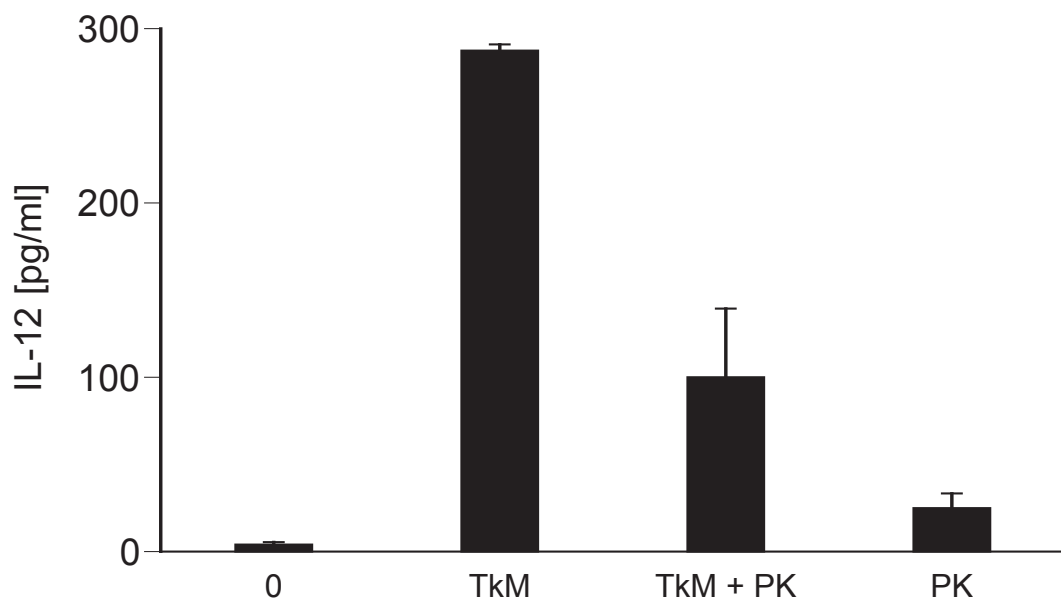
Nach 24 h Inkubation wurden Proben der Kulturüberstände abgenommen und das darin enthaltene IL-12 bestimmt.

Es zeigte sich, daß das Toxoplasmen-konditionierte Medium in der Lage ist, eine IL-12-Produktion in M $\phi$  zu induzieren, wohingegen das Kontrollmedium eine solche Aktivität nicht besitzt (Fig. 7).

#### 4.3.3 Die IL-12-induzierende Aktivität von *T. gondii* wird durch ein exkretorisch/sekretorisches Protein vermittelt

Der Nachweis, daß die IL-12-induzierende Aktivität des Toxoplasmen-konditionierten Mediums wirklich durch das Vorhandensein von Proteinen begründet war, sollte durch eine Vorbehandlung dieses Mediums durch Proteinasen erfolgen.

Das Toxoplasmen-konditionierte Medium wurde wie oben beschrieben gewonnen. Ein Teil wurde mit Proteinase K für 45 min. bei 37°C inkubiert. Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurde präpariert und in 48 well-Kulturplatten ausgesät. Die M $\phi$  wurden mit Toxoplasmen-konditioniertem Medium, mit



**Fig. 8** Eine Proteinase K Behandlung des *T. gondii*-konditionierten Mediums reduziert dessen IL-12-induzierende Aktivität

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden mit je 1%(v/v) eines von Toxoplasmen konditionierten Mediums (TkM), eines mit Proteinase K (PK) vorbehandelten TkM sowie mit Proteinase K für je 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-12 gemessen. Die Unterschiede zwischen mit Proteinase K vorbehandeltem TkM und unbehandeltem sind signifikant ( $P < 0,1$ ).

Proteinase K behandeltem Toxoplasmen-konditionierten Medium oder nur mit Proteinase K versetzt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde in den Kulturüberständen IL-12 bestimmt.

Es zeigte sich, daß das mit Proteinase K behandelte Toxoplasmen-konditionierte Medium eine deutlich geringere ( $P < 0,1$ ) IL-12-induzierende Aktivität besitzt als das unbehandelte Toxoplasmen-konditionierte Medium (Fig. 8). Dennoch war eine Restaktivität des mit Proteinase K behandelten Toxoplasmen-konditionierten Mediums zu sehen, und auch die Proteinase K alleine war in der Lage, etwas IL-12 in den M $\phi$  zu induzieren.

#### **4.4. Die IL-12-induzierende Aktivität von *T. gondii* variiert mit dem Genotyp der Wirtszellen und der Virulenz der Parasiten**

Mit dem Ziel, die IL-12-induzierende Aktivität von *T. gondii* auf eine mögliche Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Makrophagen hin zu untersuchen, wurden Versuche mit Zellen aus Mäusen verschiedenen genetischen Ursprungs durchgeführt. Außerdem wurden Toxoplasmenisolate unterschiedlicher Mausvirulenz verglichen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der IL-12-Induktion und pathogenen Eigenschaften der Erreger zu prüfen.

##### **4.4.1 Die IL-12-induzierende Aktivität variiert mit dem Wirtsgenom**

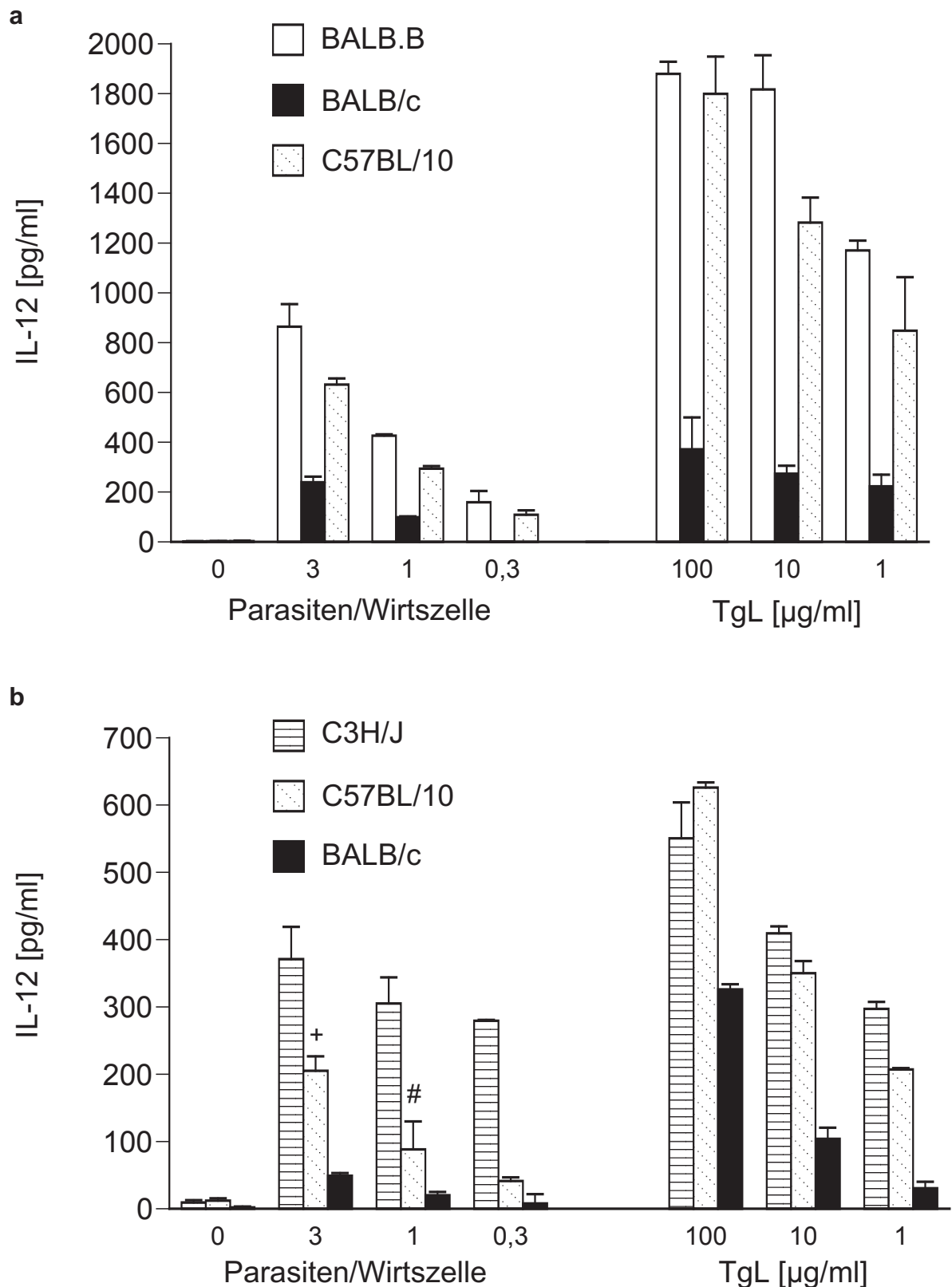
In Vorversuchen war aufgefallen, daß Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c nicht in der Lage waren, IL-12 in so hohen Mengen zu produzieren, wie M $\phi$  aus C57BL/10 Mäusen. Diese beiden Mausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund reagieren deutlich unterschiedlich auf eine Toxoplasmainfektion (Suzuki et al. 1991). Während BALB/c Mäuse als resistent gelten, in ihnen verläuft die Infektion schließlich chronisch-latent, sind C57BL/10 Mäuse suszeptibel und können den Erreger nicht kontrollieren. Die Resistenz wird über verschiedene Genloci vermittelt (McLeod et al. 1993; Brown et al. 1995), wovon einige im H-2 Komplex liegen.

Es wurde nun untersucht, ob unter den gegebenen Experimentalbedingungen M $\phi$  aus suszeptiblen bzw. resistenten Mäusen unterschiedliche Mengen an IL-12 produzieren.

##### **4.4.1.1. Die IL-12-Induktion korreliert mit der Ausprägung des H-2 Genlocus**

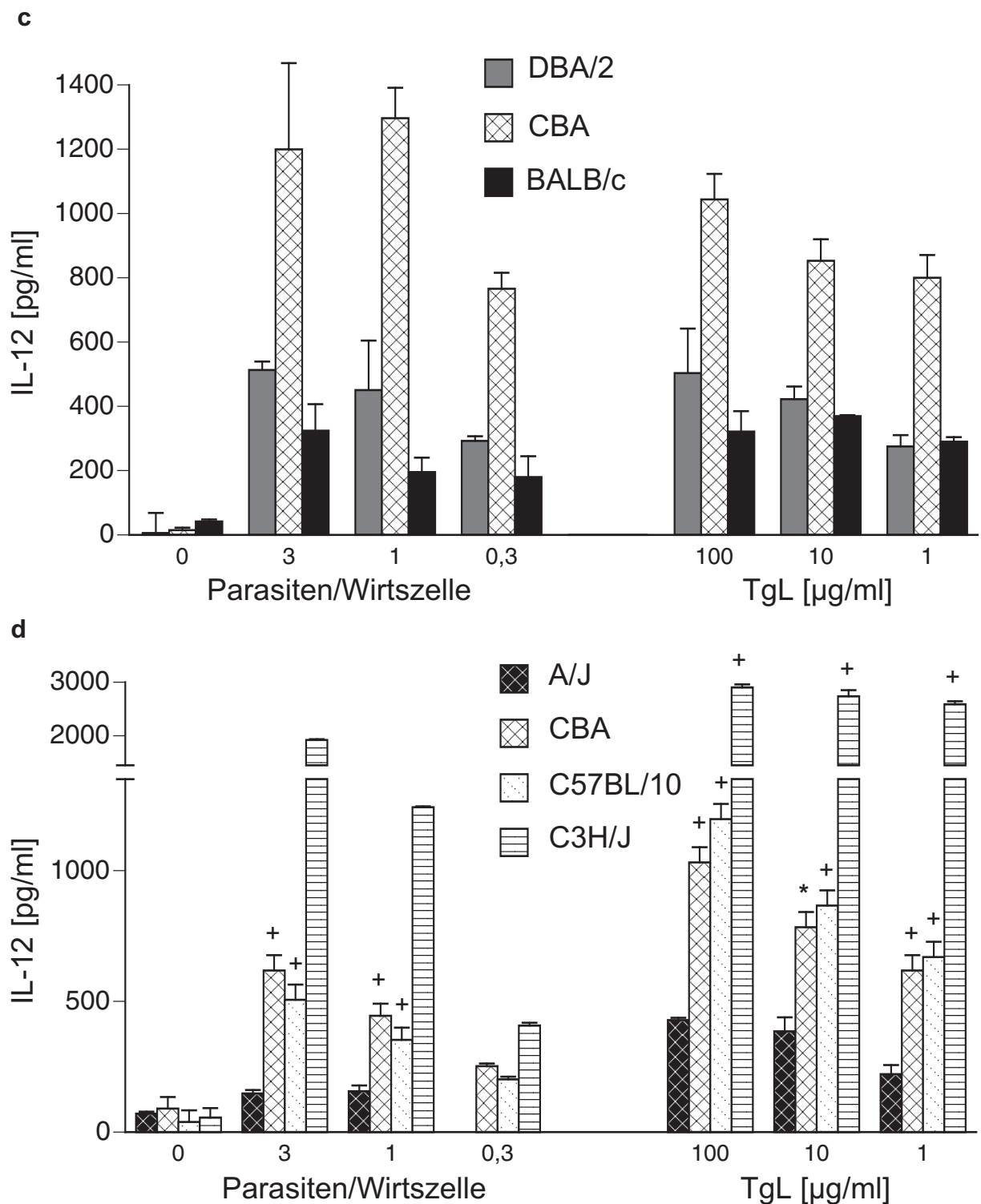
Für einen breiten Vergleich verschiedener Mausstämme wurden Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen der Stämme BALB.B, C57BL/10, C57B/6, CBA und C3H/J, als Vertreter der Toxoplasrose-suszeptiblen Mausstämme, und Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen der Stämme BALB/c, A/J und DBA/2, als Vertreter Toxoplasrose-resistenter Mausstämme, präpariert.

Die M $\phi$  wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen in 48 well-Kulturplatten ausgesät und in ihrer Fähigkeit, IL-12 auf *T. gondii*-Stimuli hin zu produzieren, direkt miteinander



**Fig. 9 a, b** *T. gondii*-induzierte Sekretion von IL-12 in Makrophagen aus Mäusen verschiedener Stämme

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen dreier Toxoplasmose-suszeptibler Stämme (BALB.B, C57BL/10 und C3H/J) und eines Toxoplasmose-resistenten Stammes (BALB/c) wurden mit Toxoplasmen bzw. mit TgL für 24 h inkubiert. Das im Kulturüberstand enthaltene IL-12 wurde gemessen. Die Unterschiede zwischen suszeptiblen und resistenten Makrophagen sind signifikant ( $P < 0,1$  bzw. + =  $P < 0,2$  oder # =  $P < 0,4$ ).



