

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

**Speziesspezifische humorale Immunantwort
gegen rekombinante Antigene
von *Toxoplasma gondii***

Dissertation

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

vorgelegt von
Johannes Martin Wenning
(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

für meine Mutter Susanne und meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die Taxonomie von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2. Epidemiologische Bedeutung und Übertragungswege von <i>T. gondii</i>	2
1.3. Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	4
1.4. Toxoplasmose des Menschen	7
1.4.1. Klinische Manifestation der postnatalen Toxoplasmose	7
1.4.2. Klinische Manifestation der pränatalen Toxoplasmose	8
1.4.3. Diagnose der Toxoplasmose	9
1.4.4. Therapie der Toxoplasmose	11
1.5. Immunologische Abwehrmechanismen gegen <i>T. gondii</i>	13
1.5.1. Angeborene, unspezifische Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	13
1.5.2. IFN- γ -induzierte antiparasitäre Effektormechanismen gegen <i>T. gondii</i>	14
1.5.3. Bedeutung immundominanter Antigene von <i>T. gondii</i> in der Immunabwehr.....	15
1.6. Sekretorische Organellen von <i>T. gondii</i>	16
1.6.1. Micronemen	16
1.6.2. Rhoptrien.....	17
1.6.3. Dichte Granula	18
1.7. Proteine aus den sekretorischen Organellen von <i>T. gondii</i>	19
1.7.1. GRA-Proteine	19
1.7.2. MIC-Proteine	21
1.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22

2. Material und Methoden	24
2.1. Material	24
2.1.1. Antikörper	24
2.1.2. Bakterienstämme	24
2.1.3. Chemikalien	25
2.1.4. Medien und Puffer	26
2.1.5. Geräte	28
2.1.6. Größenstandards und Kits	28
2.1.7. Verbrauchsmaterialien	29
2.1.8. Seren	29
2.2. Methoden	33
2.2.1. Denaturierende Proteinaufreinigung	33
2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.3. Proteinanalytische Methoden	35
2.2.3.1. Coomassi-Blau-Färbung der Proteine in SDS-Gelen	35
2.2.3.2. Western Blot-Analyse	36
2.2.3.3. Immunchemischer Nachweis von Proteinen	36
2.2.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.2.3.5. TCA-Fällung von Proteinen	38
2.2.4. Computergestützte Auswertung der Western Blot-Filme	39
2.2.4.1. Adobe Photoshop CS	39
2.2.4.2. ImageJ	39
2.2.4.3. GraphPad-Prism	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Expression rekombinanter Proteine von <i>T. gondii</i> in <i>Escherichia coli</i>	41
3.2. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von	
<i>T. gondii</i> in Humanseren	45
3.2.1. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG mit	
rekombinanten <i>T. gondii</i> -Antigenen	45
3.2.2. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit	
rekombinanten <i>T. gondii</i> -Antigenen	49

3.3. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Schweineseren	50
3.3.1. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG mit rekombinanten <i>T. gondii</i> -Antigenen	50
3.3.2. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten <i>T. gondii</i> -Antigenen	52
3.4. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Mausseren	54
3.4.1. IgG-Antikörperreaktionen gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Seren von BALB/c- und BALB/c-IDO- <i>knockout</i> -Mäusen	54
3.4.2. Quantitative Erfassung von <i>T. gondii</i> -spezifischen Antikörpern in Seren von Wildtyp- und IDO ^{-/-} -Mäusen mittels Western Blot-Analysen.....	57
3.4.3. Humorale Immunantwort in Mäusen nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> -Zysten.....	60
3.4.4. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgM in Seren von Mäusen, die mit Tachyzoiten des ME49-Stamms von <i>T. gondii</i> infiziert wurden.....	61
3.4.5. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG in Seren von Mäusen, die mit Tachyzoiten des TS4-Stamms von <i>T. gondii</i> infiziert wurden.....	64
4. Diskussion	66
4.1. Diskussion der Methoden	66
4.1.1. Western Blot-Analysen	66
4.1.2. Die Produktion rekombinanter Proteine von <i>T. gondii</i>	68
4.2. Bedeutung einzelner rekombinanter Antigene zur Serodiagnostik einer Toxoplasmose.....	69
4.2.1. GRA2 und seine Bedeutung in der humoralen Immunantwort von <i>T. gondii</i>	71
4.2.2. GRA7 und seine Bedeutung in der humoralen Immunantwort gegen <i>T. gondii</i>	73

4.2.3. Die Rolle rekombinanter Antigene von <i>T. gondii</i> in der humoralen Immunantwort zur Differenzierung einer akuten und einer chronischen Infektion	74
4.3. Nachweis einer Infektion mit <i>T. gondii</i> in Schweinen.....	78
4.3.1. Die Anwendung rekombinanter Antigene in der Analyse der Antikörperentwicklung in Schweineseren.....	80
4.4. Einfluss unterschiedlicher Maus- und <i>T. gondii</i> -Stämme auf die humorale Immunantwort und den Infektionsverlauf.....	82
4.5. Einfluss der Indolamin 2,3-Dioxygenase auf die humorale Immunantwort in <i>T. gondii</i> -infizierten Mäusen	85
5. Zusammenfassung.....	89
6. Literaturverzeichnis	90
7. Danksagung	107
8. Eidesstattliche Erklärung	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	5
Abb. 3.1:	Darstellung der denaturierten Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine von <i>T. gondii</i> beispielhaft an den Ergebnissen für rGRA1 (A), rGRA2 (B) und rGRA9 (C)	43
Abb. 3.2:	Reaktivität von Anti-His-Antikörpern mit rekombinanten aufgereinigten Fusionsproteinen.....	44
Abb. 3.3:	Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Humanseren	46
Abb. 3.4:	Häufigkeit der Detektion von IgG-Antikörpern gegen rekombinante Proteine von <i>T. gondii</i>	48
Abb. 3.5:	Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten Antigenen von <i>T. gondii</i> in Humanseren	49
Abb. 3.6:	Nachweis der Reaktivität von IgG-Antikörpern mit rekombinanten Proteinen von <i>T. gondii</i> in Schweineseren	51
Abb. 3.7:	Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Schweineseren durch Western Blot-Analysen	52
Abb. 3.8:	Detektion von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM in Schweineseren mittels Western Blot-Analysen.....	53
Abb. 3.9:	Beispielhafte Darstellung der Detektion spezifischer Antikörper der Klasse IgG gegen rekombinante Proteine von <i>T. gondii</i> in Mausseren.....	55

Abb. 3.10:	Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Seren von experimentell mit ME49-Tachyzoiten infizierten Mäusen	56
Abb. 3.11:	Unterschiede der Bandenintensität in Western Blot-Analysen von Wildtyp- und IDO ^{-/-} -Mausseren	57
Abb. 3.12:	Densitometrische Auswertung der IgG-Antikörpernachweise in Seren von BALB/c-IDO ^{-/-} -Mäusen	58
Abb. 3.13:	Quantitativer Vergleich der Antikörperproduktion gegen rekombinante Proteine von <i>T. gondii</i> mittels Densitometrie	59
Abb. 3.14:	Positive Nachweise von IgG-Antikörperreaktionen gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Seren von Mäusen, die mit Zysten infiziert wurden	61
Abb. 3.15:	Nachweise von IgM-Antikörpern gegen rekombinante Antigene von <i>T. gondii</i> in Mausseren	63
Abb. 3.16:	Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Seren von experimentell mit TS4-Tachyzoiten infizierten Mäusen	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 2.2: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Humanseren.....	30
Tabelle 2.3: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Schweineseren.....	31
Tabelle 2.4: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Mausseren	32
Tabelle 2.5: Zusammensetzung der gegossenen SDS-Polyacrylamid-Gele ...	35
Tabelle 3.1: Nachweis von IgM-Antikörpern gegen rekombinante Proteine von <i>T. gondii</i> in Humanseren mit IgM-positivem Vorbefund	50
Tabelle 3.2: Übersicht über die positiven IgM-Antikörpernachweise in Mausseren.....	62
Tabelle 4.1: Vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse aus den durchgeführten Western Blot-Analysen von Human-, Schweine-, und Mausseren	70

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
a. i.	ante infectionem
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AMP	Adenosin-Monophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAG	Brachyzoiten-Antigen
BCIP-T	5-Brom-4-Chloro-3-Idolylphosphat-Dinatriumsalz
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm ²	Quadratzentimeter
DG	<i>dense granules</i> (Dichte Granula)
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	<i>elongation factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESA	<i>excreted-secreted-antigens</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GTP	Guanosin-Triphosphat
GRA	Dichte Granula Antigen
HRPO	<i>horseradisch-peroxidase</i>
H.O.S.T.	<i>Host Organelle-Sequestering Tubulo-structures</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase

IDO ^{-/-}	Indolamin 2,3-Dioxygenase- <i>knockout</i>
IFN	Interferon
IFAT	indirekter Fluoreszenz Antikörper-Test
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IHAT	indirekter Hämagglutinations-Test
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISAGA	<i>Immunosorbent Agglutination Assay</i>
kDA	Kilodalton
l	Liter
LAT	Latex-Agglutinations-Test
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MAG	Matrix-Antigen
MAT	modifizierter Agglutinations-Test
mM	Millimolar
MIC	Micronemen-Protein
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
NTPase	5'-Nukleosidtriphosphat-Hydrolase
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
p. i.	post infectionem
p. o.	per oral

PPlase	Petdidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Membran der Parasitophoren Vakuole
rGRA	rekombinantes Dichte Granula Antigen
rMIC	rekombinantes Micronemen-Protein
ROP	Rhoprien-Protein
RT	Raumtemperatur
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung (als Vielfaches von <i>g</i>)
SAG	<i>Surface antigen</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SFT	Sabin-Feldmann-Test
spp.	species
s. u.	siehe unten
SUB1	Subtilidase 1
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
TgAMA1	<i>Toxoplasma gondii apical membrane antigen 1</i>
TgM2AP	<i>Toxoplasma gondii MIC2-associated protein</i>
TgROM1	<i>Toxoplasma gondii rhomboid 1</i>
TgSPATR	<i>Toxoplasma gondii secretory protein with altered thrombospondin repeat</i>
TgSUB1	<i>Toxoplasma gondii subtilidase 1</i>
TgTLN4	<i>Toxoplasma gondii termed toxolysin 4</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü. N.	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Die Taxonomie von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist der Erreger der Toxoplasmose. Der Parasit wurde erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux beschrieben und konnte zunächst aus dem Gewebe des afrikanischen Nagetieres *Ctenodactylus gundi* isoliert werden (Nicolle und Manceaux 1908). Die bogenförmige Morphologie des Parasiten (griechisch: *toxos* = Bogen; *plasma* = Form) führte schließlich zu der Nomenklatur *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*).

T. gondii zählt als einzelliger Eukaryot zu dem Stamm der Apicomplexa und dort zu der Unterordnung der zystenbildenden Coccidien (Beck, Blake *et al.* 2009). Der Stamm der Apikomplexa umfasst eine Gruppe von über 4000 meist obligat intrazellulären Parasiten (Marechal und Cesbron-Delauw 2001).

Neben *T. gondii* zählen noch insbesondere *Cryptosporidium* spp. (Erreger der Kryptosporidiose, einer chronischen Diarrhoe bei Immunsuppression) und *Plasmodium* spp. (*Pl. vivax*, *ovale*; *Pl. malariae*; *Pl. falciparum*: Erreger der Malaria) zu den humanpathogenen Coccidien. *Neospora caninum*, besonders für Aborte bei Rindern verantwortlich, zählt zu den bevorzugt veterinärmedizinisch relevanten Vertretern der Coccidien.

Allen Parasiten des Stamms der Apikomplexa ist der am anterioren Pol gelegene namengebender Apikalkomplex gemeinsam. Der Apikalkomplex setzt sich aus sekretorischen Organellen (Micronemen und Rhoptrien) und zytoskelettalen Strukturen (Conoid, Polring) zusammen. Im invasiven Stadium von *T. gondii*, den Zoitzen, dienen die apikal lokalisierten Strukturen und Organellen der Erkennung und Invasion der Wirtszelle (Dubey, Lindsay *et al.* 1998).

Neben den Micronemen und Rhoptrien sind die Dichten Granula als sekretorische Organellen hervorzuheben. Anders als Micronemen und Rhoptrien befinden sich die Dichten Granula ohne spezifische Lokalisation im Zytoplasma von *T. gondii* und sind an der Bildung der Parasitophoren Vakuole (PV) beteiligt, in der sich der Parasit vermehrt (Carruthers 1999).

Die Parasiten aus dem Stamm der Apikomplexa zeichnen sich weiterhin durch einen Lebenszyklus aus, der durch ungeschlechtliche und geschlechtliche Vermehrung gekennzeichnet ist (Marechal und Cesbron-Delauw 2001).

Dieser Lebenszyklus von *T. gondii* konnte 1970 erstmals vollständig aufgeklärt werden (Frenkel, Dubey *et al.* 1970).

1.2. Epidemiologische Bedeutung und Übertragungswege von *T. gondii*

Das Wirtsspektrum von *T. gondii* ist sehr breit. Der Parasit ist in der Lage, alle kernhaltigen Zellen von Warmblütern, also von Säugetieren (auch dem Menschen) und Vögeln zu infizieren (Tenter, Heckeroth *et al.* 2000). Daher zählt die Infektion mit *T. gondii* zu den sicherlich häufigsten parasitären Infektionen weltweit (Gross 2004). Seroprävalenzen in der Bevölkerung schwanken zwischen 10 – 30 % in Nordamerika, Nordeuropa, Südostasien und 30 – 50 % in Zentral- und Südeuropa (Robert-Gangneux und Darde 2012).

Die NHANES 2009 - 2010 Studie zeigt in den USA eine Seroprävalenz von 13,2 % (Jones, Kruszon-Moran *et al.* 2014).

Lateinamerika und afrikanische Länder in Tropennähe haben hohe Seroprävalenzen (Robert-Gangneux und Darde 2012). In Brasilien z. B. beträgt die Seroprävalenz bei Frauen im gebärfähigen Alter bis zu 71,5 % (Rey und Ramalho 1999).

In Deutschland wird die durchschnittliche Durchseuchung der Bevölkerung mit 45 – 72 % angegeben (Robert Koch-Institut, 2007).

Für den Menschen stellt der Verzehr von zystenhaltigen Nahrungsmitteln eine der wichtigsten Infektionsquellen mit *T. gondii* dar. Die Aufnahme von Zysten durch den Menschen erfolgt durch Fleischprodukte, die nur unzureichend erhitzt oder roh verzehrt werden. Die Ernährungsgewohnheiten spiegeln sich daher in der Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit *T. gondii* wider und zeigen erhebliche geographische Unterschiede in Mitteleuropa (Gross 2004). Cook *et al.* zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie anhand schwangerer Frauen mit einer serologisch nachgewiesenen akuten Toxoplasmose, dass etwa 30 – 63 %

der Infektionen mit *T. gondii* auf den Verzehr von rohem oder unzureichend erhitzten Fleischprodukten zurückzuführen sind (Cook, Gilbert *et al.* 2000).

T. gondii kann in Form von Gewebszysten in der Muskulatur von Futtertieren jahrelang überleben (Hill und Dubey 2002).

Eine Erhitzung auf 67 °C führt zu einem sicheren Abtöten der Gewebszysten in Schweinefleisch (Dubey, Kotula *et al.* 1990). Generell sollte das Fleisch jeden Tieres daher vor dem Verzehr auf mindestens 67 °C erhitzt werden (Dubey 2004).

Gefrorenes Fleisch scheidet andererseits als Infektionsquelle nicht aus. Es konnte allerdings durch Gefrieren von Mäuseproben gezeigt werden, dass nach einer Lagerung bei -7 °C bis -12 °C für vier Tage keine vitalen Gewebszysten mehr nachweisbar waren (Kuticic und Wikerhauser 1996).

Neben den Gewebszysten stellen auch Oozysten für den Menschen eine mögliche Infektionsquelle mit *T. gondii* dar. Katzen und andere Felidea scheiden als Endwirte nach einer Primärinfektion Oozysten mit dem Kot aus. Die Oozysten reifen innerhalb von 1 - 5 Tagen nach der Ausscheidung zu infektiösen Sporozoiten aus (Sporogonie). Erst der Kontakt zu älterem Katzenkot, z. B. bei der Gartenarbeit, mit den dann sporulierten Oozysten kann zu einer Infektion führen. Hauskatzen spielen in der Übertragung des Parasiten eine Rolle, da weltweit etwa 30 – 40 % der Hauskatzen mit *T. gondii* infiziert sind (Dubey und Beattie 1988). Auf der anderen Seite konnte der direkte Kontakt zu Katzen nicht als eigenständiger Risikofaktor für eine Infektion mit *T. gondii* herausgearbeitet werden, da Katzen die Oozysten nach einer Primärinfektion nur etwa zwei Wochen lang ausscheiden (Cook, Gilbert *et al.* 2000). Die weite Verbreitung von Oozysten und deren große Widerstandsfähigkeit in der Umwelt unter feuchten Bedingungen zeigen, dass für eine Infektion mit *T. gondii* ein direkter Kontakt des Menschen zu Katzen nicht zwingend Voraussetzung ist, da auch indirekte Infektionswege bestehen (Torrey und Yolken 2013). Der Kontakt mit Erdboden (z. B. bei der Gartenarbeit ohne Handschuhe) konnte in einer Fall-Kontroll-Studie von Cook *et al.* als indirekter Infektionsweg nachgewiesen werden (Cook, Gilbert *et al.* 2000).

Auch das Trinken von mit Oozysten kontaminierten Trinkwassers kann zu einer Infektion mit *T. gondii* führen. So erkrankten 1995 in Kanada z. B. 100 Menschen nach Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser an einer akuten Toxoplasmose (Bowie, King *et al.* 1997).

1.3. Lebenszyklus von *T. gondii*

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit. Im Verlauf seines Lebenszyklus kommt *T. gondii* in drei verschiedenen infektiösen Stadien vor: Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten (in Oozysten). Alle drei genannten Stadien können sowohl in Endwirten als auch Zwischenwirten eine Infektion auslösen. Katzen und andere Felidea sind Endwirte von *T. gondii*, während Menschen und alle anderen Warmblüter Zwischenwirte sind (Frenkel, Dubey *et al.* 1970). Im Entwicklungszyklus unterscheidet man die geschlechtliche Vermehrung, die nur im Endwirt stattfindet, von der ungeschlechtlichen Vermehrung, die auch im Zwischenwirt stattfindet (Abbildung 1.1).

Im Rahmen einer akuten Infektion des Zwischenwirtes mit *T. gondii* differenziert sich der Parasit in den Enterozyten zu Tachyzoiten. Er teilt sich in je zwei Tochterzellen, die ihrerseits eine hohe Replikationsrate zeigen. Der Begriff Tachyzoit beschreibt also die Eigenschaft seiner hohen Teilungsrate (griech.: *tachýs* = schnell). Die asexuelle Fortpflanzung mit Bildung von zwei Tochterzellen innerhalb der Ursprungszelle wird als Endodyogenie bezeichnet und findet innerhalb der Parasitophoren Vakuole statt. Wenn die Wirtszelle rupturiert, werden die Tachyzoiten frei und können weitere Wirtszellen infizieren. Die Infektion von Wirtszellen erfolgt durch aktive Penetration des Parasiten durch die Wirtszellmembran. An der aktiven Invasion in die Wirtszelle sind nur Aktinfilamente des Parasiten beteiligt, jedoch nicht die Wirtszelle selbst (Morisaki, Heuser *et al.* 1995; Dobrowolski und Sibley 1996). Tachyzoiten können im Rahmen einer Primärinfektion von schwangeren Frauen für eine vertikale, also diaplazentare Übertragung auf den Feten verantwortlich sein.

Im Zuge des Einsetzens der Immunantwort kommt es zur Differenzierung der Tachyzoiten in die sich langsam teilenden Bradyzoiten, die sich in Zysten

organisieren. Mehrere hundert der halbmondförmigen Bradyzoiten können sich in einer Zyste befinden (Dubey, Lindsay *et al.* 1998). Die Zysten sind von einer Zystenhülle umgeben, die sich aus der Parasitophoren Vakuole entwickelt (Ferguson und Hutchison 1987; Dubey, Lindsay *et al.* 1998). Die in Zysten organisierten Bradyzoiten können so über Jahre, teilweise lebenslang im Gewebe des Zwischenwirts ohne klinische Manifestation persistieren.

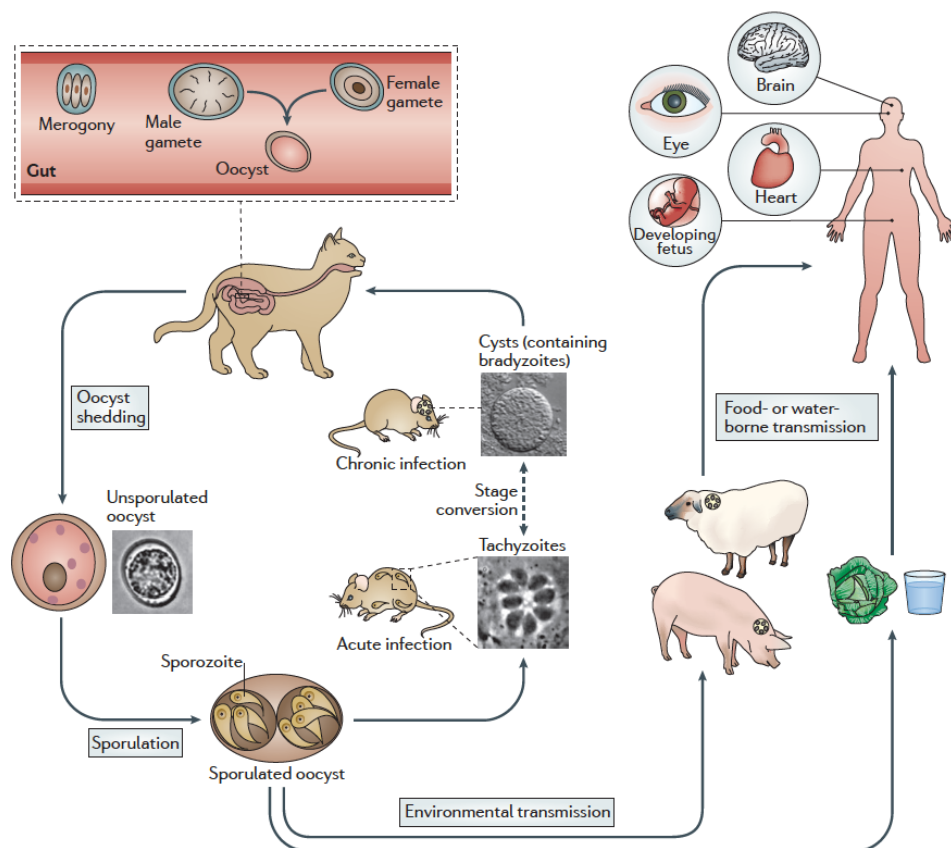


Abb. 1.1: Lebenszyklus von *T. gondii*. Aus: (Hunter und Sibley 2012). Der Lebenszyklus von *T. gondii* wird in eine geschlechtliche und eine ungeschlechtliche Phase unterteilt. Die geschlechtliche Vermehrung findet nur im Endwirt (Katze) statt. Die ungeschlechtliche Vermehrung umfasst die Sporogonie (Reifung der Oozysten, außerhalb des Wirtes) und die Merogonie (Vermehrung der sich schnell teilenden Tachyzoiten, extraintestinal im End- und Zwischenwirt). Im Zwischenwirt erfolgt bedingt durch die einsetzende Immunantwort eine Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten, die schlussendlich zu einer Ausbildung von persistierenden Zysten führt.

Bei Aufnahme von zystenhaltigem Gewebe durch einen weiteren Zwischenwirt werden in dessen Magen-Darmtrakt Bradyzoiten aus den Zysten freigesetzt. Die Bradyzoiten infizieren das Dünndarmepithel, wo dann eine Differenzierung

zu Tachyzoiten erfolgt (Pettersen 1979). Es schließt sich erneut eine akute Infektion des Zwischenwirtes mit Parasitämie und mit ungeschlechtlicher Vermehrung des Parasiten an, die in einer chronischen Infektion mit Stadienkonversion in Bradyzoiten und der Bildung von Gewebszysten endet. Eine Parasitämie mit Tachyzoiten, die die extraintestinalen Organe infiltrieren, konnte im Mausmodell frühestens 24 Stunden nach der Infektion mit Gewebszysten beobachtet werden (Dubey 1998).

Werden hingegen bradyzoitenhaltige Zysten durch den Endwirt (Katze) mit der Nahrung aufgenommen, werden die Bradyzoiten zunächst wieder aus den Zysten durch proteolytische Enzyme in Magen und Dünndarm freigesetzt und penetrieren das Dünndarmepithel. Hier findet während der Erstinfektion des Endwirtes eine geschlechtliche Vermehrung des Parasiten statt (Gamogonie), die nur im Dünndarmepithel des Endwirtes möglich ist (Dubey, Lindsay *et al.* 1998). Der sexuellen Vermehrung des Parasiten gehen also mehrere asexuelle Vermehrungszyklen mit der Bildung von fünf morphologisch verschiedenen Formen von *T. gondii* voraus (Dubey und Frenkel 1972). Die sexuelle Vermehrung beginnt zwei Tage nach der Inokulation der Gewebszysten durch die Katze (Dubey, Lindsay *et al.* 1998). Die differenzierten Formen der sexuellen Vermehrung sind die Mikro- und Makrogametozyten, die sich als diploide Oozyste organisieren. In jeder der Oozysten entwickeln sich zwei Sporozysten; in jeder Sporozyste wiederum vier Sporozoiten (Frenkel, Dubey *et al.* 1970; Dubey, Lindsay *et al.* 1998). Die noch unsporulierten Oozysten werden mit den Faeces ausgeschieden und werden erst extrakorporal durch Sporulation infektiös (Frenkel, Dubey *et al.* 1970). Eine Ausscheidung von unsporulierten Oozysten durch die Katze erfolgt in den ersten zwei Wochen nach der Primärinfektion. Die zeitliche Latenz, ab der Felidae Oozysten mit der Faeces ausscheiden, ist abhängig von der aufgenommenen infektiösen Form von *T. gondii*: Nach Aufnahme von Zysten erfolgt die Ausscheidung von Oozysten nach 3 – 10 Tagen, ≥ 13 Tage nach Aufnahme von Tachyzoiten und ≥ 18 Tage nach Inokulation von Oozysten (Dubey 1998).

Die in der ausgereiften, sporulierten Oozyste enthaltenen Sporozoiten können nach oraler Aufnahme einen neuen Wirt infizieren. Mit der Differenzierung zu Tachyzoiten beginnt dann ein neuer Infektionszyklus.

1.4. Toxoplasmose des Menschen

Für den Menschen stellen zystenhaltige Fleischprodukte und sporulierte Oozysten aus der Umwelt eine wesentliche Infektionsquelle dar. Bradyzoitenhaltige Gewebszysten finden sich häufiger in der Muskulatur von Schweinen, Schafen, Ziegen und seltener in Rindern (Tenter, Heckeroth *et al.* 2000).

Tachyzoiten spielen bei der diaplazentaren Übertragung auf den Feten eine Rolle. Abhängig vom Zeitpunkt der Infektion mit *T. gondii* unterscheidet man die postnatale von der pränatalen Toxoplasmose.

1.4.1. Klinische Manifestation der postnatalen Toxoplasmose

Eine Primärinfektion mit *T. gondii* verläuft bei immunkompetenten Menschen in der Regel asymptomatisch. Es kann jedoch vereinzelt zu unspezifischen Symptomen kommen: z. B. zervikale und okzipitale Lymphknotenschwellung, Fieber, Kopfschmerzen oder Myalgien. Diese Symptome sind selbstlimitierend und bedürfen in der Regel keiner medikamentösen Therapie.

Durch die zelluläre Immunantwort des Wirtes wird die weitere Vermehrung der Tachyzoiten gehemmt. In der chronischen Phase der Infektion kommt es schließlich zu der Ausbildung von bradyzoitenhaltigen Gewebszysten. Zysten entstehen vornehmlich in Nervengewebe (ZNS), Muskelgewebe, aber auch in der Retina (Tenter, Heckeroth *et al.* 2000). Seltener Lokalisationen sind viszerale Organe wie Lunge, Leber und Nieren (Dubey, Lindsay *et al.* 1998).

Infolge einer Suppression des Immunsystems z. B. im Rahmen von AIDS kann es zu einer Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose kommen. Es können bei der Reaktivierungstoxoplasmose alle Organe betroffen sein. Dabei

ist die Toxoplasmen-Enzephalitis eine der häufigsten ZNS-assoziierten Erkrankung bei AIDS-Patienten (Luft, Conley *et al.* 1983; Luft und Remington 1992). Das Erkrankungsbild der Toxoplasmen-Enzephalitis kann sich mit fokalen Ausfällen (fokale Epilepsie, Hemiparesen, Sensibilitätsverlust, zerebellärer Tremor, homonyme Hemianopsie) aber auch mit generalisierten Ausfällen (Schwäche, Myoklonus, Desorientierung, Lethargie, Koma) manifestieren (Luft und Remington 1988). Unbehandelt hat die Toxoplasmen-Enzephalitis eine infauste Prognose (Luft und Remington 1992).