**Fig. 9 c, d** *T. gondii*-induzierte Sekretion von IL-12 in Makrophagen aus Mäusen verschiedener Stämme

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen dreier Toxoplasmose-suszeptibler Stämme (CBA, C57BL/10 und C3H/J) und dreier Toxoplasmose-resistenter Stämme (DBA/2, BALB/c und A/J) wurden mit Toxoplasmen bzw. mit TgL für 24 h inkubiert. Das im Kulturüberstand enthaltene IL-12 wurde gemessen. Die Unterschiede zwischen suszeptiblen und resistenten Makrophagen sind signifikant ( $P < 0,1$  bzw.  $+ = P < 0,2$  oder  $* = P < 0,3$ ).

der verglichen. Als Stimuli dienten zum einen lebende Toxoplasmen vom Stamm BK, die mit einem Parasit/Wirtszell Verhältnis von 3, 1 und 0,3 eingesetzt wurden, zum anderem wurde TgL in Konzentrationen von 100, 10 und 1 µg/ml verwendet. Als Negativkontrolle diente das Kulturmedium.

Nach 24 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und das darin enthaltene IL-12 mittels eines ELISA bestimmt.

In allen Vergleichen (Fig. 9a-d) zeigte sich, daß Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen resistenter Stämme signifikant (größtenteils  $P < 0,1$ ) weniger IL-12 produzieren als die im gleichen Experiment eingesetzten Mφ aus suszeptiblen Mäusen. Diese Aussage ließ sich sowohl für die Ansätze mit lebenden Toxoplasmen als auch für die mit TgL machen.

Die kongenen Stämme, die sich in diesem Vergleich genetisch am nächsten stehen, sind BALB/c und BALB.B, die sich ausschließlich im H-2-Komplex unterscheiden.

Der direkte Vergleich der Mφ untereinander innerhalb eines Experimentalansatzes war insofern nötig, da die interexperimentale Variabilität es nicht erlaubte, die im Kulturüberstand gemessenen Zytokinkonzentrationen als absolute Werte für die Fähigkeit der Mφ zur IL-12-Produktion heranzuziehen.

#### **4.4.1.2. Die IL-12-Induktion ist nicht abhängig von der Infektionsrate oder dem intrazellulären Parasitenwachstum**

Um auszuschließen, daß eine unterschiedliche Infektionsdichte in den Mφ suszeptibler bzw. resistenter Mäuse oder eine unterschiedlich gute Proliferationsfähigkeit der Toxoplasmen in den verschiedenen Mφ für deren unterschiedliche IL-12-Antwort verantwortlich ist, wurde die Infektionsrate und das intrazelluläre Parasitenwachstum überprüft.

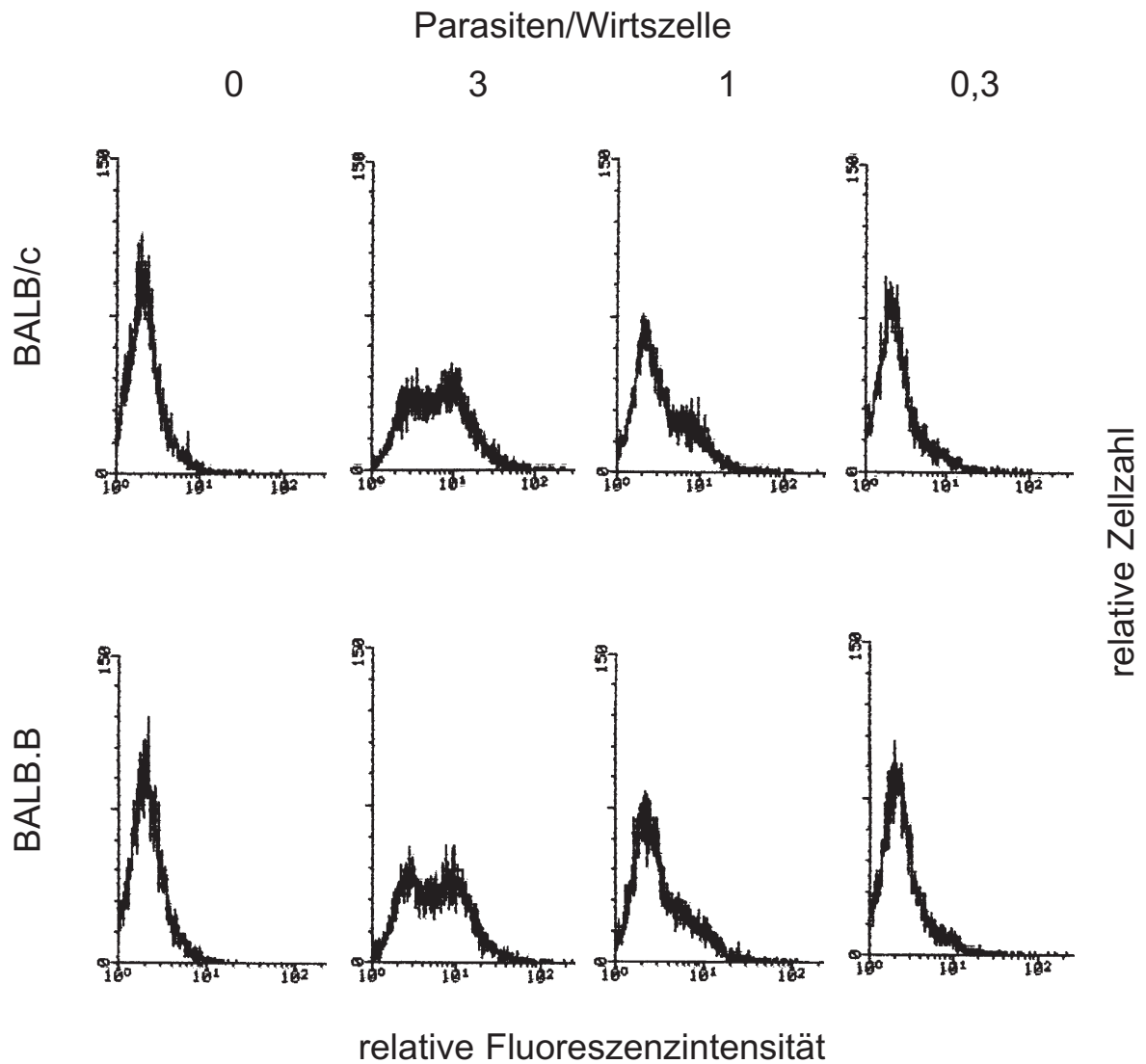
Dieser Vergleich wurde an Mφ aus BALB/c und BALB.B Mäusen durchgeführt.

Die Infektionsrate wurde mittels eines FACS ermittelt. Dazu wurden Peritonealexsudat-Makrophagen beider Mausstämmen präpariert und mit Toxoplasmen infiziert, welche GFP exprimieren. Es wurden unterschiedliche Parasiten/Wirtszell-Verhältnisse gewählt. Als Negativkontrolle diente das Kulturmedium. Nach 16 h Kultur wurde die Parasitenlast in den Mφ über die Intensität des Fluoreszenzsignals im FACS ermittelt (Fig. 10).

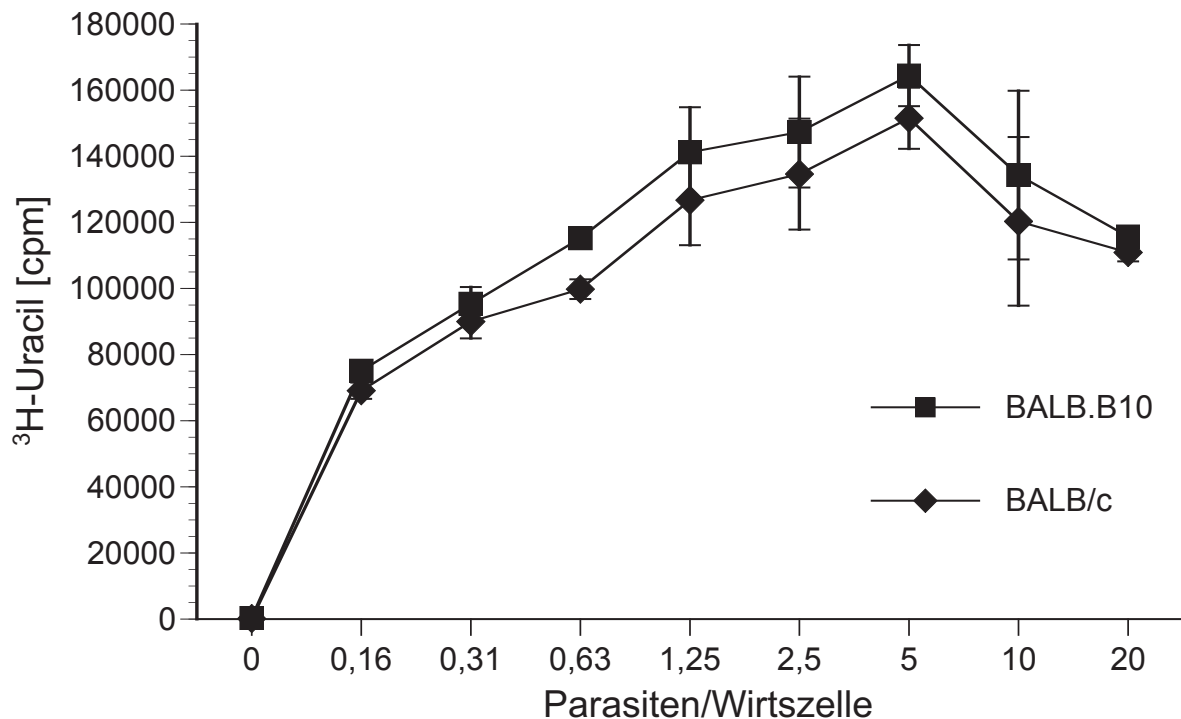
Der Vergleich der Fluoreszenzintensitätsverteilungen in den Mφ-Populationen aus beiden Mausstämmen zeigt keine erkennbaren Unterschiede.

Das Parasitenwachstum wurde über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uracil bestimmt. Dazu wurden Peritonealexsudat-Makrophagen beider Mausstämmen präpariert und in unterschiedlichen Parasiten/Wirtszell-Verhältnissen infiziert (0,16 bis 20 Toxoplasmen/Wirtszelle). Nach 16 h wurde den Kulturen  $^3\text{H}$ -Uracil zugegeben und nach weiteren 24 h wurden die Kulturen eingefroren und der Einbau von  $^3\text{H}$ -Uracil mittels Flüssigszintillationszählung im  $\beta$ -Counter ermittelt. Die Menge gebundener Radioaktivität wurden gegen die Infektionsraten aufgetragen (Fig. 11).

Der Vergleich der Proliferationskurven zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Toxoplasmenwachstum in den verschiedenen Mφ.



**Fig. 10** Vergleich der Infektion von Makrophagen aus Toxoplasmose-resistenten (BALB/c) und H-2-kongeneten Toxoplasmose-suszeptiblen (BALB.B) Mäusen Peritonealexsudat-Makrophagen wurden mit Toxoplasmen, die GFP exprimieren, infiziert. Die Infektionsrate wurde zwischen 0,3 und 3 Parasiten/Wirtszelle variiert. Nach 16 h Kultur wurde in den Zellpopulationen die Parasitenlast über die Fluoreszenzintensität mittels FACS vergleichend bestimmt.



**Fig. 11** Proliferation von Toxoplasmen in Makrophagen aus Toxoplasmose-suszeptiblen und -resistenten H-2-kongenigen Mäusen

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB.B (suszeptibel) bzw. BALB/c (resistent) wurden mit Toxoplasmen inkubiert. Das parasitäre Wachstum in den Kulturen wurde über den Einbau von <sup>3</sup>H-Uracil bestimmt.

#### 4.4.1.3. Die IL-12-Antwort korreliert nicht mit dem Toxoplasmoseresistenzgen im H-2-L Locus

Um zu erfahren, ob das Toxoplasmoseresistenzgen auf dem L Locus des H-2 Komplexes auch für die Stärke der IL-12-Induktion verantwortlich ist, wurden Mφ aus BALB/c H-2<sup>dm2</sup> Mäusen bzw. C3H L<sup>d</sup> Mäusen untersucht.

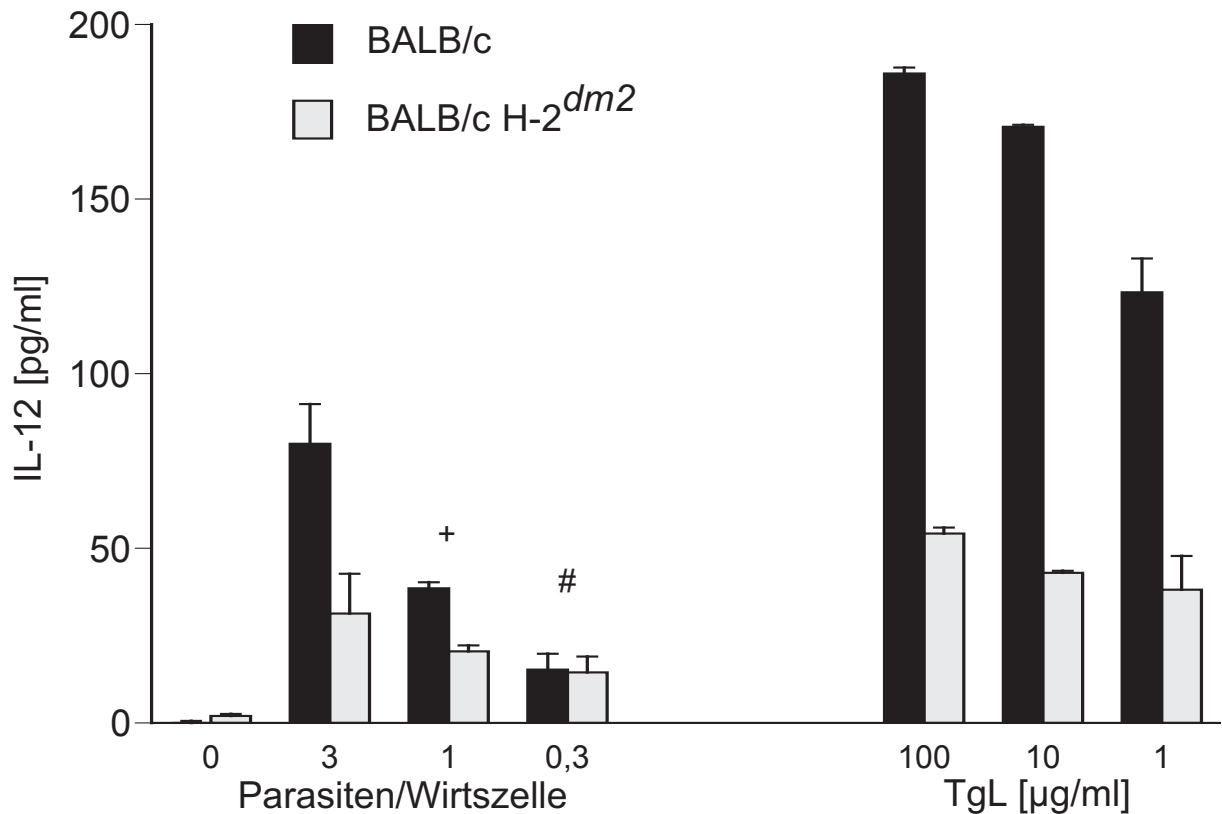
Die BALB/c H-2<sup>dm2</sup> Maus ist genetisch identisch mit einer BALB/c Maus bis auf eine Deletion im H-2 Komplex von ungefähr 140 kb Länge, welche die D2, D3, D4 und L Loci umfaßt (Rubocki et al. 1986). Die C3H L<sup>d</sup> Maus ist genetisch identisch mit einer C3H Maus bis auf den L Locus, der jetzt das Allel *d* trägt (Aldrich et al. 1991). Im Vergleich zur resistenten BALB/c Maus ist die BALB/c H-2<sup>dm2</sup> Maus für eine Toxoplasmainfektion suszeptibel, während im Vergleich zur suszeptiblen C3H Maus die C3H L<sup>d</sup> Maus resistent ist (McLeod et al. 1993).