Eine Toxoplasmose nach Organtransplantation kann, bedingt durch die immunsuppressive Therapie, Folge der Reaktivierung einer bestehenden chronischen Infektion des Organempfängers sein. Andererseits kann sie durch eine Toxoplasmenreaktivierung aus dem Transplantat entstehen. Eine Infektion mit *T. gondii* konnte z. B. in Einzelfällen nach Transplantationen von Nieren beschrieben werden (Aubert, Foudrinier *et al.* 1996; Wulf, van Crevel *et al.* 2005). In einem der Fallberichte wird eine Toxoplasmenreaktivierung aus dem Transplantat eines seropositiven Donors beschrieben (Aubert, Foudrinier *et al.* 1996). Der bisher seronegative Organempfänger entwickelte 15 Tage nach der Transplantation grippeähnliche Symptome, die gegenüber Antibiotika und Virostatika refraktär waren. Der Nachweis von *T. gondii*-DNA mittels PCR, sowie der Nachweis spezifischer Antikörper der Klasse IgG im Serum des Organempfängers 30 Tage nach der Transplantation führten schließlich zur Diagnose einer Toxoplasmose (Aubert, Foudrinier *et al.* 1996).

1.4.2. Klinische Manifestation der pränatalen Toxoplasmose

Die pränatale Toxoplasmose ist Folge der Erstinfektion einer schwangeren Frau mit *T. gondii* und führt in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt während der Schwangerschaft zu einer unterschiedlich schweren Schädigung des Feten. Die Wahrscheinlichkeit der diaplazentaren Übertragung des Parasiten bei mütterlicher Erstinfektion steigt bis zum dritten Trimenon auf 72 % an, während der Schweregrad der Schädigung des Feten im Verlauf der Schwangerschaft abnimmt (Dunn, Wallon *et al.* 1999). Die schwangere Frau zeigt in der Regel

keine Symptome. Eine Infektion im ersten und zweiten Trimenon führt zur schwersten Form der Schädigung und kann einen intrauterinen Fruchttod oder einen Spontanabort auslösen (Montoya und Liesenfeld 2004). Die klassische Trias der konnatalen Toxoplasmose mit intrazerebralen Kalzifikationen, Chorioretinitis und Hydrozephalus tritt nur bei bis zu 10 % der infizierten und symptomatischen Neugeborenen auf (Tenter, Heckeroth *et al.* 2000). Neugeborene können sich zwar ohne klinische Symptome nach einer kongenitalen Infektion mit *T. gondii* präsentieren, werden später aber häufig unter neurologischen und vor allem unter retinalen Folgeschäden leiden (Wilson, Remington *et al.* 1980).

1.4.3. Diagnose der Toxoplasmose

Eine Infektion mit *T. gondii* kann über indirekte und direkte Nachweisverfahren festgestellt werden.

Zu den indirekten diagnostischen Verfahren zählt der Nachweis von parasitenspezifischen Antikörpern der Klasse IgG oder IgM (Antikörpersuchtest).

IgM-Antikörper können bereits eine Woche nach der Infektion nachgewiesen werden und sind Indikator für eine akute Infektion. Als Nachweisverfahren können der IgM-*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA-IgM) und der *IgM-Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA-IgM) in der Routinediagnostik herangezogen werden (Desmonts, Naot *et al.* 1981). Ein positiver IgM-Antikörperbefund bei schwangeren Frauen ist Hinweis auf eine aktive Infektion oder eine abgelaufene Infektion mit persistierenden IgM-Antikörpern und bedarf einer weiteren serologischer Abklärung (IgG-Aviditäts-Test, IgA-Antikörperbestimmung und Immunoblot) und serologischen Verlaufskontrollen (Robert Koch-Institut, 2007). IgG-Aviditäts-Tests differenzieren zwischen einer kurz oder länger zurückliegenden Infektion. Eine länger zurückliegende Infektion geht mit einer hohen IgG-Avidität einher (Hedman, Lappalainen *et al.* 1989).

Können nur IgG-Antikörper und keine IgM-Antikörper nachgewiesen werden, schließt dieser Befund eine akute Infektion aus und ist ein Indikator für eine chronische bzw. latente Infektion. Während der Erstinfektion erreichen die *T. gondii*-spezifischen IgG-Antikörper nach etwa vier Monaten ihre höchste Konzentration. Als Goldstandard zur IgG-Antikörper-Diagnostik hatte sich zunächst der Sabin-Feldmann-Test bewährt, der 1948 von Sabin und Feldmann entwickelt wurde. Dabei werden die unter dem Einfluss von Antikörpern und Komplement abgetöteten Tachyzoiten mit Methylblau angefärbt (engl.: *dye-test*). Der Nachweis spezifischer IgG1- und IgG3-Antikörper (Gross, Holpert *et al.* 2004) im Sabin-Feldmann-Test hat eine hohe Spezifität und Sensitivität. Für diese Analyse werden jedoch lebende Toxoplasmen benötigt, was zu einer erhöhten Infektionsgefahr im Labor führt. Daher wird der Sabin-Feldmann-Test in der Routinediagnostik heutzutage durch den Immunfluoreszenztest (IFT) ersetzt.

Der serologische Beweis einer pränatalen Toxoplasmose bei Neugeborenen erfolgt durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM und IgA im Serum des Kindes. Eine Studie konnte 1990 zeigen, dass der Nachweis von IgA-Antikörpern bei pränataler Toxoplasmose mittels ELISA eine höhere Sensitivität hatte, als der Nachweis von IgM-Antikörpern mit derselben Methode (Stepick-Biek, Thulliez *et al.* 1990). Bei negativem IgM- und IgA-Suchtest, aber positivem IgG-Antikörpertiter kommt den Western Blot-Analysen eine besondere Bedeutung zu. In dieser Konstellation kann ein vergleichender Nachweis der Spezifität von IgM- und IgG-Antikörpern für verschiedene Toxoplasmenproteine parallel aus mütterlichem Blut und kindlichem Blut durchgeführt werden (Pinon, Dumon *et al.* 2001). Häufig kann die Diagnose einer angeborenen Toxoplasmose erst durch mehrere Titerkontrollen im ersten Lebensjahr festgestellt werden. Dabei sprechen für eine pränatale Infektion die Persistenz von *T. gondii*-spezifischen IgG-Antikörpern im Serum des Neugeborenen oder die Konzentrationserhöhung im postnatalen Verlauf (Robert Koch-Institut, 2007).

Zu den direkten Nachweisverfahren der Toxoplasmose gehört die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR kann bei nicht eindeutigen Befunden der

indirekten Nachweisverfahren zusätzlich durchgeführt werden. Der Nachweis von Toxoplasmen-DNA mittels PCR erfolgt aus dem Blut und anderen betroffenen Körperflüssigkeiten (z. B. Liquor). Die PCR dient als vergleichsweise wenig invasives Verfahren zur Diagnostik der pränatalen Toxoplasmose aus z. B. Fruchtwasser (Montoya 2002). Die PCR aus Biopsiematerial eignet sich auch bei immunsupprimierten Patienten, bei denen trotz klinisch manifester Infektion kein eindeutiger Antikörpernachweis möglich ist.

1.4.4. Therapie der Toxoplasmose

Eine akute Infektion mit *T. gondii* bei immunkompetenten Patienten mit asymptomatischem Verlauf oder geringen, nicht persistierenden klinischen Symptomen bedarf in der Regel keiner medikamentösen Therapie.

Eine akute Primärinfektion schwangerer Frauen sollte medikamentös behandelt werden, um eine diaplazentare Transmission des Parasiten und damit eine Infektion des Feten zu verhindern.

Eine medikamentöse Therapie erfolgt entweder als Kombinationstherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin oder als Monotherapie mit Spiramycin. Die Kombinationstherapie unterbindet die Vermehrung von *T. gondii* in dem sich schnell teilenden Tachyzoitenstadium. Pyrimethamin ist ein Dihydrofolatreduktase-Hemmer. Sulfadiazin wirkt synergistisch zu Pyrimethamin durch Hemmung der Dihydropteroat-Synthetase. Beide Medikamente greifen somit in den Folsäurestoffwechsel des Menschen ein. Aufgrund einer möglicherweise drohenden Myelosuppression mit Neutropenie durch Hemmung der Folsäuresynthese sollte eine prophylaktische orale Gabe von Folsäure (Leucovorin) erfolgen.

Spiramycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide und hemmt durch Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheit die Proteinbiosynthese des intrazellulären Parasiten. Spiramycin verhindert somit die Transmission von *T. gondii* auf den Feten. Spiramycin ist nur gering plazentargängig, sodass eine

bereits erfolgte Infektion des Feten nicht effektiv therapiert werden kann (Couvreur, Desmonts *et al.* 1988).

Bis zur 16. Schwangerschaftswoche ist die Therapie mit Spiramycin, erst ab der 16. Schwangerschaftswoche mit Pyrimethamin und Sulfadiazin durchzuführen. Der Grund liegt in der Teratogenität der Kombinationstherapie. Die länderspezifischen Empfehlungen dazu sind sehr unterschiedlich. Bisher fehlen jedoch gute Evidenzen für die Wirksamkeit der länderspezifischen Therapievorgaben bei Schwangeren.

Wurde durch eine PCR des Fruchtwassers oder sonographisch eine bereits erfolgte Infektion nachgewiesen, wird Pyrimethamin und Sulfadiazin bis zum Zeitpunkt der Geburt gegeben. Die Effektivität dieses Therapieschemas wurde anhand von 685 Schwangeren untersucht (Hotop, Hlobil *et al.* 2012) und wird vom Robert Koch-Institut als vier-wöchentlicher Therapiezyklus mit therapiefreien Intervallen bzw. Spiramycin Monotherapie bis zur Geburt empfohlen (Robert Koch-Institut, 2007).

Ein früher Beginn der medikamentösen Therapie reduziert das Risiko retinaler und neurologischer Folgeschäden bei kongenital erworbener Toxoplasmose (Kieffer, Wallon *et al.* 2008; Cortina-Borja, Tan *et al.* 2010).

Pyrimethamin und Sulfadiazin werden auch in der Therapie der okulären Toxoplasmose eingesetzt. Die okuläre Toxoplasmose ist Folge der kongenitalen oder der postnatalen Toxoplasmose, ausgelöst durch akute Infektion oder Reaktivierung (Montoya 2002). Das akute Erkrankungsbild zeigt sich klinisch durch eine nekrotisierende Retinochorioiditis, die beim immunkompetenten Patienten nach etwa zwei bis vier Monaten abheilt und hyperpigmentierte retinale Narben zurücklässt (Schlüter, Däubener *et al.* 2014).

Monotherapien haben auch in der Behandlung der Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten keine Bedeutung (Montoya und Liesenfeld 2004). Die Kombination Pyrimethamin und Sulfadiazin wird erfolgreich bei der Toxoplasmen-Enzephalitis bei z. B. AIDS-Patienten eingesetzt. Fällt die Zahl der CD4⁺-T-Zellen bei *T. gondii* seropositiven Patienten unter 200/μl, sollte eine medikamentöse Behandlung erfolgen, um eine Reaktivierung der Toxoplasmose zu verhindern. Bei Unverträglichkeit von Sulfadiazin kann

stattdessen Clindamycin verwendet werden (Dannemann, McCutchan *et al.* 1992). Steigt durch eine antiretrovirale Therapie die Zahl der CD4⁺-T-Zellen wieder über 200/μl, kann die antiparasitäre Chemoprophylaxe unterbrochen werden.

1.5. Immunologische Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*

1.5.1. Angeborene, unspezifische Immunabwehr gegen *T. gondii*

Nach einer oralen Infektion mit *T. gondii* erfolgt die Penetration des Parasiten in das Epithel des Dünndarms. Zunächst stellt die angeborene Immunabwehr die erste lokale Kontrolle der weiteren Vermehrung des Parasiten dar. An dieser Kontrolle sind vor allem phagozytierende Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen beteiligt. Nach einem Kontakt dieser Zellen mit dem Parasiten kommt es zu einer Ausschüttung von Interleukin-12 (IL-12). Die Infektion mit *T. gondii* führt durch Stimulation des Zytokinrezeptors CCR5 auf den dendritischen Zellen zu einer Initiierung der IL-12-Produktion. Es konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass diese Stimulation durch Cyclophilin-18 erfolgt (Aliberti, Valenzuela *et al.* 2003). Ein weiteres wichtiges Signal, das die Produktion von IL-12 in Mäusen induziert, ist der Kontakt von *T. gondii* mit Toll-ähnlichen-Rezeptoren (TLR) auf der Oberfläche dendritischer Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen das Adaptorprotein MyD88 der TLR fehlte, kein IL-12 produzieren können (Scanga, Aliberti *et al.* 2002).

IL-12 nimmt in der Signalkaskade eine zentrale Stellung ein. IL-12 ist das Zytokin, das hauptsächlich die Interferon-gamma (IFN-γ)-Produktion durch natürliche Killer-Zellen (NK) und T-Lymphozyten (T-Zellen) induziert (Denkers, Gazzinelli *et al.* 1993; Hunter, Subauste *et al.* 1994). Sowohl CD8⁺-, als auch CD4⁺-T-Zellen sind an der IFN-γ-Produktion beteiligt (Gazzinelli, Hakim *et al.* 1991). Das durch IL-12 induzierte IFN-γ ist während der akuten und der chronischen Infektion an der Immunabwehr gegen *T. gondii* beteiligt und induziert antiparasitäre Effektormechanismen.

1.5.2. IFN- γ -induzierte antiparasitäre Effektormechanismen gegen *T. gondii*

IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone. IFN- γ wird außer von den NK-Zellen, den CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen auch von NKT-Zellen, B-Zellen und professionell antigenpräsentierenden Zellen (z. B. auch den Monozyten) produziert (Carnaud, Lee *et al.* 1999; Harris, Haynes *et al.* 2000; Frucht, Fukao *et al.* 2001). Die Wirkung von IFN- γ wird über den IFN- γ -Rezeptor vermittelt. In experimentell mit *T. gondii* infizierten Mäusen, denen der IFN- γ -Rezeptor durch gezielten *knockout* fehlte, konnte gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe eine reduzierte Immunabwehr gegen den Parasiten nachgewiesen werden (Deckert-Schlüter, Rang *et al.* 1996). IFN- γ ist zentraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, indem es verschiedene Körperzellen aktiviert. Die IFN- γ -induzierte Aktivierung der Makrophagen führt im murinen System durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), das einen antiparasitären Effekt aufweist (Stuehr und Nathan 1989). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass zytotoxische Stickstoffoxide zu einer Proliferationshemmung von *T. gondii* führen (Adams, Hibbs *et al.* 1990). In der frühen Phase der Infektion konnte in iNOS-*knockout* Mäusen ein weiterer IFN- γ -abhängiger, aber iNOS-unabhängiger, antiparasitärer Mechanismus gezeigt werden (Scharton-Kersten, Yap *et al.* 1997), der den IFN- γ -induzierbaren GTPasen zugeordnet werden konnte (Taylor, Feng *et al.* 2004; Taylor, Feng *et al.* 2007).