So wurden Mφ aus BALB/c H-2<sup>dm2</sup> Mäusen im Vergleich mit Mφ aus BALB/c Mäusen in 48 well-Kulturplatten ausgesät und mit lebenden Toxoplasmen vom Stamm BK bzw. mit TgL stimuliert. Die induzierte Menge an IL-12 wurde mittels ELISA bestimmt (Fig. 12).

In analoger Weise wurden Mφ aus C3H L<sup>d</sup> Mäusen mit Mφ aus C3H Mäusen verglichen (Fig. 13).

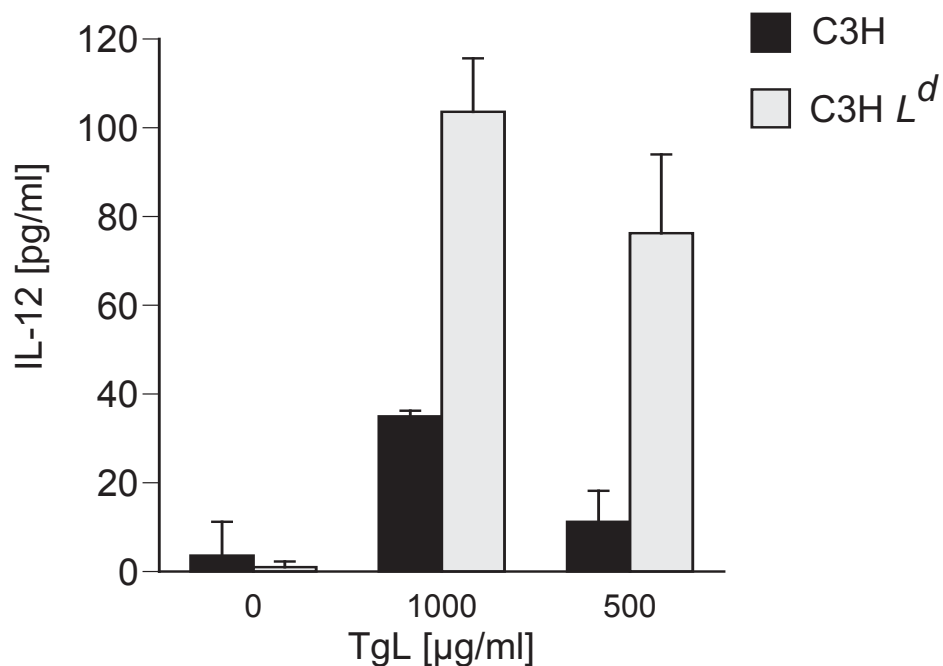
In beiden Fällen zeigte sich, daß nun die Mφ aus Toxoplasmose-suszeptiblen Mäusen weniger IL-12 produzieren, als jene aus den resistenten ( $P < 0,1$ ).





**Fig. 12** *T. gondii*-induzierte Sekretion von IL-12 in Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c bzw. BALB/c H-2<sup>dm2</sup>

Peritonealexsudat-Makrophagen aus BALB/c bzw. BALB/c H-2<sup>dm2</sup> Mäusen wurden mit Toxoplasmen bzw. mit TgL für 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-12 gemessen. Die Unterschiede zwischen den Stämmen sind signifikant ( $P < 0,1$ , bzw. + =  $P < 0,2$ ), # = nicht signifikant.



**Fig. 13** *T. gondii*-induzierte Sekretion von IL-12 in Makrophagen aus Mäusen des Stammes C3H bzw. C3H L<sup>d</sup>

Peritonealexsudat-Makrophagen aus C3H bzw. C3H L<sup>d</sup> Mäusen wurden mit TgL für 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-12 gemessen. Die Unterschiede zwischen den Stämmen sind signifikant ( $P < 0,1$ ).

#### 4.4.2 Die IL-12-induzierende Aktivität variiert mit dem Erreger

Alle bisherigen Versuchsansätze sind mit Toxoplasmen des Stammes BK durchgeführt worden. Diese Toxoplasmen bilden in Kultur ausschließlich Tachyzoiten, also sich schnell vermehrende Formen, die die Wirtszellen gut invadieren, sich in ihnen schnell vermehren und sie schließlich lysieren.

Eine anderes Stadium der Toxoplasmen, die Bradyzoiten, bildet in Wirtszellen Zysten, vermehren sich nur langsam in diesen, und führen nur selten oder spät zu einer Lyse der Wirtszelle.

Toxoplasmen vom Stamm DX sind solche Zystenbildner und liegen, wenn sie aus Gewebezysten geerntet werden, in Bradyzoitenform vor. In Zellkultur bildet dieser Toxoplasmenstamm auch Tachyzoiten. So ist es möglich, aus diesem *T. gondii* Stamm sowohl Tachyzoiten als auch Bradyzoiten zu isolieren.

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit sich der Unterschied in der Toxoplasmenform, der für die Wirtszelle entscheidend bezüglich ihres Überlebens ist, in der Menge an induziertem IL-12 bemerkbar macht.

##### 4.4.2.1. Tachyzoiten induzieren in M $\phi$ mehr IL-12 als Bradyzoiten

Zu diesem Zwecke wurden Toxoplasmen vom Stamm DX kultiviert und sowohl Tachyzoiten als auch Bradyzoiten geerntet.

Die Identität der Stadien wurde durch den Nachweis stadienspezifischer Marker mittels Immunofluoreszenzmikroskopie kontrolliert (Fischer et al. 1997).

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden in 48 well-Kulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Mengen Tachyzoiten bzw. Bradyzoiten inkubiert. Nach 24 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und das darin enthaltene IL-12 quantifiziert (Fig. 14).

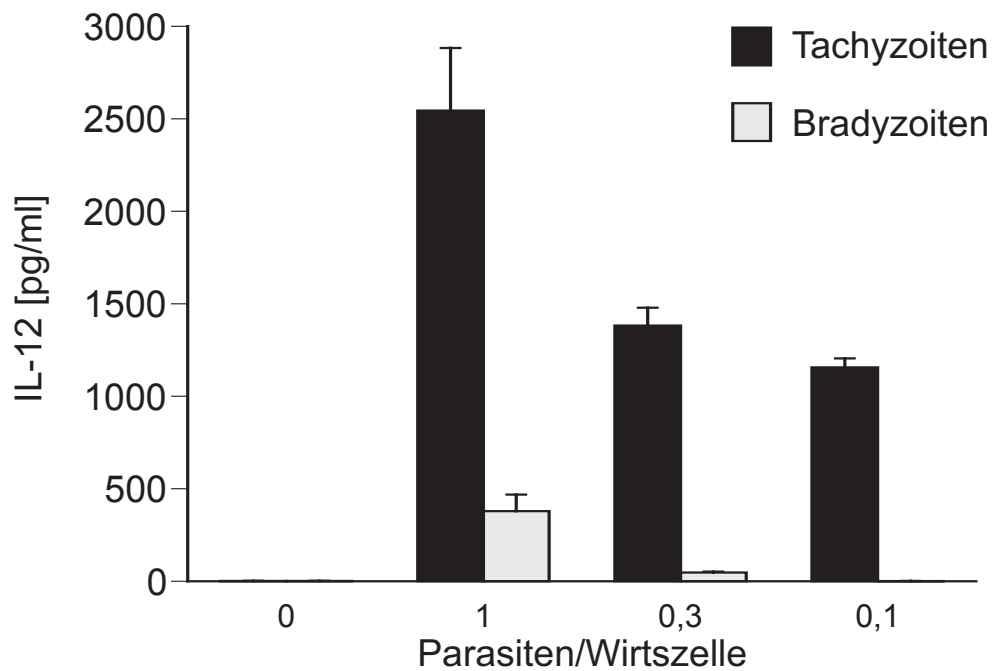
Es zeigte sich, daß Tachyzoiten weitaus größere Mengen an IL-12-induzierten als Bradyzoiten ( $P < 0,1$ ).

Um zu zeigen, daß dies nicht nur *in vitro* gilt, wurden BALB/c Mäuse intraperitoneal mit Tachyzoiten bzw. Bradyzoiten infiziert. Nach 3 Tagen wurde die Peritonealhöhle der Tiere gespült und das in der Peritonealspülflüssigkeit enthaltene IL-12 gemessen (Fig. 15).

Diese *ex vivo* gewonnenen Daten zeigen, daß Tachyzoiten mehr IL-12 in der Peritonealhöhle zu induzieren vermögen, als Bradyzoiten ( $P < 0,1$ ).

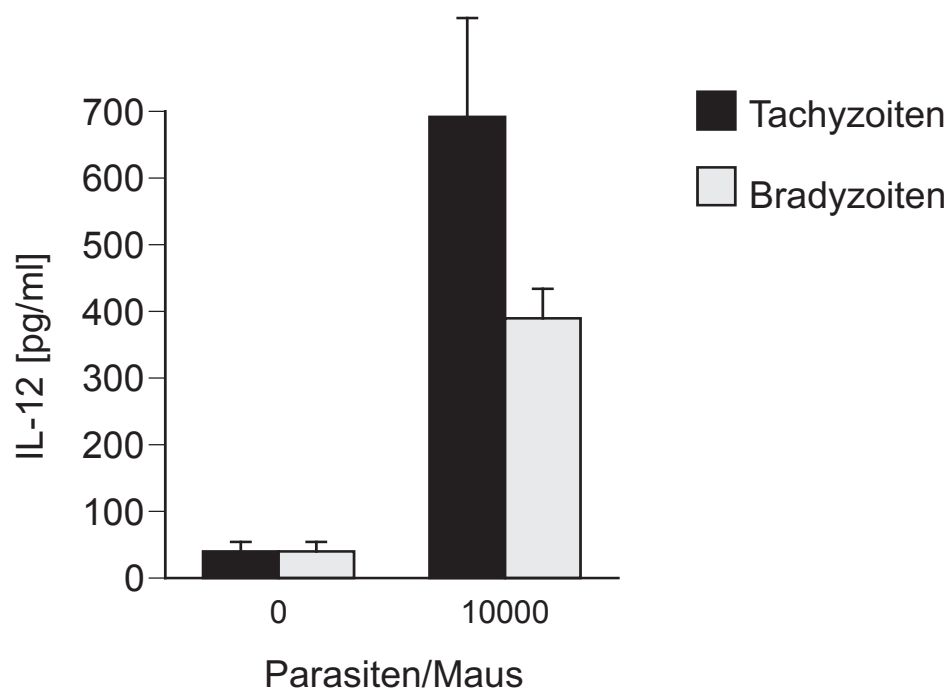
##### 4.4.2.2. Attenuierte Toxoplasmen induzieren in M $\phi$ weniger IL-12 als virulente Parasiten des gleichen Isolates

Der im Labor hauptsächlich verwendete Toxoplasmenstamm BK wurde durch Passage in L929 Fibroblasten kontinuierlich kultiviert. Im Vergleich zu Toxoplasmen, die frisch aus Passagen in Mäusen gewonnen wurden, fiel ein unterschiedliches Verhalten dieser Toxoplasmen auf. So stellte sich die Frage, ob diese in Zellkultur passagierten Toxoplasmen sich in Folge des geänderten Selektionsdruckes hinsichtlich ihrer Virulenz verändert haben.



**Fig. 14** *T. gondii* Tachyzoiten und Bradyzoiten induzieren eine IL-12-Antwort in Makrophagen

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden mit Tachyzoiten bzw. mit Bradyzoiten für 24 h inkubiert, anschließend wurde im Kulturüberstand IL-12 gemessen. Die Parasitenstadien wurden aus Zellkulturen gewonnen, die mit dem zystenbildenden *T. gondii* Stamm DX infiziert waren. Die Unterschiede in der IL-12-Antwort sind signifikant ( $P < 0,1$ ).



**Fig. 15** Eine intraperitoneale Infektion von Mäusen mit Tachyzoiten und Bradyzoiten induziert die lokale Freisetzung von IL-12

BALB/c Mäuse wurden mit *T. gondii* Tachyzoiten bzw. Bradyzoiten intraperitoneal infiziert. 3 Tage nach der Infektion wurde in der peritonealen Spülflüssigkeit IL-12 gemessen. Die Parasitenstadien wurden aus Zellkulturen gewonnen, die mit dem zystenbildenden *T. gondii* Stamm DX infiziert waren. Die Unterschiede in der IL-12-Antwort sind signifikant ( $P < 0,1$ ).

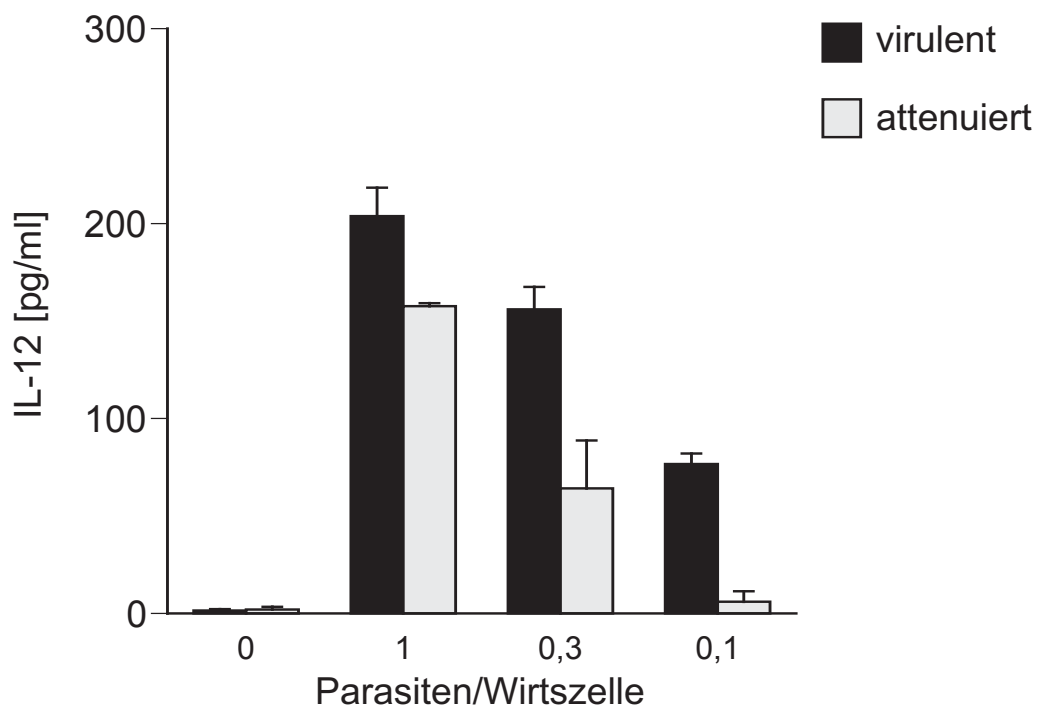
In Kooperation mit Frau Prof. Dr. H. Dlugonska (Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Universität Lodz, PL) wurde die Virulenz von *in vitro* bzw. *in vivo* passagierten Toxoplasmen an BALB/c Mäusen getestet. Je 7 Mäuse wurden mit Toxoplasmen aus beiden Passagen intraperitoneal infiziert. Mäuse, die mit passagierten Toxoplasmen infiziert wurden, verstarben, die Tiere, welche mit in Zellkulturen passagierten Toxoplasmen infiziert wurden, überlebten (Nischik et al. 2001).

Nun galt es zu klären, ob die verminderte Virulenz der *in vitro* passagierten Toxoplasmen mit einer verminderten IL-12-Induktion in M $\phi$  einhergeht.

Dazu wurden aus Mäusen des Stammes BALB/c Peritonealexsudat-Makrophagen präpariert, in 48 well-Kulturplatten ausgesät und mit virulenten bzw. attenuierten Toxoplasmen in unterschiedlichen Parasit/Wirts-Verhältnissen inkubiert.

Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und darin IL-12 bestimmt.

Es zeigte sich, daß die virulenten Toxoplasmen mehr IL-12 in M $\phi$  induzierten als die attenuierten (Fig. 16).



**Fig. 16** Virulente und attenuierte Toxoplasmen induzieren in Makrophagen unterschiedliche IL-12-Antworten

Peritonealexsudat-Makrophagen aus Mäusen des Stammes BALB/c wurden mit virulenten bzw. mit attenuierten Toxoplasmen des Stammes BK für 24 h inkubiert. Im Kulturüberstand wurde IL-12 gemessen. Die Unterschiede in der IL-12-Antwort sind signifikant ( $P < 0,1$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1. TgL – ein immunstimulatorisches Lysat aus *T. gondii*

Bisher etablierte Verfahren zur Gewinnung löslicher *T. gondii* Antigene (STAg), bestanden darin, Tachyzoiten durch Einfrieren auf  $-70^{\circ}\text{C}$  und nachfolgendes Auftauen bei  $+37^{\circ}\text{C}$  zu lysieren. Es folgte eine Behandlung mit Ultraschall. So gewonnenes Lysat wurde zentrifugiert, und der Überstand lieferte eine Antigen-Standardpräparation (Gazzinelli et al. 1991a; ähnlich Fischer et al. 1993).

Es ist schwierig, große Mengen *T. gondii* Moleküle auf diese Weise zu gewinnen. Derartige Antigenpräparationen sind außerdem wenig repräsentativ, da im Wasser schwer lösliche, z.B. membrangebundene, Moleküle bei dieser Extraktionsmethode verlorengehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ein Verfahren zu etablieren, welches es ermöglicht, mit einfachen Mitteln große Mengen eines möglichst vollständigen *T. gondii*-Lysates herzustellen. Zu diesem Zweck wurde TgL mittels einer French Press hergestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß TgL, analog einer Stimulation mit Tachyzoiten, in M $\phi$  IL-12-induziert. Die induzierten Mengen an IL-12 pro  $\mu\text{g}$  Protein des eingesetzten TgL liegen bei etwa einem Zehntel der durch STAg induzierten Zytokinmenge in einem ähnlichen Versuchsaufbau (Grunvald et al. 1996). Die scheinbare Diskrepanz ist leicht zu erklären, wenn man von der Vermutung ausgeht, daß eine lösliche Komponente der Antigenpräparation für die IL-12-Induktion verantwortlich sei, eine Behauptung die Grunvald aufstellt (Grunvald et al. 1996). Lösliche Komponenten sind in der STAg Präparation angereichert.

Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, daß es bei Einsatz hoher Mengen an TgL möglich ist, meßbare Konzentrationen des bioaktiven Heterodimers IL-12p70 in M $\phi$  zu induzieren. In der Mehrzahl der Untersuchungen wurde IL-12p40, eine Kette des IL-12p70 Heterodimers, gemessen (Gazzinelli et al. 1994; Grunvald et al. 1996, Aliberti et al. 2000). Diese Kette wird im großen Überschuß gegenüber dem aktiven Zytokin produziert und hat als Homodimer sogar inhibitorische Effekte auf die IL-12 Wirkung (Gillissen et al. 1995). Erst mit dem Nachweis von IL-12p70 läßt sich die IL-12-induzierende Aktivität von *T. gondii* als biorelevant einstufen.

TgL induziert nicht alleine IL-12 in M $\phi$ . Auch die Induktion von IL-1 $\alpha$  und IL-10 konnte gezeigt werden, Zytokine, deren Induktion auch bei einer Infektion von M $\phi$  durch Toxoplasmen *in vitro* beschrieben worden ist (Grunvald et al. 1996, Araujo et al. 2003).

## 5.2. Die IL-12-Induktion wird durch ein parasitäres Protein vermittelt

Nach Behandlung mit Proteinase K verliert TgL seine IL-12-induzierende Aktivität. Damit wurde bestätigt, daß die IL-12-Induktion in M $\phi$  durch ein Protein von *Toxoplasma gondii* vermittelt wird, eine These, die bereits von Grunvald et al. (1996) vertreten wurde.

In der Zwischenzeit haben Aliberti et al. (2003) ein *T. gondii* Protein identifiziert und rekombinant hergestellt, welches über den CCR5 Rezeptor IL-12 zu induzieren vermag. Das Protein stellt die *T. gondii* Isoform von Cyclophilin-18 dar. Antikörper gegen Cyclophilin-18 konnten die IL-12-induzierende Wirkung eines Tachyzoitenextraktes aufheben. Die IL-12-induzierende Aktivität des rekombinanten Proteins ist jedoch deutlich schwächer als die von STAg, was auf eine zweite Aktivität im Rahmen einer IL-12-Induktion hinweist.

Da darüberhinaus die Rolle von 'Toll-like' Rezeptoren bei der IL-12-Induktion gezeigt wurde (Scanga et al. 2002), spekulieren Aliberti et al. (2004), ob eine Clusterbildung zwischen Cyclophilin-18 und dem CCR5 Rezeptor einerseits und einem 'Toll-like' Rezeptor mit einen weiteren parasitären Liganden andererseits notwendig ist, um eine maximale IL-12-Induktion zu erreichen.

Auch andere exkretorisch/sekretorische Proteine von *T. gondii* spielen möglicherweise eine Rolle bei der Immunreaktion des Wirtes. Antikörper gegen das Protein 14-3-3 konnten in humanen Seren während einer akuten Toxoplasmose nachgewiesen werden (Assossou et al. 2004), und es gelang, Mäuse mittels unterschiedlicher ESA-Fractionen gegen eine Infektion mit Toxoplasmen des Stammes RH zu immunisieren (Daryani et al. 2003).

## 5.3. IL-12 wird durch durch ein exkretorisch/sekretorisches Produkt von *T. gondii* induziert

Es konnte gezeigt werden, daß eine IL-12-Antwort auch ohne Invasion der M $\phi$  durch Tachyzoiten induziert wird. M $\phi$  und Parasiten wurden dafür räumlich durch eine poröse Membran getrennt. Nach einer Ko-Kultur von 1 h wurde das Kompartiment mit den Parasiten entfernt und nach weiteren 23 h Kultur wurde im Überstand des M $\phi$ -Kompartiments IL-12 gemessen. Unter Zuhilfenahme ähnlicher Versuchsaufbauten mit Transwellmembranen, haben auch andere Arbeitsgruppen Wirkungen von *T. gondii* auf Zellen auf der anderen Seite der Membran gezeigt. Zum Beispiel demonstrieren Haque et al. (1995) auf diese Weise die Abnahme der proliferativen Antwort von Milzzellen nach einer Ko-Kultur mit Tachyzoiten.

Der Befund, daß innerhalb 1 h eine IL-12-Induktion in M $\phi$  zu beobachten war, spricht dagegen, daß dieser Effekt durch Bestandteile toter Toxoplasmen hervorgerufen wurde. Andere Arbeiten zeigen, daß es innerhalb kürzester Zeit, nämlich bereits 15 Minuten nach Stimulation durch Parasiten, zu Effekten an M $\phi$  kommt, wie der

Phosphorylierung von verschiedenen Proteinkinasen (Butcher et al. 2001). Diese Daten legen nahe, daß die IL-12-Induktion durch ein sezerniertes Produkt von *T. gondii* hervorgerufen wird.

Dementsprechend wurde eine IL-12-induzierende Aktivität auch für *T. gondii* konditioniertes Medium nachgewiesen. So gewonnenes Medium enthält auch Antigene für parasitenspezifische T-Zell-Klone (Reichmann et al. 1997) und liefert parasitäre 'dense-granules' Proteine (Fischer et al. 1993; Cesbron-Delauw et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die IL-12-induzierende Aktivität des *T. gondii*-konditionierten Mediums Proteinase K sensibel ist. Postuliert wird daher, daß sie über ein Protein vermittelt wird.

Zusammenfassend läßt sich formulieren, daß die IL-12-induzierende Aktivität in M $\phi$  durch ein lösliches Protein vermittelt wird, welches von Toxoplasmen unabhängig von der Anwesenheit von M $\phi$  sezerniert wird.

Dieser Kernbefund der Arbeit wurde zwischenzeitlich durch Ergebnisse von Aliberti et al. (2003) bestätigt: Ein konditioniertes Medium wurde durch kurzzeitige Inkubation von Tachyzoiten in PBS produziert, das konditionierte Medium zeigte gegenüber den M $\phi$ -ähnlichen dendritischen Zellen eine IL-12-induzierende Aktivität, welche Proteinase K-sensibel war. Als Herkunftsort des sezernierten Produktes (Zyclophilin-18) wurde das Endoplasmatische Retikulum der Parasiten und die parasitophore Vakuole identifiziert.

## **5.4. Die IL-12-Antwort der Makrophagen ist genetisch determiniert und korreliert mit der Virulenz der Toxoplasmen**

### **5.4.1 Abhängigkeit vom Wirtsgenom**

In Versuchsansätzen mit M $\phi$  aus Mäusen Toxoplasmose-suszeptibler Mausstämme und M $\phi$  aus Mäusen resistenter Stämme wurde gezeigt, daß die IL-12-Induktion mit der Toxoplasmose-Suszeptibilität/Resistenz korreliert. M $\phi$  aus suszeptiblen Mäusen produzieren deutlich mehr IL-12 auf eine Stimulation mit Tachyzoiten, als M $\phi$  aus resistenten Mäusen. In Kontrollversuchen wurde ausgeschlossen, daß die IL-12-Induktion von Infektionsrate und Parasitenwachstum abhängt.

Die MHC-kongeneten Mausstämme, die sich bei dem obigen Vergleich genetisch am nächsten stehen – BALB/c und BALB.B – unterscheiden sich nur im H-2 Komplex auf Chromosom 17. BALB/c hat hier den Haplotyp *d* und BALB.B den Haplotyp *b*, ansonsten sind die Tiere genetisch identisch. Die unterschiedlich starke IL-12-Antwort von M $\phi$  auf einen identischen Stimulus hin kann somit auf die Ausprägung eines oder mehrerer Allele im H-2 Komplex dieser Wirtszellen zurückgeführt werden.

Die Toxoplasmoresistenz in Mäusen wird durch die Ausprägung des L Locus im H-2 Komplex bestimmt. Der Versuch, die genetische Grundlage für die IL-12-Induktion



mit diesem Genlocus im H-2-Komplex zu korrelieren, war letztlich nicht erfolgreich. Der Vergleich von M $\phi$  aus Mäusen, welche sich genetisch einzig im Allel auf dem H-2 L Locus unterschieden, zeigte nicht wie erwartet eine hohe IL-12 Sekretion der M $\phi$  suszeptibler Tiere auf Provokation mit Toxoplasmen der Gruppe I (Stamm BK) - bzw. ein Lysat aus diesen.

Somit ist davon auszugehen, daß andere Regionen im H-2 Komplex für die IL-12-Induktion durch *T. gondii* verantwortlich sind.

Darüber hinaus gibt es inzwischen Arbeiten, die zeigen, daß die Ausprägung des L Locus für die Resistenz/Suszeptibilität von Mäusen nur dann ausschlaggebend ist, wenn die Infektion mit Toxoplasmen der Gruppe II erfolgt, nicht aber bei einer Infektion mit Toxoplasmen der Gruppe I (Johnson et al. 2002) oder Toxoplasmen des Stammes P-Br, einer natürlichen rekombinanten Kreuzung aus Erregern der Gruppe I und III (Fux et al. 2003).

M $\phi$  suszeptibler Mäuse leiten also effizient eine Immunantwort mit dem weichenstellenden und proinflammatorischen Zytokin IL-12 ein. Warum versterben aber gerade diese Tiere an einer akuten Toxoplasmose (Suzuki et al. 2000; Gazinelli et al. 1996; Neurath et al. 1995) ?

Untersuchungen zur Toxoplasma-Enzephalitis bei Mäusen zeigten, daß die Enzephalitis bei suszeptiblen Mäusen mit mehr Entzündungszellen und höheren Spiegeln an proinflammatorischen Zytokinen einhergeht (Brown et al. 1995). Auch an Patienten mit AIDS wurde gezeigt, daß bei einer Toxoplasma-Enzephalitis die Serumspiegel an IL-12 signifikant erhöht sind (Torre et al. 1999).

Untersuchungen zum IL-10, dem regulatorischen Gegenspieler des IL-12, zeigten, daß es bei IL-10 KO Mäusen zu einer Überproduktion von IL-12, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  kommt. Die Tiere versterben an einer damit verbundenen überschießenden Immunantwort mit vermehrter zellulärer Infiltration und intensiven Nekrosen (Gazinelli et al. 1996b), ohne daß sich Hinweise auf eine verstärkte Parasitenvermehrung finden lassen.

Es ergibt sich ein Widerspruch zwischen einer effizienten Kontrolle der Parasitenvermehrung einerseits und der hohen Morbidität andererseits. Vor diesem Hintergrund läßt sich postulieren, daß suszeptible Tiere nicht einer unkontrollierten Erregervermehrung zum Opfer fallen, sondern der eigenen Immunantwort erliegen.

In resistenten Tiere hingegen wird die Immunantwort so dezidiert gesteuert - z.B. durch frühzeitige und ausreichende Sekretion von gegenregulatorischen Zytokinen wie IL-10 oder durch angepaßte Expression von kostimulatorischen Molekülen (Fischer et al. 1998a) - daß eine Begrenzung der Erregervermehrung stattfindet, ohne ein pathologisches Überschießen der Th1-Zellantwort zu verursachen.

So betrachtet kommt IL-12 eine andere Bedeutung zu: IL-12 scheint für die Immunpathologie nach *T. gondii*-Infektion verantwortlich zu sein.