IFN- γ spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Enzymen, insbesondere der Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). Die IDO wurde erstmals 1975 beschrieben (Hayaishi, Hirata *et al.* 1975). Das Enzym ist IFN- γ -stimuliert in fast allen humanen Zellen nachweisbar und katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin (Taylor und Feng 1991). Durch weitere Zytokine wie IL-1 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) wird die katalytische Wirkung verstärkt (Heseler, Spekker *et al.* 2008). 1984 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass IFN- γ die Vermehrung von *T. gondii* in Fibroblasten durch den Abbau von Tryptophan hemmt (Pfefferkorn 1984). Dieser durch die IDO-vermittelte antiparasitäre Effekt konnte auch in anderen

humanen Zellen nachgewiesen werden (Däubener, Pilz *et al.* 1993; Däubener, Posdziech *et al.* 1999; Däubener, Spors *et al.* 2001). Neben den beschriebenen antiparasitären Effekten vermittelt die IDO auch Abwehrmechanismen gegen Bakterien und Viren und besitzt darüber hinaus immunregulatorische Eigenschaften, wie z. B. die Entwicklung einer T-Zell-Toleranz gegenüber Tumorzellen (Logan, Smyth *et al.* 2002; Yoshida, Ino *et al.* 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IFN- γ durch die Induktion antiparasitärer Mechanismen eine zentrale Rolle in der zellulären Immunabwehr gegen *T. gondii* spielt. Insbesondere deswegen, weil sich *T. gondii* als obligat intrazellulärer Parasit der humoralen Immunantwort entziehen kann.

1.5.3. Bedeutung immundominanter Antigene von *T. gondii* in der Immunabwehr

Es ist bekannt, dass *T. gondii* Antigene mit immundominanten Eigenschaften besitzt. Nicht nur in Tachyzoiten, sondern in jedem der drei beschriebenen infektiösen Stadien von *T. gondii* kann die Expression spezifischer Antigene nachgewiesen werden (Kasper 1989; Hill, Coss *et al.* 2011). Die sogenannten *excreted-secreted-antigens* (ESA) konnten zum großen Teil in den Dichten Granula (s. u.) nachgewiesen werden und wurden schon früh als immundominante Antigene erkannt (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989; Charif, Darcy *et al.* 1990). Die ESA induzieren neben einer zellvermittelten auch eine antikörperabhängige Immunantwort gegen *T. gondii* (Ridel, Auriault *et al.* 1988). 1988 konnte über eine passive Immunisierung mit ESA in Ratten eine protektive antikörperabhängige Immunantwort induziert werden (Darcy, Deslee *et al.* 1988). Auch in Humanseren konnten gegen ESA gerichtete IgM-Antikörper während der akuten Phase der Infektion und IgG-Antikörper in der chronischen Phase der Infektion nachgewiesen werden (Decoster, Darcy *et al.* 1988).

Im Gegensatz zu den ESA ist SAG1 (vormals P30) ein tachyzoitenspezifisches Oberflächenantigen und wird in der frühen Phase der Infektion vom humoralen

Immunsystem erkannt (Burg, Perelman *et al.* 1988; Godard, Estaquier *et al.* 1994). Bereits 1992 konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Tiere nach Immunisierung mit ESA P30 eine nachfolgende Infektion mit Bradyzoiten überleben (Darcy, Maes *et al.* 1992). Dieser protektive Effekt wird nicht nur durch die humorale, sondern auch durch die zelluläre Immunantwort vermittelt. Khan *et al.* zeigten 1991, dass P30 (SAG1) *in vivo* eine starke CD8⁺-T-Zell-Antwort in experimentell immunisierten Mäusen auslöst (Khan, Ely *et al.* 1991).

Das Oberflächenantigen SAG1 wird häufig als Antigen bei der serologischen Diagnostik eingesetzt. Darüber hinaus gibt es Untersuchungen über die diagnostische Verwendung von Proteinen aus den Dichten Granula z. B. von rekombinant hergestelltem GRA1 und GRA6 (Lecordier, Fourmaux *et al.* 2000).

1.6. Sekretorische Organellen von *T. gondii*

Zu den sekretorischen Organellen von *T. gondii* zählen die Micronemen, Rhoptrien und Dichten Granula. Diese Organellen sind im Parasiten an unterschiedlichen Bereichen intrazellulär lokalisiert und übernehmen wichtige Funktionen bei der Invasion der Wirtszelle, der Bildung der Parasitophoren Vakuole (PV) und der Fortbewegung des Parasiten.

Die Invasion in die Wirtszelle und die Bildung der Parasitophoren Vakuole wird durch sequenzielle Sekretion aus den sekretorischen Organellen reguliert, die im Folgenden vorgestellt werden (Carruthers und Sibley 1997).

1.6.1. Micronemen

Die Micronemen sind im apikalen Bereich des Parasiten lokalisiert und haben eine bogenförmige Struktur. Sie sezernieren die Micronemen-Proteine (MIC-Proteine). Die Sekretion von MIC-Proteinen ist ein regulierter Prozess, der durch eine Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels im Zytosol des Parasiten erfolgt (Carruthers, Moreno *et al.* 1999; Carruthers und Sibley 1999).

Bisher konnten etwa 27 MIC-Proteine identifiziert werden: MIC1-17; zuletzt MIC17 (Sohn, Cheng *et al.* 2011), sowie TgAMA1 (Hehl, Lekutis *et al.* 2000), TgM2AP (Rabenau, Sohrabi *et al.* 2001), TgSUB1-5 (Miller, Binder *et al.* 2001), TgROM1 (Brossier, Jewett *et al.* 2005), TgSPATR (Kawase, Nishikawa *et al.* 2007) und TgTLN4 (Laliberte und Carruthers 2011).

Proteine aus den Micronemen bilden während der Invasion eine *tight junction* aus, die den Parasiten mit der Wirtszelle verbindet (Michel, Schupp *et al.* 1980) und haben daher eine Funktion bei der Parasiten-Adhäsion an der Wirtszelle. Diese Fähigkeit konnte für MIC1 (Fourmaux, Achbarou *et al.* 1996) und MIC2 (Carruthers, Giddings *et al.* 1999) nachgewiesen werden. Auch MIC3 (Cerede, Dubremetz *et al.* 2002) und MIC4 (Brecht, Carruthers *et al.* 2001) konnten als Proteine identifiziert werden, die über eine adhäsive Funktion verfügen. Die adhäsive Funktion wird durch verschiedene Domänen z. B. EGF (*epidermal growth factor*) oder Thrombospondin-ähnliche Domänen ermöglicht, welche u. a. in MIC2 identifiziert wurden (Wan, Carruthers *et al.* 1997).

Die Sekretion von MIC-Proteinen findet in der frühen Phase des Invasionsprozesses statt. Es konnte anhand von MIC2 gezeigt werden, dass der Beginn der Sekretion mit Kontaktaufnahme des Tachyzoiten mit der Wirtszellmembran erfolgt (Carruthers und Sibley 1997). MIC-Proteine sind während der aktiven Invasion in die Wirtszelle an dem gleitenden Fortbewegungsmechanismus des Parasiten beteiligt (Sibley, Hakansson *et al.* 1998). Die Invasion in die Wirtszelle dauert 5 – 10 Sekunden, danach findet keine aktive Bewegung des Parasiten mehr statt (Dubremetz, Garcia-Reguet *et al.* 1998).

1.6.2. Rhoptrien

Die Rhoptrien sind wie die Micronemen am apikalen Pol von *T. gondii* lokalisiert und bilden zusammen mit dem Conoid und dem Polring den namensgebenden Apikalkomplex. Rhoptrien sind längliche, kegelförmige Organellen mit einer knollenartigen Basis, die über einen Gang mit der anterioren Region des Parasiten verbunden sind. Über diesen Gang werden Rhoptrien-Proteine (ROP-

Proteine), von denen aktuell etwa 40 bekannt sind, in die sich bildende Parasitophore Vakuole sezerniert. ROP1 konnte als erstes ROP-Protein identifiziert werden (Schwartzman 1986; Saffer, Mercereau-Puijalon *et al.* 1992). Es konnte gezeigt werden, dass ROP1 mit der Membran der Parasitophoren Vakuole nach der Invasion in die Wirtszelle assoziiert ist (Saffer, Mercereau-Puijalon *et al.* 1992). In der frühen Entstehungsphase der Parasitophoren Vakuole sind viele der ROP-Proteine mit der Membran der PV assoziiert (Bradley, Ward *et al.* 2005). Daher ist es nachvollziehbar, dass ROP-Proteine eine Funktion beim Aufbau der Parasitophoren Vakuole besitzen. Die Wirtszellproteine in der Membran der PV (PVM) werden gezielt durch Proteine von *T. gondii* ersetzt, wobei ROP-Proteine als erste in die PVM eingebaut werden (Beckers, Dubremetz *et al.* 1994; Carruthers und Sibley 1997). Zusätzlich zu den Funktionen der Ausreifung der PV werden einigen ROP-Proteinen, z. B. ROP16 regulatorische Funktionen bei der Interaktion mit der Wirtszelle zugeschrieben (Ong, Reese *et al.* 2010).

1.6.3. Dichte Granula

Die Dichten Granula (DG) sind kugelförmige elektronendichte Organellen, deren Durchmesser ca. 200 nm beträgt. Aus den DG werden die DG-Proteine (GRA-Proteine) sezerniert. Anders als bei den Micronemen und Rhoptrien findet die Sekretion von GRA-Proteinen nicht nur während der Invasionsphase des Parasiten statt, sondern ist vielmehr ein kontinuierlicher Prozess. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt aber bei den Dichten Granula anders als bei den Micronemen nicht zu einer Sekretionsinduktion (Chaturvedi, Qi *et al.* 1999). Das Ausmaß der Sekretion der DG wird durch GTPasen und andere lösliche Faktoren beeinflusst (Chaturvedi, Qi *et al.* 1999). Die GRA-Proteine liegen zunächst in elektronendichten Vesikeln vor. Die Exozytose von GRA-Proteinen findet am anterioren Ende des Parasiten statt (Dubremetz, Achbarou *et al.* 1993). Es konnte gezeigt werden, dass der Inhalt der Vesikel durch eine Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran

des Parasiten in die PV hinein sezerniert wird (Leriche und Dubremetz 1990; Dubremetz, Achbarou *et al.* 1993).

1.7. Proteine aus den sekretorischen Organellen von *T. gondii*

Die verschiedenen sekretorischen Organellen beinhalten funktionell unterschiedliche Proteine, von denen die für diese Arbeit relevanten im Folgenden vorgestellt werden.

1.7.1. GRA-Proteine

Aktuell sind etwa 20 GRA-Proteine identifiziert worden: GRA1-GRA15; zuletzt GRA15 (Rosowski, Lu *et al.* 2011), sowie u. a. zwei Isoformen der 5'-Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase I und NTPase II) (Bermudes, Peck *et al.* 1994; Asai, Miura *et al.* 1995).

GRA Proteine werden als lösliche Proteine sezerniert (Lecordier, Mercier *et al.* 1999; Adjogble, Mercier *et al.* 2004). Man unterscheidet je nach Ziellokalisation zwischen membrangebundenen oder weiterhin in der PV löslich verbleibenden GRA-Proteinen. Die membrangebundenen GRA-Proteine werden entweder zu dem tubulovesikalen Netzwerk oder der Membran der PV transportiert. Es konnten u. a. GRA2 und GRA9 als Proteine identifiziert werden, die mit den Membranen der tubulovesikalen Netzwerkstruktur assoziiert sind (Charif, Darcy *et al.* 1990; Adjogble, Mercier *et al.* 2004). Der Mechanismus, der zu einer post-sekretorischen Segregation der GRA-Proteine führt und ihre spätere Lokalisation determiniert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte jedoch anhand von GRA5 gezeigt werden, dass der Transport zu der Plasmamembran des Parasiten durch eine N-terminale Domäne bestimmt wird (Gendrin, Mercier *et al.* 2008).

Die Funktionen der GRA-Proteine sind vielseitig. Insbesondere sind sie am Aufbau des tubulovesikalen Netzwerkes in der PV beteiligt, das die PV stabilisiert (Mercier, Dubremetz *et al.* 2002). Außerdem sind die GRA-Proteine

am Nährstofftransport beteiligt. *T. gondii* ist darauf angewiesen, u. a. Purine aus der Wirtszelle aufzunehmen (Schwartzman und Pfefferkorn 1982). Da die Adenosin-Konzentration im Zytoplasma der Wirtszelle gering ist, scheint Adenosin-Triphosphat (ATP) die primäre Purin-Quelle für den Parasiten zu sein (Bermudes, Peck *et al.* 1994). Hierbei spielen die NTPasen eine besondere Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die NTPasen schrittweise ATP zu Adenosin-Monophosphat (AMP) degradieren, bevor AMP durch die parasiteneigene 5'-Nukleotidase zu Adenosin hydrolysiert wird (Bermudes, Peck *et al.* 1994; Asai, Miura *et al.* 1995).

Im Folgenden soll der Übersichtlichkeit wegen aber nur auf die Proteine eingegangen werden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Angaben über die molekulare Größe des Proteins in kDa).

GRA1 (23 kDa)

P23 wurde als erstes GRA-Protein von Cesbron-Delauw *et al.* beschrieben (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989) und wurde später in GRA1 umbenannt (Sibley, Pfefferkorn *et al.* 1991). Nach der Sekretion liegt GRA1 als gelöstes Protein in der PV vor. Es konnte experimentell bestätigt werden, dass GRA1 über zwei Ca^{2+} -bindende Domänen verfügt, die sog. *EF-hands* (*elongation-factor-hands*) (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989). Jede Domäne einer *EF-hand* kann zwei Ca^{2+} -Ionen binden (Luan, Kudla *et al.* 2002). Es wird eine mögliche Funktion dieser Domänen als Ca^{2+} -Puffer diskutiert (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989).

GRA2 (28 kDa)

GRA2 ist an der Bildung der tubulovesikalen Netzwerkmembran und des tubulovesikalen Netzwerkes selbst beteiligt (Sibley, Niesman *et al.* 1995; Mercier, Dubremetz *et al.* 2002). Es konnte gezeigt werden, dass GRA2 über zwei amphipathische α -Helices verfügt, die es ermöglichen, an die Netzwerkmembran zu binden (Mercier, Lecordier *et al.* 1993; Mercier, Cesbron-Delauw *et al.* 1998). GRA2 liegt in der PV entweder membrangebunden oder in löslicher Form vor.

Nach der Sekretion ist GRA2, im Gegensatz zu GRA1, überwiegend am posterioren Pol des Parasiten lokalisiert (Sibley, Niesman *et al.* 1995).

GRA7 (29 kDa)

GRA7 zählt zu den membran-assoziierten Proteinen. Im Gegensatz zu GRA2 und GRA9 zeichnet sich GRA7 nicht durch amphipathische α -Helices aus, sondern durch eine einzige hydrophobe α -Helix als PVM-bindende Domäne (Fischer, Stachelhaus *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, dass GRA7 mit den sogenannten *Host Organelle-Sequestering Tubulo-structures* (H.O.S.T.) assoziiert ist (Coppens, Dunn *et al.* 2006). Als H.O.S.T. wird ein Nährstofftransportsystem beschrieben. So werden z. B. Endolysosomen mit Hilfe von Mikrotubuli vom Zytoplasma der Wirtszelle in die PV transportiert und dort sequestriert. Während des Vorgangs wird das aufgenommene Material in einem Transportkanal von einem dichten „Kragen“ eingeschnürt und stabilisiert, der u. a. aus GRA7 besteht (Coppens, Dunn *et al.* 2006).