### 5.4.2 Abhängigkeit von der Virulenz des Parasiten

Der Vergleich von Tachyzoiten mit Bradyzoiten aus demselben *T. gondii* Stamm (DX) zeigt, daß auch der Erreger einen Einfluß auf die Menge des induzierten IL-12 hat. Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* induziert das Parasitenstadium, das mit der Pathologie im Wirt assoziiert ist, nämlich die Tachyzoiten, signifikant mehr IL-12 als die Bradyzoiten. Die *ex vivo* Daten lassen vermuten, daß Tachyzoiten den Organismus zu einer stärkeren inflammatorischen Reaktion stimulieren als Bradyzoiten. Diese Reaktion scheint auch über die erste Phase der Infektion hinaus anzudauern, denn selbst nach 3 Tagen ist die intraperitoneal gemessene IL-12 Menge nach Infektion mit Tachyzoiten bzw. Bradyzoiten signifikant verschieden. Im Zusammenhang mit dem *in vitro* Befund, daß es bei *T. gondii* zu einer Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten bevorzugt dann kommt, wenn die Zytokinantwort der M $\phi$  nicht maximal ist und mittlere NO Spiegel produziert werden (Bohne et al. 1994), kann man vermuten, daß die Infektion von Wirtszellen mit Bradyzoiten und die folgende reduzierte Zytokinantwort der M $\phi$  ideale Bedingungen für die Zystenbildung und so eine „latente“ Infektion schafft. Eine Infektion mit Tachyzoiten würde demnach Bedingungen schaffen, die für die Stadienkonversion nicht geeignet sind, eine Zellyse durch die Erreger fände statt und die Zytokinantwort würde weiterhin auf einem hohen Niveau ablaufen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der IL-12-Induktion und der Pathogenität des Tachyzoitenstadiums wurde näher untersucht. Dazu wurden Toxoplasmen durch kontinuierliche *in vitro* Passage attenuiert. Diese Parasiten zeigen in Mäusen eine verminderte Virulenz im Vergleich zu Parasiten vom selben Stamm, die *in vivo* passagiert waren. Komparative Proteomanalysen ergaben eine verminderte Expression an Aktin, Katalase, Micronemen Protein 5 und den 'dense granules' Proteinen GRA 1 bis 8 in den attenuierten Parasiten (Nischik et al. 2001). Von diesen Proteinen ist das 'dense granules' Protein GRA 2 bereits als Virulenzfaktor identifiziert worden: Mäuse, die mit einer Mutante des sonst hochvirulenten RH Toxoplasmenstammes, welche kein GRA 2 synthetisieren kann, infiziert werden, zeigen deutlich höhere Überlebensraten, als bei einer Infektion mit dem Wildtyp. Ferner kommt es bei Infektion mit der Mutante eher zu einem chronischen Verlauf der Toxoplasmose (Mercier et al. 1998).

Daß Toxoplasmen sich abhängig von ihren Lebensbedingungen in ihrer Virulenz ändern, haben auch Yano et al. (1986) gezeigt. Durch Passage von Parasiten in vor-immunisierten Mäusen erhielten sie Linien des virulenten RH Stammes, die deutlich an Virulenz verloren hatten. Änderungen des Proteinexpressionsmusters je nach Kulturbedingungen beobachten auch Klein et al. (1998). Unterschiedliche Kulturbedingungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führen zu abweichenden Antigenmustern der Parasiten in der PCR.

Die veränderte Virulenz der attenuierten Toxoplasmen korreliert auch mit der IL-12-Induktion in M $\phi$ , die unter dem Niveau der IL-12-Induktion durch nicht attenuierte Parasiten liegt.

Die Ergebnisse aus beiden Vergleichen, Tachyzoiten vs. Bradyzoiten und virulente vs. attenuierte Tachyzoiten, scheinen somit konsistent und lassen postulieren, daß die

IL-12-induzierende Aktivität von *T. gondii* auch zur Pathogenität des Erregers beiträgt. Da IL-12 per se für die Kontrolle der Infektion unabdingbar ist (Gazzinelli et al. 1994; Khan et al. 1994), beruht die Virulenz von Tachyzoiten möglicherweise auf einer IL-12-Überinduktion.

Dagegen steht die Beobachtung von Robben et al. (2004), daß eine Infektion von murinen Makrophagen mit Toxoplasmen der Gruppe II (Stamm PTG) mehr proinflammatorische Zytokine (u.a. IL-12) induziert als eine Infektion mit Toxoplasmen der Gruppe I (Stamm RH). Sie argumentieren, daß diese starke Immunantwort dem Überleben des Wirtes zuträglich ist. Diese Unterschiede konnten nicht mittels eines *T. gondii*-Lysates nachvollzogen werden.

Beide Befunde lassen sich mit Stammunterschieden erklären. So haben Araujo et al. (2003) bei Infektionen von Mäusen mit zwei Stämmen der Toxoplasmen Gruppe II (ME49 und FORT) signifikante Unterschiede hinsichtlich der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und dem Ausprägungsgrad einer Toxoplasmen-Enzephalitis gezeigt. Das könnte bedeuten, daß die hier gezeigten Unterschiede der IL-12-Induktion nicht auf Toxoplasmen-Gruppen übertragbar sind und nur Stammunterschiede darstellen.

### **5.4.3 Die ambivalente Rolle von IL-12 bei der Immunabwehr einer *T. gondii*-Infektion**

Jüngste Arbeiten zur Immunabwehr einer Toxoplasmeninfektion im Mausmodell zeigen, daß IL-12, so sehr es für die Kontrolle der Infektion essentiell ist, bei einer Überinduktion zum Pathogenitätsfaktor werden kann.

Einerseits führt Cyclophilin-18, welches von den Parasiten aktiv sezerniert wird, zu einer direkten Induktion von IL-12 über den CCR5 Rezeptor (Aliberti et al. 2003), so als ob der Parasit „absichtlich“ eine frühe Immunantwort des Wirtes provoziert. Ohne diesen Signalweg ist die Immunantwort inkompetent, genauso wie auch bei einer Störung des MyD88 Signalweges (Scanga et al. 2002; Denkers et al. 2004), der wahrscheinlich durch andere LPS-artige *T. gondii*-Moleküle unabhängig davon aktiviert wird (Del Rio et al. 2004). In beiden Fällen wird zu wenig IL-12 produziert und das Parasitenwachstum kann nicht kontrolliert werden.

Auf der anderen Seite wird, nachdem eine Th1-Antwort eingeleitet wurde, die IL-12-Produktion durch Produkte des Parasiten direkt heruntergeregelt. Eine Paralyse von IL-12-produzierenden Dendritischen Zellen findet durch die Induktion von Lipoxin A4 statt, welches wahrscheinlich von Makrophagen sezerniert wird. Es kommt zu einer Hemmung der CCR5 Expression (Aliberti et al. 2002a; 2002b). Mäuse mit einem Defekt für ein Enzym, welches für die Lipoxin A4 Produktion notwendig ist, versterben nach *T. gondii*-Infektion an einem Zytokinschock (Sacks et al. 2002) bzw. an einer ausgeprägten Enzephalitis (Aliberti et al. 2002c).

Somit sind es offenbar Signale des Parasiten, die die Immunantwort starten, aber auch wieder herunterregeln (Denkers et al. 2003b). Das Supprimieren der Wirts-

immunantwort scheint in diesem Zusammenhang weniger dem Zweck zu dienen, dem Parasiten ein ungestörtes Wachstum zu ermöglichen, als vielmehr ein Überleben des Wirtsorganismus sicherzustellen, in dem dieser vor einer überschießenden Immunreaktion selbst geschützt wird.

Welchen hohen Stellenwert die Kontrolle der IL-12-Produktion hat, sieht man an der Vielzahl weiterer gegenregulatorischer Mechanismen. Suzuki et al. (2000) zeigten, daß IL-10 notwendig ist, um Nekrosen im Dünndarm von Mäusen zu verhindern, welche mit *T. gondii* oral infiziert worden sind. Schlüter et al. (2003) demonstrierten die Bedeutung von TNF und Lymphotoxin  $\alpha$  in der Kontrolle einer *T. gondii*-Infektion des zentralen Nervensystems von Mäusen. Denkers et al. (2004) zeigten sogar, daß es im Rahmen einer *T. gondii*-Infektion zur Blockade der 'nuklear factor-kappaB' und 'mitogen-activated protein kinase' Signalwege kommt, die für eine Aktivierung der Immunantwort über den 'toll-like' Rezeptor notwendig sind. Braun et al. (2001) schließlich geht auf die Rolle von G-Protein gekoppelten Rezeptoren bei der Regelung der Produktion von Zytokinen wie IL-12 ein.

Dem Zytokin IL-12 kommt nicht nur im Rahmen einer Toxoplasmose eine zentrale Bedeutung zu. Auch in der Pathogenese des LPS-induzierten Endotoxinschocks hat es eine zentrale Funktion (Heinzel et al. 1994; Wysocka et al. 1995). Autoimmune Kolitis in Mäusen konnte durch anti-IL-12 Antikörper erfolgreich behandelt werden (Neurath et al. 1995). Und ebenso zeigte sich bei einer experimentellen allergischen Enzephalomyelitis, daß Zellen des Th2-Typs protektiv wirken, Zellen des Th1-Typs hingegen die Erkrankung unterhalten (Liblau et al. 1995).

---

## 6. Literaturverzeichnis

**Achbarou, A., Mercereau-Pujalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D. and Dubremetz, J. F.** (1991). „Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*.“ Parasitology **103 Pt 3**: 321-9.

**Aldrich, C. J., Hammer, R. E., Jones-Youngblood, S., Koszinowski, U., Hood, L., Stroynowski, I. and Forman, J.** (1991). „Negative and positive selection of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes affected by the alpha 3 domain of MHC I molecules.“ Nature **352(6337)**: 718-21.

**Alexander, J., Jebbari, H., Bluethmann, H., Satoskar, A. and Roberts, C. W.** (1996). „Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design.“ Curr Top Microbiol Immunol **219**: 183-95.

**Alexander, J., Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Roberts, C. W., Liew, F. Y. and Sher, A.** (1997). „Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection.“ Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352(1359)**: 1355-9.

**Aliberti, J., C. Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle and A. Sher** (2000). „CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 $\alpha^+$  dendritic cells.“ Nat. Immunol. **1(1)**: 83-87.

**Aliberti, J., Hieny, S., Reis e Sousa, C., Serhan, C. N. and Sher, A.** (2002). „Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity.“ Nat Immunol **3(1)**: 76-82.

**Aliberti, J., Serhan, C. and Sher, A.** (2002). „Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection.“ J Exp Med **196(9)**: 1253-62.

**Aliberti, J. and Sher, A.** (2002). „Role of G-protein-coupled signaling in the induction and regulation of dendritic cell function by *Toxoplasma gondii*.“ Microbes Infect **4(9)**: 991-7.

- Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Resi e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J.M., R. and Sher, A. (2003).** „Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells.“ Nat. Immunol. **4**(5): 485-90.
- Aliberti, J., Jankovic, D. and Sher, A. (2004).** „Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection.“ Immunol Rev **201**: 26-34.
- Araujo, F. G., Williams, D. M., Grumet, F. C. and Remington, J. S. (1976).** „Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma.“ Infect Immun **13**(5): 1528-30.
- Araujo, F. G., Huskinson-Mark, J., Gutteridge, W. E. and Remington, J. S. (1992).** „In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*.“ Antimicrob Agents Chemother **36**(2): 326-30.
- Araujo, F. G. and Slifer, T. (2003).** „Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice.“ Infect Immun **71**(7): 4171-4.
- Assossou, O., Besson, F., Rouault, J. P., Persat, F., Ferrandiz, J., Mayencon, M., Peyron, F. and Picot, S. (2004).** „Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites.“ FEMS Microbiol Lett **234**(1): 19-25.
- Balsari, A., Poli, G., Molina, V., DAVIS, M., Petruzzelli, E., Boniolo, A. and Rolleri, E. (1980).** „ELISA for toxoplasma antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests.“ J Clin Pathol **33**(7): 640-3.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998).** „Dendritic cells and control of immunity.“ Nature **392**: 245-252.
- Barragan, A. and Sibley, L. D. (2002).** „Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence.“ J Exp Med **195**(12): 1625-33.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O. and Joiner, K. A. (1994).** „The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm.“ J Cell Biol **127**(4): 947-61.
-



- Beller, D. I., Kiely, J. M. and Unanue, E. R.** (1980). „Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli.“ J Immunol **124**(3): 1426-32.
- Blass, S. L., Pure, E. and Hunter, C. A.** (2001). „A role for CD44 in the production of IFN-gamma and immunopathology during infection with *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **166**(9): 5726-32.
- Bliss, S. K., Butcher, B. A. and Denkers, E. Y.** (2000). „Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection.“ J Immunol **165**(8): 4515-21.
- Bohne, W., Heesemann, J. and Gross, U.** (1994). „Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion.“ Infect Immun **62**(5): 1761-7.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J. and Heesemann, J.** (1995). „Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants.“ Mol Microbiol **16**(6): 1221-30.
- Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H., Isaac-Renton, J. L., Bell, A., Eng, S. B. and Marion, S. A.** (1997). „Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team.“ Lancet **350**(9072): 173-7.
- Braun, M. C. and Kelsall, B. L.** (2001). „Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors.“ Microbes Infect **3**(2): 99-107.
- Brecht, S., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J., Giddings, O. K., Wang, G., Jakle, U., Harper, J. M., Sibley, L. D. and Soldati, D.** (2001). „The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains.“ J Biol Chem **276**(6): 4119-27.
- Brinkmann, V., Remington, J. S. and Sharma, S. D.** (1993). „Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells and induces Toxoplasma specific IgG antibody.“ Mol Immunol **30**(4): 353-8.



- Brown, C. R., Hunter, C. A., Estes, R. G., Beckmann, E., Forman, J., David, C., Remington, J. S. and McLeod, R.** (1995). „Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis.“ Immunology **85**(3): 419-28.
- Bulow, R. and Boothroyd, J. C.** (1991). „Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes.“ J Immunol **147**(10): 3496-500.
- Butcher, B. A., Kim, L., Johnson, P. F. and Denkers, E. Y.** (2001). „*Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B.“ J Immunol **167**(4): 2193-201.
- Buxton, D., Thomson, K. M. and Maley, S.** (1993). „Treatment of ovine toxoplasmosis with a combination of sulphamezathine and pyrimethamine.“ Vet Rec **132**(16): 409-11.
- Cai, G., Kastelein, R. and Hunter, C.** (2000). „Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*.“ Infect. Immun. **68**: 6932.
- Capron, A. and Dessaint, J. P.** (1988). „Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens.“ Ann Inst Pasteur Immunol **139**(1): 109-17.
- Carey, K. L., Donahue, C. G. and Ward, G. E.** (2000). „Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*.“ Mol Biochem Parasitol **105**(1): 25-37.
- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D.** (1997). „Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts.“ Eur J Cell Biol **73**(2): 114-23.
- Carruthers, V. B.** (2002). „Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*.“ Acta Trop **81**(2): 111-22.

**Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X. and Trinchieri, G.** (1995). „Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes.“ Eur J Immunol **25**(1): 1-5.

**Cesbron-Delauw, M. F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R. J., Lenzen, G., Cesbron, J. Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J. P. and et al.** (1989). „Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*.“ Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7537-41.

**Cesbron-Delauw, M. F.** (1994). „Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship.“ Parasitol Today **10**(8): 293-6.

**Cesbron-Delauw, M. F., Lecordier, L. and Mercier, C.** (1996). „Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis.“ Curr Top Microbiol Immunol **219**: 59-65.

**Chakraborty, A., Li, L., Chakraborty, N. G. and Mukherji, B.** (1999). „Stimulatory and inhibitory maturation of human macrophage-derived dendritic cells.“ Pathobiology **67**: 282-286.

**Chardes, T., Bourguin, I., Mevelec, M. N., Dubremetz, J. F. and Bout, D.** (1990). „Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens.“ Infect Immun **58**(5): 1240-6.

**Chardes, T., Velge-Roussel, F., Mevelec, P., Mevelec, M. N., Buzoni-Gatel, D. and Bout, D.** (1993). „Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice.“ Immunology **78**(3): 421-9.

**Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F. and Capron, A.** (1990). „*Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites.“ Exp Parasitol **71**(1): 114-24.

**Conley, F. K., Jenkins, K. A. and Remington, J. S.** (1981). „*Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections.“ Hum Pathol **12**(8): 690-8.

**Cook, A. J., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E. and Dunn, D. T.** (2000). „Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis.“ Bmj **321**(7254): 142-7.

**Cristina, N., Darde, M. L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M. and Ambroise-Thomas, P.** (1995). „A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups.“ Parasitol Res **81**(1): 32-7.

**D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S. H., Kobayashi, M., Young, D., and Nickbarg, E.** (1992). „Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.“ J Exp Med **176**(5): 1387-98.

**D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M. and Trinchieri, G.** (1993). „Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.“ J Exp Med **178**(3): 1041-8.

**Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., Thulliez, P., Aufrant, C., Valenti, D. and Cox, W. L.** (1988). „Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis.“ N Engl J Med **318**(5): 271-5.

**Dannemann, B. R., Vaughan, W. C., Thulliez, P. and Remington, J. S.** (1990). „Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*.“ J Clin Microbiol **28**(9): 1928-33.

**Daryani, A., Hosseini, A. Z. and Dalimi, A.** (2003). „Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model.“ Vet Parasitol **113**(2): 123-34.

**Del Rio, L., Butcher, B. A., Bennouna, S., Hieny, S., Sher, A. and Denkers, E. Y.** (2004). „*Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors.“ J Immunol **172**(11): 6954-60.

- Denkers, E. Y., T., S.-K., Gazzinelli, R. T., Yap, G., Charest, H. and A., S.** (1997). Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: redundant and required mechanisms as revealed by studies in gene knockout mice. Austin, Texas, R.G. Landes Co.
- Denkers, E. Y., Yap, G., Schariton-Kersten, T., Charest, H., Butcher, B. A., Caspar, P., Heiny, S. and Sher, A.** (1997). „Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **159**(4): 1903-8.
- Denkers, E. Y. and Gazzinelli, R. T.** (1998). „Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.“ Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-88.
- Denkers, E. Y.** (1999). „T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*.“ Microbes Infect **1**(9): 699-708.
- Denkers, E. Y.** (2003). „From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*.“ FEMS Immunol Med Microbiol **39**(3): 193-203.
- Denkers, E. Y., Kim, L. and Butcher, B. A.** (2003). „In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection.“ Cell Microbiol **5**(2): 75-83.
- Denkers, E. Y., Butcher, B. A., Del Rio, L. and Kim, L.** (2004). „Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection.“ Immunol Rev **201**: 191-205.
- Dobrowolski, J. M. and Sibley, L. D.** (1996). „*Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite.“ Cell **84**(6): 933-9.
- Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K.** (1970). „Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*.“ J Parasitol **56**(3): 447-56.
- Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K.** (1970). „The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces.“ J Exp Med **132**(4): 636-62.
- Dubey, J. P. and Frenkel, J. K.** (1976). „Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts.“ J Protozool **23**(4): 537-46.

**Dubey, J. P.** (1977). *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals*. New York, Academic Press.

**Dubey, J. P. and Beattie, C. P.** (1988). *Toxoplasmosis of animal and Man*. Boca Raton, CRC Press.

**Dubey, J. P. and Carpenter, J. L.** (1993). „Neonatal toxoplasmosis in littermate cats.“ *J Am Vet Med Assoc* **203**(11): 1546-9.

**Dubey, J. P.** (1998). Toxoplasmosis. *Microbiology and Microbial Infections*. Topley and Wilson: 303-318.

**Dubey, J. P., Gamble, H. R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S. and Thuilliez, P.** (2002). „High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts.“ *J Parasitol* **88**(6): 1234-8.

**Duquesne, V., Auriault, C., Gras-Masse, H., Boutillon, C., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M. F., Tartar, A. and Capron, A.** (1991). „Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*.“ *Clin Exp Immunol* **84**(3): 527-34.

**Fadul, C. E., Channon, J. Y. and Kasper, L. H.** (1995). „Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes.“ *Infect Immun* **63**(11): 4290-4.

**Feinstein, D. L., Galea, E. and Reis, D. J.** (1997). „Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock: effects on proteolytic degradation of IkappaB-alpha.“ *Nitric Oxide* **1**(2): 167-76.

**Ferguson, D. J. and Hutchison, W. M.** (1987). „An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice.“ *Parasitol Res* **73**(6): 483-91.

**Fischer, H. G., Nitzgen, B., Germann, T., Degitz, K., Däubener, W. and Hadding, U.** (1993). „Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function.“ *J Neuroimmunol* **42**(1): 87-95.

- Fischer, H. G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Gross, U. and Hadding, U.** (1997). „Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain.“ Parasitol Res **83**(7): 637-41.
- Fischer, H. G., Dörfler, R., Schade, B. and Hadding, U.** (1998). „Differential CD86/B7-2 expression and cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice.“ International Immunology **11**(3): 341-349.
- Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E. and Reichmann, G.** (1998). „GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells.“ Mol Biochem Parasitol **91**(2): 251-62.
- Flesch, I. E., Hess, J. H., Huang, S., Aguet, M., Rothe, J., Bluethmann, H. and Kaufmann, S. H.** (1995). „Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha.“ J Exp Med **181**(5): 1615-21.
- Frenkel, J. K.** (1967). „Adoptive immunity to intracellular infection.“ J Immunol **98**(6): 1309-19.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L.** (1970). „*Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts.“ Science **167**(919): 893-6.
- Frenkel, J. K.** (1973). „*Toxoplasma* in and around us.“ BioScience **23**: 343-52.
- Frenkel, J. K.** (1988). „Pathophysiology of toxoplasmosis.“ Parasitol. Today **4**: 273-278.
- Frenkel, J. K., Pfefferkorn, E. R., Smith, D. D. and Fishback, J. L.** (1991). „Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats.“ Am J Vet Res **52**(5): 759-63.
- Fux, B., Rodrigues, C. V., Portela, R. W., Silva, N. M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R. W. and Gazzinelli, R. T.** (2003). „Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **71**(11): 6392-401.

**Garcia-Reguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C. J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D. and Dubremetz, J. F.** (2000). „The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite.“ Cell Microbiol **2**(4): 353-64.

**Gavinet, M. F., Robert, F., Firtion, G., Delouvrier, E., Hennequin, C., Maurin, J. R., Tourte-Schaefer, C. and Dupouy-Camet, J.** (1997). „Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy.“ J Clin Microbiol **35**(5): 1276-7.

**Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. and Sher, A.** (1991). „Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine.“ J Immunol **146**(1): 286-92.

**Gazzinelli, R. T., Hakim, T., Hieny, S., Shaerer, G. M. and Sher, A.** (1991). „Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses.“ Infect Immun **60**: 4394-4401.

**Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. and Sher, A.** (1992). „IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- gamma-activated macrophages.“ J Immunol **148**(6): 1792-6.

**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 [see comments].“ Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6115-9.

**Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E. Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G. and Sher, A.** (1994). „Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **153**(6): 2533-43.

**Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J. M. and Sher, A.** (1996). „Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*.“ Curr Top Microbiol Immunol **219**: 127-39.



**Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G. and Sher, A.** (1996). „In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha.“ J Immunol **157**(2): 798-805.

**Gazzinelli, R. T., Talvani, A., Camargo, M. M., Santiago, H. C., Oliveira, M. A., Vieira, L. Q., Martins, G. A., Aliberti, J. C. and Silva, J. S.** (1998). „Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa.“ Braz J Med Biol Res **31**(1): 89-104.

**Georgiev, V. S.** (1994). „Management of toxoplasmosis.“ Drugs **48**(2): 179-88.

**Germann, T. and Rude, E.** (1995). „Interleukin-12.“ Int Arch Allergy Immunol **108**(2): 103-12.

**Gilbert, R., Dunn, D., Wallon, M., Hayde, M., Prusa, A., Lebech, M., Kortbeek, T., Peyron, F., Pollak, A. and Petersen, E.** (2001). „Ecological comparison of the risks of mother-to-child transmission and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis according to prenatal treatment protocol.“ Epidemiol Infect **127**(1): 113-20.

**Gilbert, R. E., Gras, L., Wallon, M., Peyron, F., Ades, A. E. and Dunn, D. T.** (2001). „Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France.“ Int J Epidemiol **30**(6): 1303-8.

**Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S. and Gately, M. K.** (1995). „Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist.“ Eur J Immunol **25**(1): 200-6.

**Grover, C. M., Thulliez, P., Remington, J. S. and Boothroyd, J. C.** (1990). „Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid.“ J Clin Microbiol **28**(10): 2297-301.

- Grunvald, E., Chiaramonte, M., Hieny, S., Wysocka, M., Trinchieri, G., Vogel, S. N., Gazzinelli, R. T. and Sher, A.** (1996). „Biochemical characterization and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **64**(6): 2010-8.
- Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M. and Familletti, P. C.** (1991). „Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor.“ Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
- Guerina, N. G., Hsu, H. W., Meissner, H. C., Maguire, J. H., Lynfield, R., Stechenberg, B., Abroms, I., Pasternack, M. S., Hoff, R. and Eaton, R. B.** (1994). „Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group.“ N Engl J Med **330**(26): 1858-63.
- Hakansson, S., Charron, A. J. and Sibley, L. D.** (2001). „Toxoplasma vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole.“ Embo J **20**(12): 3132-44.
- Haque, S., Haque, A. and Kasper, L. H.** (1995). „A *Toxoplasma gondii*-derived factor(s) stimulates immune downregulation: an *in vitro* model.“ Infect Immun **63**(9): 3442-7.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Seppaia, I. and Makela, O.** (1989). „Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG.“ J Infect Dis **159**(4): 736-40.
- Heinzl, F. P., Rerko, R. M., Ling, P., Hakimi, J. and Schoenhaut, D. S.** (1994). „Interleukin 12 is produced *in vivo* during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon.“ Infect Immun **62**(10): 4244-9.
- Hibbs, J. B., Jr., Lambert, L. H., Jr. and Remington, J. S.** (1971). „Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*.“ J Infect Dis **124**(6): 587-92.
- Holland, G., O'Connor, G., Belfort, R. J. and Remington, J.** (1996). Toxoplasmosis. St. Luis.
-

- Holland, G. N.** (1999). „Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis.“ Am J Ophthalmol **128**(4): 502-5.
- 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**(6): 1561-6.
- Howe, D. K., Honore, S., Derouin, F. and Sibley, L. D.** (1997). „Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis.“ J Clin Microbiol **35**(6): 1411-4.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O’Garra, A. and Murphy, K. M.** (1993). „Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.“ Science **260**(5107): 547-9.
- Hunter, C. A. and Remington, J. S.** (1994). „Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis.“ J Infect Dis **170**(5): 1057-67.
- Hunter, C. A., Candolfi, E., Subauste, C., Van Cleave, V. and Remington, J. S.** (1995). „Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis.“ Immunology **84**(1): 16-20.
- Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D. and Carruthers, V. B.** (2003). „Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex.“ Embo J **22**(9): 2082-90.
- Israelski, D. M. and Remington, J. S.** (1993). „Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host.“ Curr Clin Top Infect Dis **13**: 322-56.
- Johnson, J. J., Roberts, C. W., Pope, C., Roberts, F., Kirisits, M. J., Estes, R., Mui, E., Krieger, T., Brown, C. R., Forman, J. and McLeod, R.** (2002). „*In vitro* correlates of Ld-restricted resistance to toxoplasmic encephalitis and their critical dependence on parasite strain.“ J Immunol **169**(2): 966-73.
- Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H. and Mellman, I.** (1990). „*Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts.“ Science **249**(4969): 641-6.

**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.“ J Immunol **164**(5): 2629-34.

**Kaplan, J. E., Masur, H. and Holmes, K. K.** (2002). „Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons—2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America.“ MMWR Recomm Rep **51**(RR-8): 1-52.

**Kasper, L. H.** (1989). „Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **57**(3): 668-72.

**Kasper, L. H.** (1994). *Toxoplasma Infection and Toxoplasmosis*. Harrison's Principles of Internal Medicine. Harrison, McGraw-Hill. **1**: 903-8.

**Khan, I. A., Eckel, M. E., Pfefferkorn, E. R. and Kasper, L. H.** (1988). „Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*.“ J Infect Dis **157**(5): 979-84.

**Khan, I. A., Ely, K. H. and Kasper, L. H.** (1991). „A purified parasite antigen (p30) mediates CD8<sup>+</sup> T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice.“ J Immunol **147**(10): 3501-6.

**Khan, I. A., Matsuura, T. and Kasper, L. H.** (1994). „Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis.“ Infect Immun **62**(5): 1639-42.

**Khan, I. A. and Kasper, L. H.** (1996). „IL-15 augments CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice.“ J Immunol **157**(5): 2103-8.

**Klein, H., Anduleit, M., Bornhak, M., Fischer, M., Gross, U., Loschner, B., Nicol, S., Reiter-Orwona, I. I., Zyto, N. and Montag-Lessing, T.** (1998). „[Characteristics of *Toxoplasma-gondii*-tachyzoites from different culture systems].“ Altex **15**(5): 37-39.

**Klein, J., Figueroa, F. and David, C. S.** (1983). „H-2 haplotypes, genes and antigens: second listing. II. The H-2 complex.“ Immunogenetics **17**(6): 553-96.

**Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G.** (1989). „Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.“ J Exp Med **170**(3): 827-45.

**Kovacs, J. A.** (1992). „Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. The NIAID-Clinical Center Intramural AIDS Program.“ Lancet **340**(8820): 637-8.

**Kuby, J., Goldsby, R. A., Kindt, T. J. and Osborne, B. A.** (1994). Immunology, Freeman W H & Co.

**Laemmli, U.** (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ Nature **227**: 680-685.

**Lamont, A. G. and Adorini, L.** (1996). „IL-12: a key cytokine in immune regulation.“ Immunol Today **17**(5): 214-7.

**Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** (1993). „Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane.“ Mol Biochem Parasitol **59**(1): 143-53.

**Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** (1995). „Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole.“ Mol Biochem Parasitol **70**(1-2): 85-94.

**Liblau, R. S., Singer, S. M. and McDevitt, H. O.** (1995). „Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases.“ Immunol Today **16**(1): 34-8.

**Lucet, J. C., Bailly, M. P., Bedos, J. P., Wolff, M., Gachot, B. and Vachon, F.** (1993). „Septic shock due to toxoplasmosis in patients infected with the human immunodeficiency virus.“ Chest **104**(4): 1054-8.