GRA9 (41 kDa)

1998 konnte zunächst ein 41 kDa großes Protein B10 aus der Gruppe der ESA beschrieben werden, dass 2004 als GRA9 definiert wurde. (Nockemann, Dlugonska *et al.* 1998; Adjogble, Mercier *et al.* 2004). GRA9 wird am anterioren Pol des Parasiten sezerniert und interagiert mit dem Membransystem des tubulovesikalen Netzwerkes (Adjogble, Mercier *et al.* 2004). GRA9 zeichnet sich durch eine amphipathische α -Helix aus, über die eine Interaktion mit der PVM ermöglicht wird. GRA9 ist als amphipathisches Protein im gespeicherten Zustand in Komplexen in den Dichten Granula zu finden, wird jedoch wie GRA2 in gelöster Form sezerniert (Adjogble, Mercier *et al.* 2004).

1.7.2. MIC-Proteine

MIC5 (22 kDa)

Zunächst ist 1991 ein 25 kDa großes immundominantes Antigen als H4 beschrieben worden (Johnson und Illana 1991). Später wurde es dann von

Brydges *et al.* molekular charakterisiert und gemäß der Nomenklatur von Sibley (Sibley, Pfefferkorn *et al.* 1991) als MIC5 bezeichnet, das in Micronemen lokalisiert ist (Brydges, Sherman *et al.* 2000). MIC5 wird als Präproprotein exprimiert. Dann erfolgt eine proteolytische Spaltung zu einem Proprotein durch eine Signalpeptidase, bevor es nach weiteren posttranslationalen Modifikationen im trans-Golgi-Netzwerk als 22 kDa großes Protein sezerniert wird (Brydges, Sherman *et al.* 2000). Während der Invasion in die Wirtszelle ist MIC5 mit der Oberfläche des Parasiten „assoziiert“, ohne über eigene transmembranöse Bindungsmöglichkeiten zu verfügen (Brydges, Zhou *et al.* 2006). MIC5 zählt zwar zu der Parvulin Gruppe der Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerasen (PPlasen), jedoch konnte bisher keine PPlase-Aktivität des rekombinanten MIC5 nachgewiesen werden (Brydges, Sherman *et al.* 2000). MIC5 interagiert weiterhin mit anderen MIC-Proteinen auf der Oberfläche des Parasiten während des Invasionsprozesses, indem es z. B die Aktivität des Oberflächenantigens Subtilidase 1 (SUB1) hemmt (Saouros, Dou *et al.* 2012). SUB1 ist eine Serinprotease aus der Gruppe der Subtilidasen, die auch in anderen Apikomplexa, z. B. *Plasmodium* bei der Vermehrung eine Rolle spielen (Suarez, Volkmann *et al.* 2013).

1.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit und beim Menschen und anderen Warmblütern für das Krankheitsbild der Toxoplasmose verantwortlich. Die Immunabwehr des Menschen und anderer Zwischenwirte bedingt nach einer Infektion mit *T. gondii* die sogenannte Stadienkonversion von den sich schnell teilenden Tachyzoiten in die Bradyzoiten. Bradyzoiten organisieren sich in Zysten und sind überwiegend in der Muskulatur und dem ZNS des Wirtes lokalisiert. Dort können sie teilweise lebenslang persistieren. Eine Schwächung des Immunsystems, z. B. im Rahmen von AIDS, Organtransplantationen oder immunsuppressiver Therapie bei Tumorpatienten kann zu einer Reaktivierung des Parasiten bei latent bestehender Infektion führen.

Die immunologischen Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* sind sehr vielseitig.

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr. Dabei konnte gezeigt werden, dass bestimmte von *T. gondii* sezernierte Antigene immunmodulatorische Eigenschaften haben. GRA-Proteine aus den Dichten Granula und MIC-Proteine aus den Micronemen können als immundominante Antigene diagnostisch von Bedeutung sein.

In der Routinediagnostik wird der Immunfluoreszenztest (IFT) angewendet. Zusätzlich zur Detektion von IgG-Antikörpern dient der ISAGA-IgM-Test zur Differenzierung zwischen einer frischen oder einer „alten“ Infektion. Ein Aviditätstest kann bei positivem IgG- und IgM-Antikörpersuchtest als weiterführendes Abklärungsverfahren zur Identifikation des Infektionszeitpunktes angewendet werden. In dieser Konstellation würde eine hohe Avidität für eine abklingende oder latente Infektion und eine geringe Avidität eher für eine akute Infektion sprechen (Robert Koch-Institut, 2007). Zusätzlich werden häufig Immunoblot-Verfahren zur Bestätigung der Spezifität der nachgewiesenen *T. gondii*-Antikörper verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zunächst GRA- und MIC5-Proteine mittels denaturierter Proteinaufreinigung rekombinant hergestellt. Anschließend wurden Humansenen durch das Western Blot-Verfahren anhand der erkannten rekombinanten Proteine auf eine mögliche Toxoplasmose hin untersucht. Dabei konzentriert sich der Nachweis auf spezifische Antikörper der Klassen IgG und IgM gegen rekombinante Proteine von *T. gondii*.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Seren von experimentell mit *T. gondii* infizierten Schweinen mittels Western Blot-Verfahren auf eine mögliche Reaktivität mit den rekombinanten Antigenen analysiert.

Der dritte Teil dieser Arbeit vergleicht die Immunantwort von experimentell mit *T. gondii* infizierten Mäusen auf die rekombinanten Antigene, ebenfalls durch Western Blot-Analysen. Dabei soll zusätzlich untersucht werden, ob sich ein gezielter IDO-*knockout* auf die Antikörperproduktion als Folge einer potentiell verminderten antiparasitären Widerstandsfähigkeit auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper

Tabelle 2.1: Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung im Western Blot
Kaninchen anti-Mensch IgG Alkalische Phosphatase- gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:1000
Ziege anti-Mensch IgM Alkalische Phosphatase- gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:1000
Ziege anti-Schwein IgG Alkalische Phosphatase- gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:1000
Ziege anti-Schwein IgM Alkalische Phosphatase- gekoppelt	antibodies-online.com, Atlanta, USA	1:1000
Ziege anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:5000
Ziege anti-Maus IgM Peroxidase-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	1:5000

2.1.2. Bakterienstämme

Stamm	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> Stamm BL21	ATCC, Wesel, Deutschland

2.1.3. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
β-Mercaptoethanol	life technologies, Invitrogen, Carlsbad, USA
BCIP-T	Fermentas, USA
Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassi-Brillant-Blue R-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Entwickler	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, St. Gallen, Schweiz
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixierer	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidinohydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Imidazol	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Fermentas, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, entrahmt	Oxoid, Hampshire, England
MOPS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Fermentas, USA
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Urea	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4. Medien und Puffer

5x SDS Probenpuffer	10 % SDS 0,4 M Tris / HCl pH 6,8 25 % Glycerol 5 % β -Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau
20x MOPS Puffer	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7,7
Alkalische Phosphatase Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 10 mM $MgCl_2$
Entfärbelösung	74,5 ml Eisessig 200 ml Ethanol 725,5 ml Wasser
Färbelösung Coomassie-Brillant-Blau	0,5 g Coomassie-Brillant-Blau R-250 100 ml Eisessig 500 ml Ethanol 500 ml Wasser

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl ad 1000 ml mit H₂O pH 7; autoklaviert
NuPAGE® Transfer Puffer	50 ml NuPAGE® Transfer Puffer (20x) 200 ml Methanol 750 ml Wasser
Proteinaufreinigungspuffer A	6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 8,0
Proteinaufreinigungspuffer B	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 8,0
Proteinaufreinigungspuffer C	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 6,3
Proteinelutionspuffer E	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl 0,25 M Imidazol pH 6,3
Tris-Glycin-Elektrophorese Puffer	60 g Tris 288 g Glycin 0,1 % SDS ad 10 l mit H₂O

2.1.5. Geräte

Gerät	Hersteller
Blottingkammer	PREQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Drehrad, Model L28	Labinco BV, Breda, Niederlande
Entwicklermaschine CAWOMAT 2000IR	CAWO photochemisches Werk, Schrobenhausen, Deutschland
Elix Advantage 3 water purification system	Millipore, Billerica, USA
Gelkammer, Novex® Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG® RCT	IKA® Werke, Staufen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
pH-Meter MP 225	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Spannungsquelle EPS 301	Amersham plc, GE Healthcare, UK
Photometer UV mini 1240 Spectrophotometer	Shimadzu, Columbia, USA
Vortexer MS1 Minishaker	IKA® Werke, Staufen, Deutschland
Waage Precisa 400	Oehmen, Labortechnik, Essen, Deutschland
Wasserbad	GfL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge mini spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge universal 32 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Beckmann J2-21 mit Rotoren JA-10; JA-20	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

2.1.6. Größenstandards und Kits

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier	Whatman, Dassel, Deutschland
ECL Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Einwegpipetten Stripette®	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Eppendorf Safe-Lock Gefäße™	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kodak Film BioMax MR	Kodak, Rochester, USA
NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pipetten Finnpiette™	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipettenspitzen TipOne®	StarLab, Hamburg, Deutschland
Polypropylen-Säulen	Quiagen, Hilden, Deutschland
Protran™ Nitrozellulose Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Zellkulturplatten (96-well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.1.8. Seren

Humanseren

30 humane Seren wurden von der serologischen Diagnostik des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt (genehmigt mit Studiennummer 3174 vom 20.01.2009).

Die Einteilung der Seren erfolgte nach Höhe des angegebenen Titters im Immunfluoreszenztest (IFT). Patienten mit einem IFT-Titer $< 1:16$ sind nicht immunisiert (seronegativ). Die Unterteilung der Toxoplasma-positiven Proben mit einem IFT-Titer $\geq 1:16$ erfolgt in schwach positive (IFT-Titer $< 1:512$) und deutlich positive Seren (IFT-Titer $\geq 1:512$).

Der Nachweis spezifischer Antikörper der Klasse IgM im *Enzyme-linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) spricht für eine akute Toxoplasmose.

Die Serumproben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Humanseren

Serum	IFT	IgM-ELISA	Serum	IFT	IgM-ELISA
1	< 1:16	-	16	1:256	-
2	< 1:16	-	17	1:256	-
3	< 1:16	-	18	1:256	-
4	< 1:16	-	19	1:256	-
5	< 1:16	-	20	1:512	-
6	< 1:16	-	21	1:512	-
7	1:16	-	22	1:512	-
8	1:64	-	23	1:512	-
9	1:64	-	24	1:512	-
10	1:64	-	25	1:512	+
11	1:128	-	26	1:1024	-
12	1:128	+	27	1:2048	+
13	1:128	-	28	1:2048	+
14	1:128	-	29	1:2048	+
15	1:256	+	30	1:4096	+

IFT, Immunfluoreszenztest; IgM-ELISA, IgM-*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

+, Nachweis von Antikörpern der Klasse IgM; -, kein Nachweis von Antikörpern der Klasse IgM;
Bewertung der IFT-Titer: < 1:16 (seronegativ), ≥ 1:16 (seropositiv; < 1:512, schwach positiv;
≥ 1:512, deutlich positiv)

Schweineseren

Die in dieser Arbeit analysierten Schweineseren stammen aus der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Im Rahmen der durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Kooperation wurden sie uns von Prof. Dr. med. vet. Astrid Tenter zur Verfügung gestellt.

Es wurden 7 - 9 Wochen alte Schweine experimentell mit Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* infiziert. Dazu wurden entsprechend der Inokulationsdosis drei Gruppen festgelegt:

Gruppe 1: infiziert mit 10^6 sporulierten Oozysten per oral (p. o.)

Gruppe 2: infiziert mit 10^5 sporulierten Oozysten p. o.

Gruppe 3: infiziert mit 10^3 sporulierten Oozysten p. o.

Bei diesen drei Gruppen erfolgten vor der Infektion mit *T. gondii* Blutentnahmen zur Gewinnung von negativen Serumproben. Nach der oralen Infektion der Schweine mit Oozysten wurde den Tieren in ein- bis zweiwöchigen Abständen bis zum 110. Tag post infectionem (p. i.) Blut entnommen (Gruppe 1), bzw. bis zum 98. Tag p. i. (Gruppe 2 und 3). Nach der Gewinnung von Serum durch Zentrifugation des Vollblutes wurden die Serumproben bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 29 Proben analysiert (Tabelle 2.3). Es wurden von 4 Schweinen 12 Serumproben untersucht, die von den Tagen 14, 28 und 53 p. i. stammen (Woche 2, 4 und 8 p. i.), sowie 10 Serumproben vom 98. Tag p. i. Außerdem wurden 7 negative Seren analysiert. Die Proben vom 14., 28. und 53. Tag p. i. sind gemäß der Inokulationsdosis der Gruppe 1 zuzuordnen. Die Serumproben vom Tag 98 p. i. stammen von Tieren der Gruppen 2 und 3.

Tabelle 2.3: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Schweineseren

Serumgruppe	Anzahl der analysierten Proben	Tag p. i.
negative Proben	7	a. i.
10 ⁶ Oozysten	12	14, 28, 53
10 ⁵ Oozysten	5	98
10 ³ Oozysten	5	98

a. i., ante infectionem; p. i., post infectionem

Mausseren

Die in dieser Arbeit analysierten Mausseren stammen aus der eigenen Arbeitsgruppe und wurden im Rahmen des genehmigten Projekts G271/13 gewonnen und zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit analysierten 51 Seren ist in Tabelle 2.4 gezeigt.

Die experimentelle Infektion von BALB/c-Mäusen und IDO-*knockout*-Mäusen (IDO^{-/-}; auf der Basis von BALB/c-Mäusen) erfolgte mit Tachyzoiten und Zysten. Dabei wurden Tachyzoiten des ME49-Stamms, sowie des TS4-Stamms von *T. gondii* verwendet. Die Tachyzoiten wurden der Maus mit 200 µl PBS-Lösung

rechtsseitig intraperitoneal appliziert. Zusätzlich wurde jeweils einer weiteren Maus 200 µl PBS-Lösung intraperitoneal als Negativkontrolle injiziert. Weiterhin wurden vier Seren von Mäusen analysiert, die experimentell mit 40 Zysten des ME49-Stamms von *T. gondii* oral infiziert wurden.

Außerdem wurden Seren von experimentell infizierten C57BL/6-Mäusen und von IDO^{-/-}-Mäusen (auf der Basis von C57BL/6-Mäusen) analysiert. Hierbei handelt es sich um Proben, die am 5., 7. und 14. Tag nach der Infektion gewonnen wurden. Dabei wurden die Mäuse am Tag der Gewinnung der jeweiligen Serumprobe durch zervikale Dislokation getötet.

Alle gewonnenen Serumproben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Übersicht über die mit Western Blot analysierten Mausseren

Maustyp	<i>T. gondii</i> Stamm	Infektionsdosis	Tage p. i.	Anzahl der Seren	Negativ Kontrollen
A Nachweise spezifischer Antikörper der Klasse IgG und densitometrische Auswertung					
BALB/c	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	147	2	1
BALB/c IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	147	2	1
BALB/c	ME49	40 Zysten	90	2	1
BALB/c IDO ^{-/-}	ME49	40 Zysten	90	2	1
BALB/c	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	41	1	1
BALB/c IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	41	1	1
BALB/c	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	28	1	1
BALB/c IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	28	1	1
BALB/c	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	11	1	1
BALB/c IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	11	1	1
B Nachweise spezifischer Antikörper der Klasse IgM					
B6 IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ /10 ⁵ Tachyzoiten	84	2	-
B6 IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	14	1	-
B6 IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	7	2	1
B6	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	7	2	1
B6 IDO ^{-/-}	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	5	2	1
B6	ME49	10 ⁴ Tachyzoiten	5	2	1
C Nachweise spezifischer Antikörper der Klasse IgG					
BALB/c	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	104	1	1
B6	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	104	1	1
BALB/c	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	97	1	1
B6	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	97	1	1
BALB/c	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	48	1	1
B6	TS4	10 ⁵ Tachyzoiten	48	1	1

p. i., post infectionem; BALB/c IDO^{-/-}, Indolamin-2,3-Dioxygenase-*knockout* Maus auf der Basis einer BALB/c-Maus, B6 IDO^{-/-}, Indolamin-2,3-Dioxygenase-*knockout* Maus auf der Basis einer C57BL/6-Maus.

2.2. Methoden

2.2.1. Denaturierende Proteinaufreinigung

Zur Herstellung größerer Mengen der rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 wurde das Verfahren der denaturierenden Proteinaufreinigung angewendet.

Es wurde zunächst eine Vorkultur mit dem *E. coli*-Stamm BL21 angeimpft, der bereits im Vorfeld dieser Arbeit mit dem Vektor pET-32a(+) transformiert worden war. Diese Vorkultur (5 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin) wurde ü. N. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Weitere 500 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin wurden bei 37 °C ü. N. erwärmt, welche dann am folgenden Tag mit 2,5 ml der Vorkultur beimpft werden konnten. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 37 °C, bis eine OD_{600nm} von 0,3 gemessen werden konnte. Es wurde eine Probe (500 µl) für das SDS-Polyacrylamid-Gel entnommen. Zur Expression der Proteine wurde die Kultur mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) versetzt und unter Schütteln bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Es wurde eine weitere Probe (500 µl) nach Ende der Stimulation abgenommen. Die Kultur wurde bei 8000 U/min (entsprechend einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) $\approx 11300 \times g$) für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 15 ml Puffer A resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt. Der Ansatz wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im anschließenden Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 30 min bei RT auf dem Drehrad. Danach wurde eine Probe für den Gellauf genommen. Diese wurde wie folgt behandelt:

1. 10 min Zentrifugation bei 13000 U/min (RZB $\approx 11336 \times g$)
2. das Lysat wurde als erste Gellaufprobe verwendet
3. das Pellet wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert und so als zweite Gellaufprobe verwendet.

Anschließend wurde die restliche Kultur für 15 min bei 13000 U/min (RZB $\approx 20400 \times g$) zentrifugiert, das Lysat in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und ü. N. bei -20 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde die Ni-NTA-Agarose für die Proteinaufreinigung in Puffer A äquilibriert:

Es wurden 1 ml Puffer A und 600 µl Ni-NTA für 1 min unter Schwenken gemischt und dann bei 13000 U/min ($RZB \approx 11336 \times g$) 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert und der Ansatz für 1 min geschwenkt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt konnte die Ni-NTA-Agarose vollständig im zuvor bei 37 °C aufgetautem Proben-Lysat aufgenommen werden. Für diese Inkubation wurde der Ansatz 60 min in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf ein Laufrad gesetzt. Während der Inkubation konnten die im pET-22a(+)-Vektor kodierten poly-Histidin-Tags (Histidin-Hexamere; His-Tag) an die Ni-NTA binden.

Das Probenlysat wurde auf eine Polypropylen-Säule gegeben und 5 min bei noch verschlossener Säule stehen gelassen. Nachdem sich die Agarose abgesetzt hat, wurde nun die Säule geöffnet und der Durchlauf aufgefangen. Ebenso wurde hier für die spätere SDS-Gelelektrophorese eine Probe des Durchlaufs gewonnen.

Die Säule wurde im Anschluss dreimalig mit Waschpuffern gewaschen. Dazu wurden jeweils 10 ml Puffer A, Puffer B und Puffer C verwendet. Die Puffer wurden für den späteren Gellauf aufgefangen.

Es folgten 10 Elutionsschritte mit jeweils 500 µl Puffer E. Die über die zweiwertigen Nickelionen an das Säulenmaterial gebundenen His-Tags wurden durch das Imidazol in Puffer E gelöst.

Alle in diesem Verfahren gewonnenen Proben wurden zur Vorbereitung des Gellaufes mit TCA versetzt (Kapitel 2.2.3.5.) und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel übertragen (Kapitel 2.2.2.). Nach dem Auftrennen der Proben wurde das Gel mit Coomassi-Brillant-Blau gefärbt (Kapitel 2.2.3.1.).

2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Verfahren der diskontinuierlichen-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteinen verwendet, die zuvor denaturierend aufgereinigt wurden. Die Proben für den Gellauf wurden zur Vorbereitung auf

100 °C erhitzt. Ergänzend zu der Denaturierung durch Erhitzen wurde der SDS-Proben-Puffer mit β -Mercaptoethanol versetzt, das die Disulfidbrücken aufbricht und somit den Denaturierungseffekt verstärkt.

Das Sodiumdodecylsulfat (SDS, Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine und führt zu einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung. Unter Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgt eine Wanderung der Proteine im Trenngel in Abhängigkeit von deren Molekulargewicht.

Um die Poben der denaturierenden Proteinaufreinigung auszuwerten, wurden SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der gegossenen SDS-Polyacrylamid-Gele

Sammelgel:	Trenngel (9,5 %):
6,5 ml destilliertes, entgastes Wasser	8,5 ml destilliertes, entgastes Wasser
1 ml Acrylamid-Rotiphoese Gel 30	6,3 ml Acrylamid-Rotiphoese Gel 30
2,5 ml 0,5 M Tris/HCL pH 6,8	5 ml 1,5 M Tris/HCL pH 8,8
100 μ l 10 % SDS	200 μ l 10 % SDS
150 μ l 10 % APS	200 μ l 10 % APS
15 μ l TEMED	25 μ l TEMED

Für die Elektrophorese wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet. Es wurde eine Spannung von 35 V über Nacht angelegt.

Im Rahmen der Bestimmung von Antikörpern gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Human-, Schweine- und Mausseren durch Western Blot-Analysen wurden NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gele (Invitrogen) verwendet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x MOPS-Puffer eingesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 160 V.

2.2.3. Proteinanalytische Methoden

2.2.3.1. Coomassi-Blau Färbung der Proteine in SDS-Gelen

Durch Coomassi-Brillant-Blau können die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine angefärbt werden. Dazu wurde das SDS-Gel für 1 Stunde bei RT unter Schwenken in die Färbelösung gelegt. Die Färbelösung wurde abgegossen und

das Gel mit Wasser gespült. Anschließend wurde das Gel in Entfärberlösung geschwenkt. Unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers wurden überschüssige Farbreste entfernt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt. Das Gel wurde nun auf Filterpapier gelegt und 2 Stunden im Geltrockner getrocknet.

2.2.3.2. Western Blot-Analyse

Proteine, die zuvor in SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt worden waren, wurden anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Proteintransfer auf die proteinbindende Membran erfolgte durch das *semi-dry* Verfahren. Dabei wurden zunächst sechs Whatman-Chromatographiepapiere, die der Größe des Gels entsprachen, in NuPAGE®-Transferpuffer getränkt und dann auf die Anodenseite der Blotting Kammer gelegt. Darauf folgte dann die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran sowie das Gel, auf das zur Kathodenseite hin abschließend drei weitere Chromatographiepapiere aufgebracht wurden. Nun wurde der Aufbau durch Kompression mit einem Zentrifugenröhrchen von Luftblasen befreit, um einen reibungslosen Proteintransfer zu gewährleisten. Die geschlossene Blotting Kammer wurde mit der Spannungsquelle verbunden. Bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche erfolgte der Proteintransfer über einen Zeitraum von 120 min.

2.2.3.3. Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Die nach dem *semi-dry* Blot-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine können durch spezifische Sekundärantikörper detektiert werden. Zunächst wurde die Membran in eine Blocklösung (5 % entrahmtes Milchpulver in PBS) gegeben und bei RT 60 min lang geschwenkt. Dabei werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt.

Danach erfolgte der Einsatz von Human-, Schweine- oder Mausserum als Primärantikörper in einer Konzentration von 1:100 (Human- und Schweineseren), bzw. 1:1000 (Mausseren). Dazu wurde die Nitrozellulosemembran zusammen mit 0,5 % entrahmten Milchpulver in PBS in eine Taschenfolie gelegt und mit dem entsprechenden Serum ü. N. bei 4 °C inkubiert.

Nach Inkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran in PBS mit 0,2 % Tween für je 5 min. Anschließend wurde die Membran für 45 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Hierbei wurden zwei verschiedene Konjugate verwendet: Für den immunchemischen Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Human- und Schweineseren wurden Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Bei Mausseren erfolgte die Detektion durch *horseradisch-peroxidase*- (HRPO) konjugierte Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:5000.

Nach weiteren drei Waschgängen für jeweils 5 min erfolgte der Entwicklungsvorgang.

Im Falle der Verwendung von Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper wurde die Membran in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer gelegt. Zusätzlich wurde der Puffer mit 33 µl BCIP-T und 44 µl NBT versetzt. Die *p*-Toluidin Form des BCIP-Salzes ist in Dimethylformamid (DMF) löslich. In dieser Stammlösung mit dem alkalischen Puffer und NBT unterliegt das Tetrazoliumsals einer Reduktion mit der Bildung des violetten Formazan-Farbstoffes. Das gelbe Indolyl, zuvor durch die AP dephosphoryliert, wird dabei zum blauen Indigo-Farbstoff oxidiert. Dieser Farbumschlag machte die Proteine sichtbar, die zuvor mit spezifischen Antikörpern der Klassen IgG bzw. IgM reagiert haben. Die Reaktion wurde mit aqua dest. abgestoppt. Anschließend wurden die Membranen in Taschenfolien eingeschweißt.

Zur Detektion der spezifischen Antikörper gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Mausseren wurde das „Enhanced-Chemiluminescence-System“ (ECL, GE Healthcare) verwendet. Dabei kommt es zu einer durch die Peroxidase katalysierten Reaktion während der Inkubation in der ECL-Lösung. Die Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diazylhydrazid, führt zu einer

Lichtemission, die dann über einen Röntgenfilm detektiert werden kann. Die Vorbereitung des ECL-Systems erfolgte nach Herstellerangaben. Die Inkubationszeit der Membran in der ECL-Lösung betrug 3 min bei RT.

Die Belichtungszeit des Röntgenfilmes lag aus Gründen der Vergleichbarkeit der Signalstärke in allen Fällen bei 10 Sekunden.

Die Filme wurden mit der Entwicklermaschine (CAWOMAT 2000 IR, Cawo photochemisches Werk, Schrobenehausen) entwickelt. Zur Auswertung der Größe der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde die Markerbande von der Nitrozellulosemembran auf dem Röntgenfilm abgezeichnet. Anschließend wurden die Filme durch Einscannen digitalisiert, um sie dann weiterhin computergestützt auswerten zu können (Kapitel 2.2.4.)

2.2.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Durch BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific) wurde die Proteinkonzentration der Proben nach denaturierender Aufreinigung bestimmt. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde der vom Kit gestellte BSA-Standard in einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet.

2.2.3.5. TCA-Fällung von Proteinen

Das Verfahren der TCA-Fällung dient zur Konzentrierung von Proteinen, die zuvor denaturierend aufgereinigt wurden. In Gegenwart von TCA kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung der Proteine.

50 µl Probe wurden mit 350 µl PBS und TCA (Endkonzentration 10 %) versetzt und 30 min bei -80 °C gelagert. Nach kurzem Antauen wurde die Probe 15 min bei 14000 U/min (RZB $\approx 20598 \times g$) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Es folgte eine weitere 15 minütige Zentrifugation (14000 U/min, RZB $\approx 20598 \times g$) bei 4 °C. Danach wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde an der Luft bei RT getrocknet und anschließend in 20 µl PBS

resuspendiert. Es wurden 5 µl 5x-SDS Probenpuffer in die gefällte Probe pipettiert. Vor dem Auftragen der Probe auf das SDS-Polyacrylamid-Gel folgte eine 5 minütige Inkubation bei 95 °C auf dem Wärmeblock. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13000 U/min ($RZB \approx 17760 \times g$) für 2 min konnte der Überstand nun auf das Gel übertragen werden und anschließend nach Coomassie gefärbt werden (Kapitel 2.2.3.1.).

2.2.4. Computergestützte Auswertung der Western Blot-Filme

Der immunchemische Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM und IgG erfolgte bei der Auswertung von Mausseren durch HRPO-Sekundärantikörper und das ECL-System (Kapitel 2.2.3.3.).

Zunächst wurde der Röntgenfilm zusammen mit einem weißen Hintergrund eingescannt. Anschließend wurde die Signalstärke der Proteinbanden densitometrisch bestimmt. Dazu wurden folgende aufgelistete Programme verwendet.

2.2.4.1. Adobe Photoshop CS

Mit dem Programm Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) wurde die gescannte Abbildung invertiert.

2.2.4.2. ImageJ

Das Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) wurde zum quantitativen Vergleich der Antikörperproduktion gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* verwendet. Es wurde das Prinzip der Densitometrie angewendet. Dabei wurde bei der zuvor invertierten Abbildung die Farbdichte der einzelnen Banden quantitativ bestimmt. Zur Referenzwertbestimmung für die gemessene Farbdichte diente jeweils der

densitometrisch gemessene Wert einer Serumprobe, die als Negativkontrolle zusätzlich zur experimentellen Infektion der Mäuse bei jedem Infektionszyklus gewonnen wurde.

2.2.4.3. GraphPad Prism

Zur Erstellung von Diagrammen und der statistischen Auswertung der Daten aus den Densitometrie-Analysen der Mausseren wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet.

Es wurde mit Hilfe des Standard t-Tests überprüft, ob sich die Mittelwerte der gemessenen Bandenintensitäten zwischen BALB/c-Wildtyp und IDO-*knockout* Mäusen signifikant voneinander unterscheiden. Dabei wurde das Signifikanzniveau festgelegt auf $p = 0,05$. Die Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM (*standard error of the mean*; Standardfehler).

3. Ergebnisse

GRA-Proteine sowie auch MIC-Proteine wurden als sezernierte und immundominante Antigene von *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) beschrieben.

GRA-Proteine werden von den Dichten-Granula (DG) in die Parasitophore Vakuole (PV) sezerniert (Lecordier, Mercier *et al.* 1999). Ebenso erfolgt in der frühen Phase der Infektion eine Sekretion von MIC-Proteinen, die eine Rolle bei der Invasion der Wirtszelle spielen (Huynh und Carruthers 2006).