**Lüder, C. G., Lang, T., Beuerle, B. and Gross, U.** (1998). „Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*.“ Clin Exp Immunol **112**(2): 308-16.

**Lüder, C. G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M. J. and Gross, U.** (2001). „*Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha.“ Eur J Immunol **31**(5): 1475-84.

**Luft, B. J., Conley, F., Remington, J. S., Laverdiere, M., Wagner, K. F., Levine, J. F., Craven, P. C., Strandberg, D. A., File, T. M., Rice, N. and Meunier-Carpentier, F.** (1983). „Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America.“ Lancet **1**(8328): 781-4.

**Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E. and Remington, J. S.** (1984). „Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome.“ Jama **252**(7): 913-7.

**Luft, B. J. and Remington, J. S.** (1992). „Toxoplasmic encephalitis in AIDS.“ Clin Infect Dis **15**(2): 211-22.

**Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., Bourland, D. D., 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J. and Jacobson, J.** (1993). „Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team.“ N Engl J Med **329**(14): 995-1000.

**Lycke, E., Carlberg, K. and Norrby, R.** (1975). „Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of toxoplasma.“ Infect Immun **11**(4): 853-61.

**Mahmoud, A. A., Warren, K. S. and Strickland, G. T.** (1976). „Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*.“ Nature **263**(5572): 56-7.

**Mariuz, P., Bosler, E. M. and Luft, B. J.** (1997). „Toxoplasma pneumonia.“ Semin Respir Infect **12**(1): 40-3.

**McLeod, R., Skamene, E., Brown, C. R., Eisenhauer, P. B. and Mack, D. G.** (1989). „Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of A x B/B x A recombinant inbred and B10 congenic mice.“ J Immunol **143**(9): 3031-4.

**McLeod, R., Brown, C. and Mack, D.** (1993). „Immunogenetics influence outcome of *Toxoplasma gondii* infection.“ Res Immunol **144**(1): 61-5.

**Mehlhorn, H. and Piekarski, G.** (1989). Grundriß der Parasitenkunde. Stuttgart, Fischer.

**Merberg, D. M., Wolf, S. F. and Clark, S. C.** (1992). „Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family.“ Immunol Today **13**(2): 77-8.

**Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D., Lingnau, M. and Sibley, L. D.** (1998). „Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice.“ Infect Immun **66**(9): 4176-82.

**Montoya, J. G. and Remington, J. S.** (1996). „Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis.“ Clin Infect Dis **23**(2): 277-82.

**Montoya, J. G., Jordan, R., Lingamneni, S., Berry, G. J. and Remington, J. S.** (1997). „Toxoplasmic myocarditis and polymyositis in patients with acute acquired toxoplasmosis diagnosed during life.“ Clin Infect Dis **24**(4): 676-83.

**Montoya, J. G.** (2002). „Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis.“ J Infect Dis **185** **Suppl 1**: S73-82.

**Montoya, J. G., Liesenfeld, O., Kinney, S., Press, C. and Remington, J. S.** (2002). „VIDAS test for avidity of Toxoplasma-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women.“ J Clin Microbiol **40**(7): 2504-8.

**Montoya, J. G. and Liesenfeld, O.** (2004). „Toxoplasmosis.“ Lancet **363**(9425): 1965-76.

**Mordue, D. G. and Sibley, L. D.** (1997). „Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry.“ J Immunol **159**(9): 4452-9.



- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L. D.** (1999). „Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.“ J Exp Med **190**(12): 1783-92.
- Mordue, D. G., Hakansson, S., Niesman, I. and Sibley, L. D.** (1999). „*Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways.“ Exp Parasitol **92**(2): 87-99.
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A. and Sibley, L. D.** (2001). „Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines.“ J Immunol **167**(8): 4574-84.
- Mordue, D. G. and Sibley, L. D.** (2003). „A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis.“ J Leukoc Biol **74**(6): 1015-25.
- Mosmann, T. R. and Sad, S.** (1996). „The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.“ Immunol Today **17**(3): 138-46.
- Mountford, A. P., Coulson, P. S., Cheever, A. W., Sher, A., Wilson, R. A. and Wynn, T. A.** (1999). „Interleukin-12 can directly induce T-helper 1 responses in interferon- gamma (IFN-gamma) receptor-deficient mice, but requires IFN-gamma signaling to downregulate T-helper 2 responses.“ Immunology **97**(4): 588-94.
- Mun, H. S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Piao, L. X., Takeuchi, O., Akira, S., Ishikura, H. and Yano, A.** (2003). „TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection.“ Int Immunol **15**(9): 1081-7.
- Nakano, Y., Hisaeda, H., Sakai, T., Zhang, M., Maekawa, Y., Zhang, T. and Himeno, K.** (2001). „Role of innate immune cells in protection against *Toxoplasma gondii* at inflamed site.“ J Med Invest **48**(1-2): 73-80.
- Nakano, Y., Hisaeda, H., Sakai, T., Zhang, M., Maekawa, Y., Zhang, T., Nishitani, M., Ishikawa, H. and Himeno, K.** (2001). „Granule-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by CD8<sup>+</sup> T cells.“ Immunology **104**(3): 289-98.

**Naot, Y., Desmots, G. and Remington, J. S.** (1981). „IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection.“ J Pediatr **98**(1): 32-6.

**Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E. and Strober, W.** (1995). „Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice.“ J Exp Med **182**(5): 1281-90.

**Nicolle, C. and Manceaux, L.** (1908). „Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi.“ C R Acad Sci Paris **147**: 763-6.

**Nicolle, C. and Manceaux, L.** (1909). „Sur un protozoaire nouveau du gondi.“ C R Acad Sci Paris **148**: 369-72.

**Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G. and Fischer, H. G.** (2001). „Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins.“ Microbes Infect **3**(9): 689-99.

**Parmley, S. F., Gross, U., Sucharczuk, A., Windeck, T., Sgarlato, G. D. and Remington, J. S.** (1994). „Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*.“ J Parasitol **80**(2): 293-301.

**Parmley, S. F., Weiss, L. M. and Yang, S.** (1995). „Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen.“ Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 253-7.

**Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C.** (1976). „*Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants.“ Exp Parasitol **39**(3): 365-76.

**Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C.** (1977). „Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil.“ J Protozool **24**(3): 449-53.

**Rabaud, C., May, T., Amiel, C., Katlama, C., Leport, C., Ambroise-Thomas, P. and Canton, P.** (1994). „Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey.“ Medicine (Baltimore) **73**(6): 306-14.

**Reichmann, G., Stachelhaus, S., Meisel, R., Mevelec, M. N., Dubremetz, J. F., Dlugonska, H. and Fischer, H. G.** (1997). „Detection of a novel 40,000 MW excretory *Toxoplasma gondii* antigen by murine Th1 clone which induces toxoplasmacidal activity when exposed to infected macrophages.“ Immunology **92**(2): 284-9.

**Remington, J., McLeod, R. and Desmonts, G.** (1995). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. Philadelphia.

**Remington, J. S., McLeod, R. and Desmonts, G.** (1995). Toxoplasmosis. Philadelphia, Saunders.

**Reyes, L. and Frenkel, J. K.** (1987). „Specific and nonspecific mediation of protective immunity to *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **55**(4): 856-63.

**Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S. and Sibley, L. D.** (2004). „Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype.“ J Immunol **172**(6): 3686-94.

**Romand, S., Wallon, M., Franck, J., Thulliez, P., Peyron, F. and Dumon, H.** (2001). „Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis.“ Obstet Gynecol **97**(2): 296-300.

**Rubocki, R. J., Hansen, T. H. and Lee, D. R.** (1986). „Molecular studies of murine mutant BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> define a deletion of several class I genes including the entire H-2L<sup>d</sup> gene.“ Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9606-10.

**Ruskins, J. and Remington, J. S.** (1968). „Immunity and intracellular infection: resistance to bacteria in mice infected with protozoan.“ Science **160**: 72-74.

**Saavedra, R., de Meuter, F., Decourt, J. L. and Herion, P.** (1991). „Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*.“ J Immunol **147**(6): 1975-82.

**Saavedra, R. and Herion, P.** (1991). „Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity.“ Parasitol Res **77**(5): 379-85.

- Sabin, A. and Feldman, H.** (1948). „Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma).“ Science **108**: 660-63.
- Sacks, D. and Sher, A.** (2002). „Evasion of innate immunity by parasitic protozoa.“ Nat Immunol **3**(11): 1041-7.
- Sanford, K., Earle, W. and Likely, G.** (1948). „The growth *in vitro* of single isolated tissue cells.“ J Natl Cancer Inst **9**: 229.
- Sayles, P. C., Gibson, G. W. and Johnson, L. L.** (2000). „B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **68**(3): 1026-33.
- Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R. and Sher, A.** (2002). „Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells.“ J Immunol **168**(12): 5997-6001.
- Scharton-Kersten, T., Nakajima, H., Yap, G., Sher, A. and Leonard, W. J.** (1998). „Infection of mice lacking the common cytokine receptor gamma-chain (gamma(c)) reveals an unexpected role for CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in early IFN-gamma-dependent resistance to *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **160**(6): 2565-9.
- Scharton-Kersten, T. M., Wynn, T. A., Denkers, E. Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R. T. and Sher, A.** (1996). „In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection.“ J Immunol **157**(9): 4045-54.
- Schlüter, D., Löhler, J., Deckert, M., Hof, H. and Schwendemann, G.** (1991). „Toxoplasma encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterization of toxoplasma antigens, infiltrates and major histocompatibility complex gene products.“ J Neuroimmunol **31**: 185-189.
- Schlüter, D., Kwok, L. Y., Lutjen, S., Soltek, S., Hoffmann, S., Korner, H. and Deckert, M.** (2003). „Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system.“ J Immunol **170**(12): 6172-82.

**Schmitt, K., Däubener, W., Bitter-Suermann, D. and Hadding, U.** (1988). „A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin.“ J Immunol Methods **109**(1): 17-25.

**Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., McComas, W., Familletti, P. C., Gately, M. K. and Gubler, U.** (1992). „Cloning and expression of murine IL-12.“ J Immunol **148**(11): 3433-40.

**Schwab, J. C., Beckers, C. J. and Joiner, K. A.** (1994). „The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve.“ Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 509-13.

**Sharma, S. D., Araujo, F. G. and Remington, J. S.** (1984). „Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **133**(6): 2818-20.

**Sher, A. and Reis e Sousa, C.** (1998). „Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell-derived interleukin-12.“ Eur Cytokine Netw **9**(3 Suppl): 65-8.

**Sher, A., Collazzo, C., Scanga, C., Jankovic, D., Yap, G. and Aliberti, J.** (2003). „Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*.“ Immunol Res **27**(2-3): 521-8.

**Sibley, L. D. and Krahenbuhl, J. L.** (1988). „Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein.“ Eur J Cell Biol **47**(1): 81-7.

**Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C.** (1992). „Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage.“ Nature **359**(6390): 82-5.

**Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F. and Cesbron-Delauw, M. F.** (1995). „Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*.“ J Cell Sci **108**(Pt 4): 1669-77.

**Sibley, L. D., Mordue, D. and Howe, D. K.** (1999). „Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis.“ Immunobiology **201**(2): 210-24.

- Sibley, L. D. and Andrews, N. W.** (2000). „Cell invasion by un-palatable parasites.“ Traffic **1**: 100-106.
- Siegel, J. P. and Remington, J. S.** (1983). „Comparison of methods for quantitating antigen-specific immunoglobulin M antibody with a reverse enzyme-linked immunosorbent assay.“ J Clin Microbiol **18**(1): 63-70.
- Sinai, A. P., Webster, P. and Joiner, K. A.** (1997). „Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction.“ J Cell Sci **110 ( Pt 17)**: 2117-28.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A.** (2001). „The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane.“ J Cell Biol **154**(1): 95-108.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. and Klenk, D.** (1985). „Measurement of proteins using bicinchonionic acid.“ Anal Biochem **150**: 76-85.
- Sousa, C. R., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N. and Sher, A.** (1997). „*In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas.“ J Exp Med **186**(11): 1819-29.
- Splendore, A.** (1908). „Un nuovo protozoa parassita de conigli, incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'omo. Nota preliminare pel.“ Rev Soc Scient Sao Paulo **3**: 109-12.
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D. and Roos, D. S.** (1998). „Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*.“ Mol Biochem Parasitol **92**(2): 325-38.
- 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**(16): 8413-8.

- Suzuki, Y. and Remington, J. S.** (1988). „Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2<sup>+</sup> and Lyt-1<sup>+</sup>, L3T4<sup>+</sup> T cells in mice.“ J Immunol **140**(11): 3943-6.
- Suzuki, Y., Joh, K., Orellana, M. A., Conley, F. K. and Remington, J. S.** (1991). „A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice.“ Immunology **74**(4): 732-9.
- Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L. E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H. and Gufwoli, E.** (2000). „IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **164**(10): 5375-82.
- Teutsch, S. M., Juranek, D. D., Sulzer, A., Dubey, J. P. and Sikes, R. K.** (1979). „Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats.“ N Engl J Med **300**(13): 695-9.
- Torre, D., Casari, S., Speranza, F., Donisi, A., Gregis, G., Poggio, A., Ranieri, S., Orani, A., Angarano, G., Chiodo, F., Fiori, G. and Carosi, G.** (1998). „Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group.“ Antimicrob Agents Chemother **42**(6): 1346-9.
- Torre, D., Zeroli, C., Ferrario, G., Pugliese, A., Speranza, F., Orani, A., Casari, S., Bassi, P., Poggio, A., Carosi, G. P. and Fiori, G. P.** (1999). „Levels of nitric oxide, gamma interferon and interleukin-12 in AIDS patients with toxoplasmic encephalitis.“ Infection **27**(3): 218-20.
- Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., Simpson, R., Holfels, E., Hopkins, J., Mack, D., Mets, M. B., Swisher, C. N., Patel, D., Roizen, N., Stein, L., Stein, M., Withers, S., Mui, E., Egwuagu, C., Remington, J., Dorfman, R. and McLeod, R.** (1996). „Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception.“ Clin Infect Dis **23**(5): 1055-60.
-



**Waldeland, H., Pfefferkorn, E. R. and Frenkel, J. K.** (1983). „Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice.“ J Parasitol **69**(1): 171-5.

**Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M. T., Young, J. D., Ahmed, R. and Clark, W. R.** (1994). „Immune function in mice lacking the perforin gene.“ Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10854-8.

**Walton, B. C., Benchoff, B. M. and Brooks, W. H.** (1966). „Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*.“ Am J Trop Med Hyg **15**(2): 149-52.

**Wilkins, M. F., O’Connell, E. and Te Punga, W. A.** (1988). „Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge.“ NZ Vet. J **36**: 86-9.

**Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B.** (1939). „Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals.“ Science **89**: 226-7.

**Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M. and et al.** (1991). „Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells.“ J Immunol **146**(9): 3074-81.

**Wysocka, M., Kubin, M., Vieira, L. Q., Ozmen, L., Garotta, G., Scott, P. and Trinchieri, G.** (1995). „Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice.“ Eur J Immunol **25**(3): 672-6.

**Yang, S. and Parmley, S. F.** (1995). „A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase.“ Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 291-4.

**Yano, K. and Nakabayashi, T.** (1986). „Attenuation of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* by passages in mice immunized with *Toxoplasma* lysate antigens.“ Biken J **29**(2): 31-7.