Die vorliegende Arbeit vergleicht den Nachweis spezifischer Antikörper der Klassen IgG und IgM gegen rekombinante GRA- und MIC-Proteine von *T. gondii* in Seren der drei Spezies: Mensch, Schwein und Maus. Dazu wurden zunächst rekombinante Proteine von *T. gondii* denaturierend aufgereinigt und anschließend in Western Blot-Analysen eingesetzt.

3.1. Expression rekombinanter Proteine von *T. gondii* in *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden rekombinanten Proteinen von *T. gondii* gearbeitet: rekombinantes (r) GRA1, rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5. Um auf eine für Western Blot-Analysen ausreichende Menge an Proteinen zurückgreifen zu können, wurden die Proteine rekombinant hergestellt.

Als Expressionsorganismus wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm BL21 verwendet, der bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit durch das Einbringen des Vektors pET-32a(+) transformiert worden war. pET-32-Vektoren dienen der Expression von Fusionsproteinen, die mit einem His-Tag® (0,8 kDa) verknüpft sind, einem Hexapeptid der Aminosäure Histidin. Außerdem sind die Fusionsproteine mit einem 109aa Trx-Tag™ (12 kDa) und einem S-Tag™ (1,7 kDa) verknüpft. Der Trx-Tag™ unterstützt die korrekte Faltung der aufzureinigenden Proteine. Bei dem Prinzip der denaturierenden Aufreinigung rückt diese Funktion jedoch in den Hintergrund. Weiterhin erhöht der Trx-Tag™ die Löslichkeit der aufzureinigenden Proteine.

Die N-terminalen Tags des Vektors pET32a(+) führen mit den 18 zwischen den Tags gelegenen Aminosäuren (2,4 kDa) zu einem Größenzuwachs der rekombinanten Proteine von etwa 17 kDa.

Durch die Zugabe von Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) zu der Bakterienkultur wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Diese wurden im Anschluss durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, bei der der poly-Histidin-Tag eine entscheidende Rolle spielt: nach der spezifischen Bindung des His-Tags an der Nickel-NTA und dem Entfernen unspezifischer Komponenten im Zelllysat durch drei Waschschrte, erfolgt die Elution der Fusionsproteine durch Imidazol. Dabei verdrängt das im Elutionspuffer enthaltende Imidazol die Histidinreste des His-Tags kompetitiv aus dem Chelatkomplex mit der Nickel-NTA. Die in den Arbeitsschritten der Affinitätschromatographie gewonnenen Proben für den Gellauf wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel übertragen und ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten rekombinanten Proteine durch die Commassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 3.1).

Durch eine Auftrennung der Eluate im SDS-PAGE kann die Verteilung der rekombinanten Proteine auf die 10 Elutionsfraktionen dargestellt werden und so deren Verwendbarkeit als rekombinantes Antigen für Western Blot-Analysen beurteilt werden.

Es konnten bei den aufgetrennten Eluaten im SDS-PAGE Proteinbanden bei etwa 40 kDa, 45 kDa und 58 kDa detektiert werden (Abbildung 3.1).

Unter Berücksichtigung des theoretischen Molekulargewichts von GRA1 (23 kDa), GRA2 (28 kDa) und GRA9 (41 kDa), sowie des Größenzuwachs durch N-terminale Tags von zusätzlich 17 kDa konnten die detektierten Proteinbanden als rekombinante Fusionsproteine rGRA1, rGRA2 und rGRA9 identifiziert werden. Dementsprechend wurden auch rGRA7 (47 kDa) und Δ rMIC5 (28 kDa, H4-Protein enthaltendes Genfragment) als Fusionsproteine bestimmt.

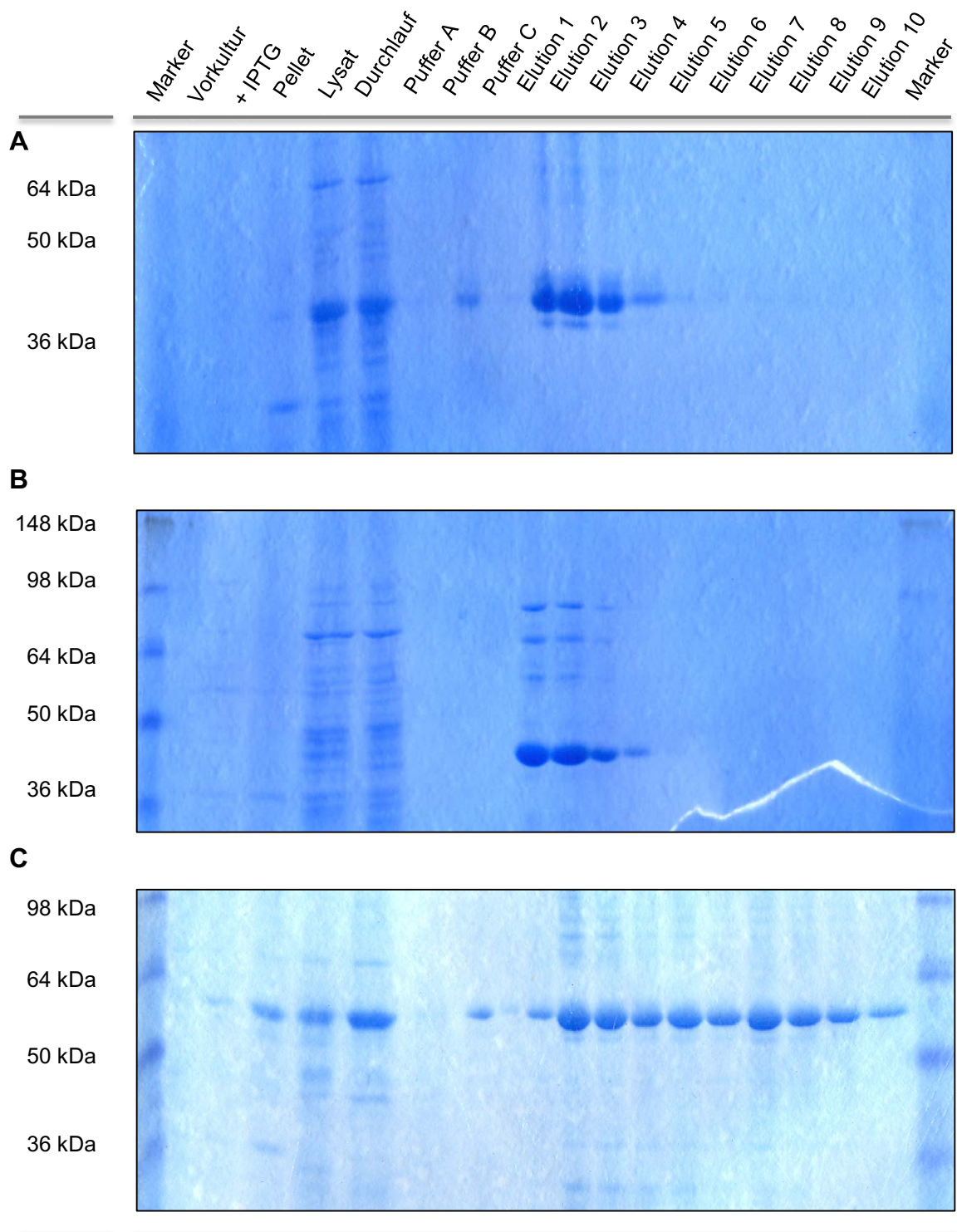


Abb. 3.1: Darstellung der denaturierten Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine von *T. gondii* beispielhaft an den Ergebnissen für rGRA1 (A), rGRA2 (B) und rGRA9 (C). Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; die anschließende Darstellung der Banden durch Commassie-Blaufärbung. rGRA1: 40 kDa (Elution 1 – 4 verwendet), rGRA2: 45 kDa (Elution 1 – 4 verwendet), rGRA9: 58 kDa (Elution 2 – 9 verwendet).

Zur Bestätigung, dass es sich bei den detektierten Proteinbanden tatsächlich um rekombinante Fusionsproteine handelt, wurden Western Blot-Analysen mit Anti-His-Antikörpern durchgeführt. Um die Antikörperreaktion zu detektieren, wurde ein *horseradish-peroxidase*- (HRPO) konjugierter sekundärer Antikörper verwendet (Abbildung 3.2).

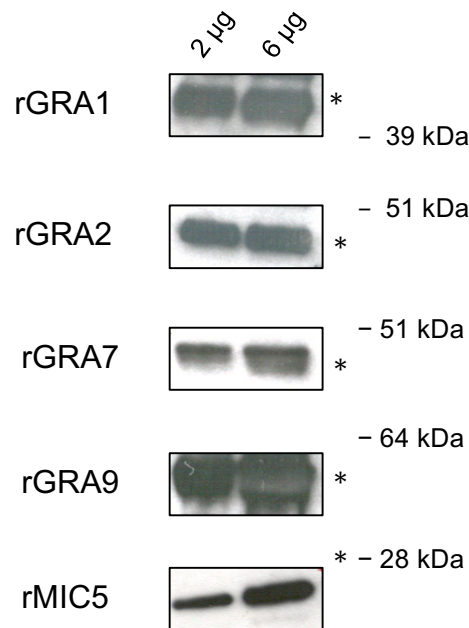


Abb. 3.2: Reaktivität von Anti-His-Antikörpern mit rekombinanten aufgereinigten Fusionsproteinen. Dargestellt sind die Proteinbanden der jeweiligen rekombinant hergestellten GRA Proteine (rGRA) und von rekombinantem MIC5 (rMIC5) in Western Blot-Analysen. Jedes rekombinante Protein wurde in zwei Konzentrationen (2 µg bzw. 6 µg) analysiert. Dargestellt sind jeweils Ausschnitte mit den erwarteten Bandenmustern (*). Eine Antikörperreaktion mit rMIC5 präsentiert sich als Proteinbande mit einer Laufhöhe von ca. 26-27 kDa. Im Western Blot wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 und der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

3.2. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Humanseren

Zunächst sollte überprüft werden, ob man durch die Nutzung von rekombinanten Antigenen mittels Western Blot-Analysen zwischen Seren von immunisierten und nicht immunisierten Patienten unterscheiden kann. Dazu wurde im Folgenden zunächst die Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG getestet.

3.2.1. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG mit rekombinanten *T. gondii*-Antigenen

Zur Detektion von Antikörpern der Klasse IgG gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Humanseren wurden die denaturierend aufgereinigten Proteine in den durchgeführten Western Blot-Analysen in zwei Konzentrationen analysiert. Es wurden jeweils 2 µg und 6 µg von jedem rekombinanten Protein untersucht.

Die in Abbildung 3.3 gezeigten Ergebnisse der Western Blot-Analysen sind beispielhaft anhand von drei Humanseren dargestellt. Serum 1 stammt von einem seronegativen Probanden. Hier konnte keine Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG mit den untersuchten rekombinanten Antigenen gezeigt werden. Die Seren 2 und 3 stammen mit einem IFT-Titer $\geq 1:16$ von immunisierten Patienten. Die seropositiven Seren zeigten eine Reaktion von IgG-Antikörpern mit rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5. Hingegen konnte keine Antikörperreaktion mit rGRA1 nachgewiesen werden. Die Laufhöhe der detektierten rekombinanten Antigene im Western-Blot stimmte mit der erwarteten molekularen Masse der Fusionsproteine überein.

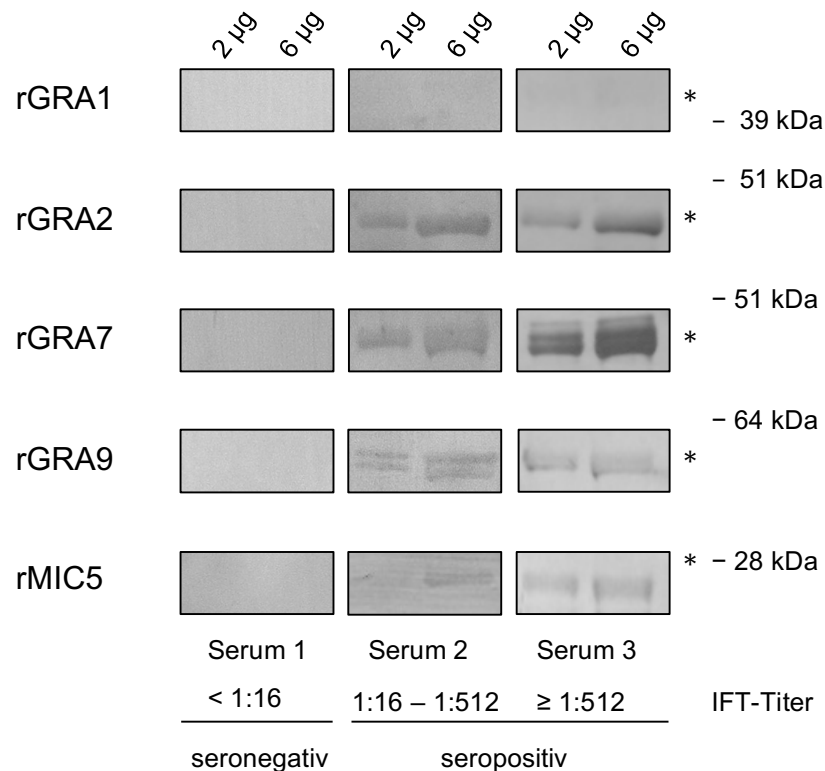


Abb. 3.3: Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Humanseren. Darstellung beispielhaft anhand von drei Humanseren. Die Kategorisierung der Seren erfolgte durch den zuvor serologisch bestimmten Immunfluoreszenztest-Titer (IFT-Titer). Im Western Blot wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:100 auf ihre Reaktivität gegen rekombinantes GRA1 (rGRA1), rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 untersucht. Jedes rekombinante Protein wurde in zwei Konzentrationen (2 µg bzw. 6 µg) eingesetzt. Dargestellt sind jeweils Ausschnitte mit den erwarteten Bandenmustern (*). Eine Antikörperreaktion mit rMIC5 präsentiert sich als Proteinbande mit einer Laufhöhe von ca. 26-27 kDa. Die Bewertung von Proteinbanden erfolgte im Vier-Augen-Prinzip nur qualitativ (positiv oder negativ) ohne Kenntnis des Serologiebefundes.

Mit dieser Western Blot-Methode wurden insgesamt 30 Humanseren untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 zusammengefasst. In den durchgeführten Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass in 6 negativen Humanseren (IFT-Titer < 1:16) keine Reaktion von IgG-Antikörpern gegen rGRA1, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 nachgewiesen werden konnte. Nur in einem negativen Serum konnte eine schwach positive Reaktion von IgG-Antikörpern mit rGRA2 detektiert werden (Abbildung 3.4 A).

Die Gruppe von Humanseren mit niedrig positivem IFT-Titer (1:16-1:512) umfasst 13 Proben. In den Analysen aller 13 Proben konnten Reaktionen von IgG-Antikörpern mit rGRA2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 B).

Es folgt der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen rGRA9 mit einer Häufigkeit von 61,5 %, rGRA7 (53,8 %) und MIC5 (53,8 %), sowie rGRA1 (23,1 %).