**Yap, G., Pesin, M. and Sher, A.** (2000). „Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.“ J Immunol **165**(2): 628-31.

**Yap, G. S., Scharon-Kersten, T., Ferguson, D. J., Howe, D., Suzuki, Y. and Sher, A.** (1998). „Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*.“ Infect Immun **66**(9): 4382-8.

**Yap, G. S., Ortmann, R., Shevach, E. and Sher, A.** (2001). „A heritable defect in IL-12 signaling in B10.Q/J mice. II. Effect on acute resistance to *Toxoplasma gondii* and rescue by IL-18 treatment.“ J Immunol **166**(9): 5720-5.

**Zediak, V. P. and Hunter, C. A.** (2003). „IL-10 fails to inhibit the production of IL-18 in response to inflammatory stimuli.“ Cytokine **21**(2): 84-90.

**Zou, J. J., Schoenhaut, D. S., Carvajal, D. M., Warriar, R. R., Presky, D. H., Gately, M. K. and Gubler, U.** (1995). „Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12.“ J Biol Chem **270**(11): 5864-71.

---

## 7. Abkürzungen

AIDS	aquired immunodeficiency syndrom
Ak	Antikörper
cpm	counts per minute
CT	Computer Tomografie
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESA	exkretorisch/sekretorische Antigene
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
Fig.	Figur
Gln	Glutamin
GRA	dense granules
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe`s modified Dulbecco`s medium
kD	kiloDalton
KO-Mäuse	knock-out Mäuse
LPS	Lipopolysaccharid
M $\phi$	Makrophagen
MHC	major histocompatibility complex
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STAg	soluble Toxoplasma Antigen
TGF	transforming growth factor

TgL	Toxoplasmen Lysat (french press)
Th-Zellen	T Helferzellen
TkM	Toxoplasmen konditioniertes Medium
TNF	Tumornekrosefaktor
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden. Ich bin mir darüber klar, daß der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, daß die Fakultät die Promotion widerruft.

Hamburg, den 03.01.2006

Bartholomäus Schade

## 9. Danksagungen

Herrn **Professor Dr. Ulrich Hadding** danke ich für seine Unterstützung.

Herrn **Professor Dr. Hans-Georg Fischer** danke ich für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die persönliche Betreuung dieser Arbeit sowie für die Hilfestellungen und Ratschläge in zahlreichen anregenden Diskussionen. Insbesondere herzlichen Dank für die Einführung ins wissenschaftliche Denken.

Frau PD Dr. **Gaby Reichmann** danke ich für die Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit und für ihren Einsatz und ihre Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität. Besonders herzlich möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer bedanken, die mich stets mit Rat und Tat unterstützt haben und mit Lachen und guter Laune das Labor zu einem Ort machten an dem man gerne arbeitet: **Ursula Bonifas, Karin Buchholz, Henryka Dlugonska, Katarzyna Dytnerka, Ruth Dörfler, Nicole Nischik, Bernd Nitzgen, Erik Richly** und **Stefan Stachelhaus**.

**Thorsten Buch** danke ich für sein biologisches Expertenwissen und **Ulrike Faber** für ihre Zielstrebigkeit ihre eigene Arbeit zu Ende zu bringen.

**Eva Gwosdz** danke ich für ihr meist vorhandenes Verständnis.

**Meinen Freunden** danke ich für die moralische Unterstützung.

**Meinen Eltern** danke ich für das dezente Vorantreiben.

Ganz besonders danke ich meiner Frau **Yvonne Habermann-Schade** für Alles.

---

# 10. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Einleitung	5
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.1.1 Bedeutung als Infektionserreger und Geschichte	5
2.1.2 Klassifikation	5
2.1.3 Struktur und Lebenszyklus	5
2.1.4 Toxoplasmenisolate und ihre unterschiedliche Virulenz	7
2.2. Klinische Bedeutung	8
2.2.1 Die kongenitale Infektion	8
2.2.2 Die postnatale Infektion	8
2.2.3 Pathologie	9
2.2.4 Diagnostik	10
2.2.5 Therapie	11
2.2.6 Impfung	12
2.3. Die Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	12
2.3.1 Angeborene Immunität	13
2.3.2 Adaptive Immunität	15
2.3.3 Interaktion zwischen Toxoplasmen und Makrophagen	16
2.3.4 Antigenität von <i>Toxoplasma gondii</i>	18
2.4. Die Mäusegenetik vor dem Hintergrund einer <i>T. gondii</i> -Infektion	18
2.4.1 Der 'Major Histocompatibility Complex' der Maus	18
2.4.2 Suszeptibilität/Resistenz von Mäusen gegenüber einer <i>T. gondii</i> -Infektion	19
2.5. Das Zytokin IL-12	19
2.6. Zielsetzung der Arbeit	20
3. Materialien und Methoden	21
3.1. Materialien	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Plastikwaren	22
3.1.3 Chemikalien	23



---

3.1.4 Zellkulturmedien	23
3.2. Methoden	23
3.2.1 Zellpräparationen	23
3.2.1.1 Mäuse	23
3.2.1.2 Peritonealexsudat-Makrophagen	24
3.2.1.3 Neonatale Hirnzellen	24
3.2.2 Zellkulturen	24
3.2.2.1 Fibroblasten	25
3.2.2.2 Toxoplasmen	25
3.2.3 Toxoplasmenproliferationstest	27
3.2.4 Antigenpräparationen	27
3.2.4.1 Herstellung eines Toxoplasmenlysates mittels French Press (TgL)	27
3.2.4.2 Herstellung eines wässrigen Toxoplasmenlysates (STAg)	27
3.2.4.3 Herstellung eines Tachyzoiten-konditionierten Mediums (TkM)	28
3.2.5 Bestimmung des Proteingehaltes	28
3.2.6 Proteinase K-Verdau (Lysate und TkM)	28
3.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	29
3.2.7.1 Coomassie-Färbung	30
3.2.8 Bestimmung des Lipopolysaccharidgehaltes	30
3.2.9 Analyse der Zytokininduktion durch <i>T. gondii</i>	30
3.2.9.1 Makrophagenstimulation <i>in vitro</i>	30
3.2.9.2 Transwell-Kokultur von Toxoplasmen mit Makrophagen	30
3.2.9.3 <i>Ex vivo</i> Analysen nach Infektion von Mäusen mit Toxoplasmen	31
3.2.10 Zytokin-enzyme-linked immunosorbent assays	31
3.2.11 FACS-Analyse	31
3.3. Statistik	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Ein Lysat aus <i>T. gondii</i> induziert in Makrophagen eine Zytokinantwort	33
4.1.1 Eine Inkubation mit lebenden Toxoplasmen oder mit TgL induziert in M $\phi$ die Sekretion von IL-12	33
4.1.2 Das Zytokin IL-1 $\alpha$ wird durch TgL in M $\phi$ induziert	36
4.1.3 Das Zytokin IL-10 wird durch TgL in M $\phi$ induziert	36

---

---

4.2. Die Produktion von IL-12 wird durch ein <i>T. gondii</i> -Protein induziert	36
4.3. Die IL-12-Induktion durch <i>T. gondii</i> beruht auf einer exkretorisch/sekretorischen Aktivität	39
4.3.1 Zur IL-12-Induktion ist keine Infektion der M $\phi$ notwendig	39
4.3.2 Die IL-12-induzierende Aktivität ist Bestandteil von <i>T. gondii</i> -ESA	40
4.3.3 Die IL-12-induzierende Aktivität von <i>T. gondii</i> wird durch ein exkretorisch/sekretorisches Protein vermittelt	41
4.4. Die IL-12-induzierende Aktivität von <i>T. gondii</i> variiert mit dem Genotyp der Wirtszellen und der Virulenz der Parasiten	42
4.4.1 Die IL-12-induzierende Aktivität variiert mit dem Wirtsgenom	42
4.4.1.1. Die IL-12-Induktion korreliert mit der Ausprägung des H-2 Genlocus	42
4.4.1.2. Die IL-12-Induktion ist nicht abhängig von der Infektionsrate oder dem intrazellulären Parasitenwachstum	45
4.4.1.3. Die IL-12-Antwort korreliert nicht mit dem Toxoplasmoseresistenzgen im H-2-L Locus	47
4.4.2 Die IL-12-induzierende Aktivität variiert mit dem Erreger	49
4.4.2.1. Tachyzoiten induzieren in M $\phi$ mehr IL-12 als Bradyzoiten	49
4.4.2.2. Attenuierte Toxoplasmen induzieren in M $\phi$ weniger IL-12 als virulente Parasiten des gleichen Isolates	49
5. Diskussion	52
5.1. TgL – ein immunstimulatorisches Lysat aus <i>T. gondii</i>	52
5.2. Die IL-12-Induktion wird durch ein parasitäres Protein vermittelt	53
5.3. IL-12 wird durch durch ein exkretorisch/sekretorisches Produkt von <i>T. gondii</i> induziert	53
5.4. Die IL-12-Antwort der Makrophagen ist genetisch determiniert und korreliert mit der Virulenz der Toxoplasmen	54
5.4.1 Abhängigkeit vom Wirtsgenom	54
5.4.2 Abhängigkeit von der Virulenz des Parasiten	56
5.4.3 Die ambivalente Rolle von IL-12 bei der Immunabwehr einer <i>T. gondii</i> -Infektion	57
6. Literaturverzeichnis	59
7. Abkürzungen	85
8. Eidesstattliche Erklärung	87
9. Danksagungen	88

---

# Lebenslauf

<b>N</b> ame		Bartholomäus Oskar Schade
<b>G</b> eburtsdatum		2. Mai, 1972
<b>G</b> eburtsort		Myslowice, Polen Auswanderung in die Bundesrepublik Deutschland in 1981
<b>S</b> chulen	1979-1981	Grundschule in Myslowice
	1981-1982	Grundschule in Recklinghausen
	1982-1984	Gymnasium: Theodor-Heus-Gymnasium in Recklinghausen
	1984-1991	Gymnasium: Max-Planck-Gymnasium in Gelsenkirchen
	1991	Allgemeine Hochschulreife mit der Note 1.2
<b>Z</b> ivildienst	Juni 1991 bis September 1992	Pflegedienst im St-Hedwig-Hospital in Gelsenkirchen-Resse, davon 3 Monate auf einer Intensivstation
	November 1991	Ausbildung zum Krankenpflegehelfer
<b>U</b> niversität	Oktober 1992	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
	1994	Physikum
	Frühjahr 1995	Akupunkturkurs an der Open International University in Colombo, Sri Lanka am Institut für Akupunktur, Laser Therapie und Homäeopunktur unter Sir Prof. Dr. Anton Jayasuria
	1995	Erstes Staatsexamen
	Frühjahr 1996	Famulatur auf einer Station für Innere Medizin im St-Hedwig-Hospital in Gelsenkirchen
	April - August 1997	Studium an der Medical School der University of California, Davis, USA: Kurse in Innerer Medizin, Notfallmedizin und Neurologie
	seit Januar 1998	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Virologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über Zytokinantworten von Makrophagen nach einer Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>
	März 1999	Zweites Staatsexamen mit der Note 1.6
	April bis November 1999	Praktisches Jahr am Klinikum Krefeld, Wahlfach: Anästhesie
	November 1999 bis April 2000	Tertial Innere Medizin am Middlemore Hospital in Auckland, Neuseeland
	Juni 2000	Drittes Staatsexamen mit der Note 1

<b>A</b> rbeitserfahrung	1992 bis 1997	Arbeit als Pflegekraft auf der interdisziplinären Intensivstation des St-Hedwig-Hospitals in Gelsenkirchen
	1999	Arbeit als Pflegekraft auf der chirurgischen Intensivstation des Klinikum Krefeld
	Oktober 2000 bis Januar 2002	Arzt im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg
	seit Februar 2002	Arzt in Weiterbildung an der Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg
	Februar 2003	Erlangen der Bereichsbezeichnung „Rettungsmedizin“

## **P**ublikationen

Differential CD86/B7.2 expression and cytokine secretion induced by *Toxoplasma gondii* in macrophages from resistant or susceptible BALB H-2 congenic mice; H.G. Fischer, R. Dörfler, B. Schade, U. Hadding; *Journal of International Immunology*; 1999 Mar;11(3):341-9

T cell response in the *T. gondii*-infected brain: regulation by glial cells and the parasite; Fischer HG, Stachelhaus S, Dlugonska H, Nischik N, Waldrapp A, Schade B, Richly E, Dörfler R, Buchholz K, Reichmann G (SFB Poster)

Attenuation of virulent *Toxoplasma gondii* strain is associated with reduced synthesis of excretory antigens and a decrease in interleukin 12-inducing activity; N. Nischik, B. Schade, K. Dytnerska, H. Dlugonska, J.F. Dubremetz, H.G. Fischer (Vortrag)

Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins; Nischik N, Schade B, Dytnerska K, Dlugonska H, Reichmann G, Fischer HG.; *Microbes Infect.* 2001 Jul;3(9):689-99.

*Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype; B. Schade, H.G. Fischer; *Vet Parasitol.* 2001 Sep 12;100(1-2):63-74

## **C**omputer

Kenntnisse in MacOS, DOS, Windows, Unix, OS/2 und Standardanwendungen

Programmierkenntnisse in Basic, Pascal und C, sowie HTML, PHP, Java, Javascript und SQL

## **S**prachen

Englisch (fließend), Polnisch (fließend), Latein (Latinum)  
Spanisch (Grundlagen), Französisch (Grundlagen)

## **A**ktivitäten

Mai 2003 bis  
September 2004

Segeltörn von Hamburg über Nordsee, Atlantik, Mittelmeer und zurück in einem Folkeboot von 1959

# Zusammenfassung (Abstract)

Diese Arbeit beschreibt Determinanten der Interleukin-12 Antwort muriner Makrophagen auf eine Stimulation durch *Toxoplasma gondii*.

Es wurde eine Präparationsmethode für *T. gondii*-Lysat etabliert. Dieses Lysat induzierte in Makrophagen eine Zytokinantwort. Der Mechanismus, über den *T. gondii* in Makrophagen Interleukin-12 induziert, wurde weiter charakterisiert. Es wurde gezeigt, daß diese Aktivität durch lösliche Proteine vermittelt wird, die von *T. gondii* - auch in Abwesenheit von Makrophagen - sezerniert werden.

Makrophagen aus Mäusen unterschiedlicher Genotypen wurden mit dem Lysat aus *T. gondii* stimuliert. Je nach genetischem Hintergrund reagierten die Makrophagen mit unterschiedlich starker Interleukin-12 Sekretion. Die Unterschiede stehen im Zusammenhang mit Genen des H-2 Komplex auf Chromosom 17.

Darüberhinaus wurde eine Korrelation der Interleukin-12 Induktion mit der Virulenz der Toxoplasmen gezeigt. Erkrankten Mäuse an einer akuten Toxoplasmose, korreliert eine verstärkte Mortalität mit einem erhöhten Interleukin-12 Niveau. Daraus wurde abgeleitet, daß Interleukin-12 ein Pathogenitätsfaktor während der akuten Phase der murinen Toxoplasmose sein kann.

gez. PD Dr. G. Reichmann (Referentin)