In der Gruppe mit höher positivem IFT-Titer $\geq 1:512$ wurden 11 Proben analysiert (Abbildung 3.4 C). Hier konnten ebenfalls in den Western Blot-Analysen aller 11 Proben Reaktionen von IgG-Antikörpern mit rGRA2 nachgewiesen werden. Der Nachweis einer Reaktion von IgG-Antikörpern gegen rGRA7 war in 10 Seren möglich (90,9 %), gegen rMIC5 in 7 Seren (63,6 %) und gegen rGRA9 in 6 Seren (54,5 %). Eine Reaktivität mit rGRA1 konnte nur in 2 Proben (18,2 %) detektiert werden.

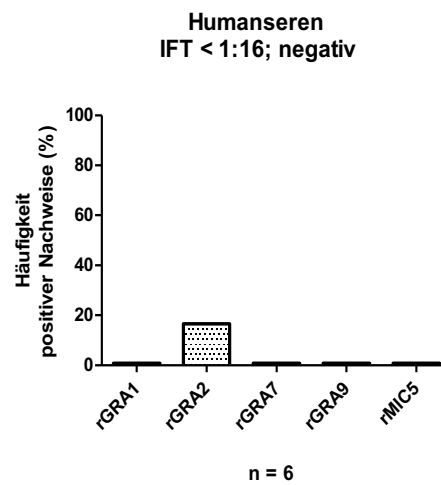
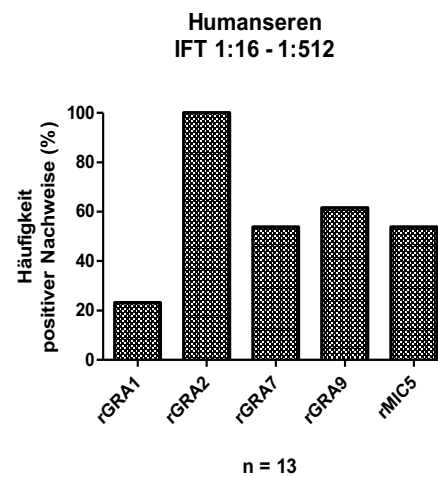
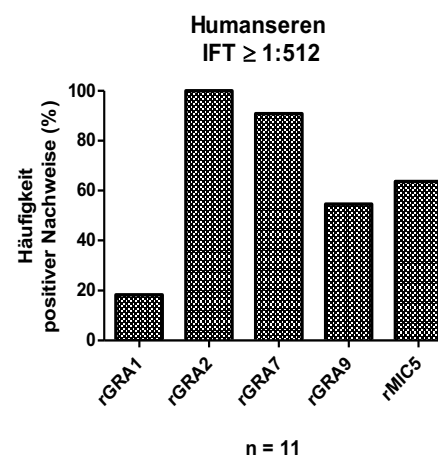
A**B****C**

Abb. 3.4: Häufigkeit der Detektion von IgG-Antikörpern gegen rekombinante Proteine von *T. gondii*. Die Seren stammen von nicht immunisierten Patienten (**A**) bzw. von immunisierten Patienten mit niedrig positivem IFT-Titer 1:16 - 1:512 (**B**) und höher positivem IFT-Titer $\geq 1:512$ (**C**).

3.2.2. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten *T. gondii*-Antigenen

Von den 30 ausgewählten Humanseren wiesen 7 Humanseren einen IgM-positiven Vorbefund auf. Dieser serologische Nachweis von IgM-Antikörpern erfolgte durch *IgM-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Alle 7 Proben haben ebenfalls einen IFT-Titer $\geq 1:16$ für spezifische Antikörper der Klasse IgG.

In 5 von diesen 7 Proben konnten Reaktionen spezifischer Antikörper der Klasse IgM gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* auch in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 3.5).

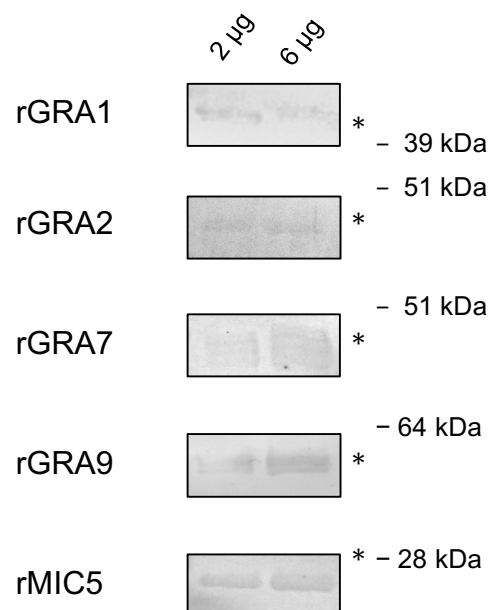


Abb. 3.5: Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten Antigenen von *T. gondii* in Humanseren. Darstellung der Bandenmuster auf der erwarteten Laufhöhe im Western Blot (*). Die Analyse der rekombinanten Antigene erfolgte in 2 unterschiedlichen Konzentrationen (2 µg und 6 µg). Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Dabei konnten in 4 Seren rGRA2-spezifische IgM-Antikörperreaktionen nachgewiesen werden, sowie in jeweils drei Seren eine Reaktivität mit rGRA9 bzw. rMIC5 gezeigt werden. rGRA7-spezifische IgM-Antikörper konnten in 2 Seren, rGRA1-spezifische IgM-Antikörper nur in einem Serum nachgewiesen werden (Tabelle 3.1).

IFT	ELISA IgM	rGRA1	rGRA2	rGRA7	rGRA9	rMIC5
$\geq 1 : 16$	positiv	14,3 %*	57,1 %*	28,6 %*	42,9 %*	42,9 %*

Tabelle 3.1: Nachweis von IgM-Antikörpern gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Humanseren mit IgM-positivem Vorbefund. Es wurden 7 ELISA IgM-positive Humanseren untersucht. In 5 dieser Seren (71,4 %) konnten spezifische Antikörper der Klasse IgM gegen die ausgetesteten rekombinanten Proteine nachgewiesen werden. *Angaben in Bezug auf die 7 untersuchten Seren.

3.3. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Schweineseren

Nachdem ein Nachweis von IgG-Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Seren von seropositiven Patienten durch Western Blot-Analysen möglich war, sollten nun durch die gleiche Methodik Seren von experimentell mit Oozysten infizierten Schweinen untersucht werden.

3.3.1. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgG mit rekombinanten *T. gondii*-Antigenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst getestet, ob ein Nachweis von IgG-Antikörpern in Seren von Schweinen, die experimentell mit 10^3 bzw. 10^5 Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden, möglich ist. Die Seren der beiden mit unterschiedlichen Parasitenmengen infizierten Tiergruppen (je $n = 5$) stammten vom 98. Tag nach der Infektion. Weiterhin wurden 7 Proben von Schweinen vor der Infektion als Negativkontrollen analysiert. Die Proben wurden im Western Blot in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nach der Entwicklung wurden auf der Nitrozellulosemembran deutlich erkennbare Bandenmuster sichtbar, die mit der erwarteten Laufhöhe der eingesetzten rekombinanten Antigene übereinstimmten. Es konnten Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Besonders hervorzuheben ist hierbei der Nachweis von Reaktionen mit rGRA2, rGRA7 und rMIC5, der in allen 10 Seren möglich war. Antikörperreaktionen mit rGRA9 waren in der Gruppe 10^3 Oozysten in 4 von 5

Proben nachweisbar. In der Gruppe 10^5 Oozysten lag die Häufigkeit positiver Nachweise von IgG-Antikörpern gegen rGRA9 bei 100 %. Im ersten Vergleich mit den analysierten Humansenen zeigt sich in den Schweineseren eine insgesamt höhere Reaktivität mit rekombinanten *T. gondii*-Antigenen

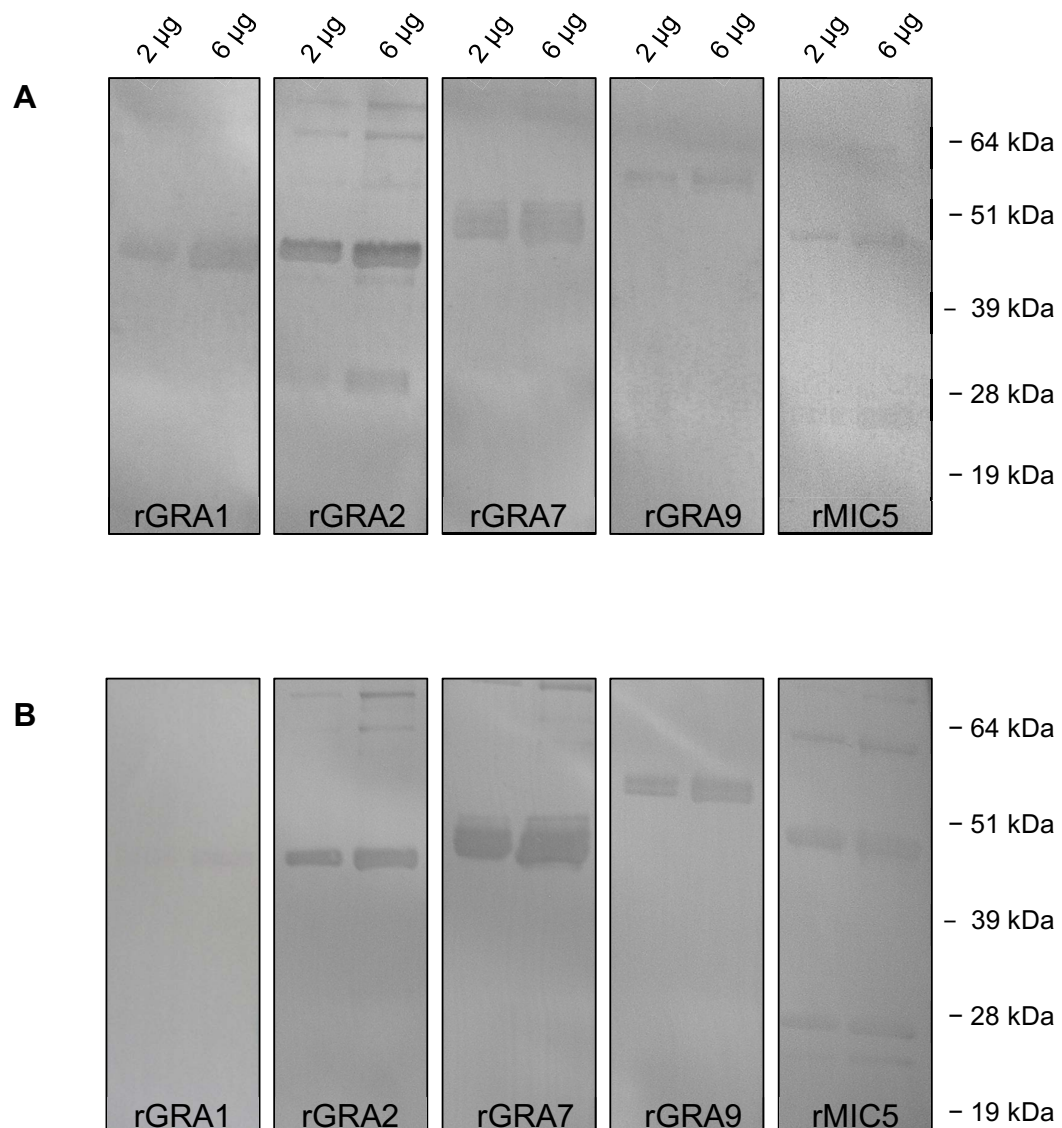


Abb. 3.6: Nachweis der Reaktivität von IgG-Antikörpern mit rekombinanten Proteinen von *T. gondii* in Schweineseren. Es wurden Seren von experimentell mit Oozysten infizierten Schweinen in Western Blot-Analysen untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse mit einem Serum jeweils beispielhaft aus der Gruppe mit der Infektionsdosis 10^3 Oozysten (A) sowie 10^5 Oozysten (B). rGRA2 (45 kDa), rGRA7 (47 kDa), rGRA9 (58 kDa) und rMIC5 (28 kDa) zeigen eine Reaktivität mit IgG-Antikörpern (A + B).

In nur einem Serum aus der Gruppe 10^3 Oozysten konnte eine IgG-Antikörperreaktion mit rGRA1 detektiert werden.

Es konnten keine Reaktionen von IgG-Antikörpern gegen die analysierten rekombinanten Antigenen von *T. gondii* in negativen Seren nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

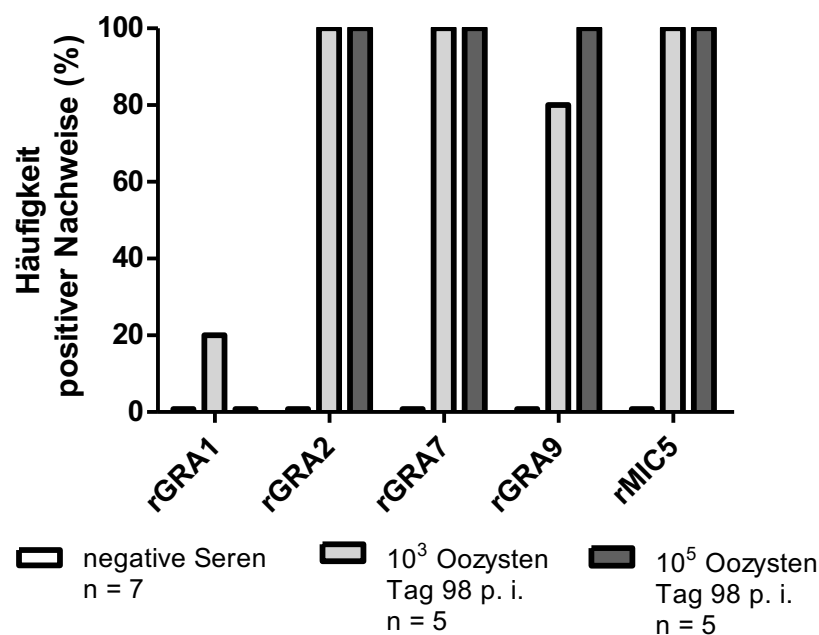


Abb. 3.7: Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Schweineseren durch Western Blot-Analysen. Es wurden Seren von experimentell mit 10^3 bzw. 10^5 Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* infizierten Schweinen (positive Seren) und Seren ante infectionem (negative Seren) untersucht. Positive Seren stammen vom 98. Tag post infectionem (p. i.).

3.3.2. Nachweis der Reaktivität von Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten *T. gondii*-Antigenen

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass eine Reaktion von IgG-Antikörpern gegen rekombinante *T. gondii*-Antigene mittels Western Blot-Analysen in Schweineseren möglich ist, die vom 98. Tag post infectionem (p. i.) stammen. Nun sollte untersucht werden, ob auch spezifische Antikörper der

Klasse IgM in Schweineseren nachweisbar sind, die von frisch infizierten Tieren stammen.

Dazu wurden jeweils 4 Schweineseren vom 14. Tag p. i., 28. Tag p. i., sowie vom 53. Tag p. i. ausgewählt. Diese 12 Seren stammen von Schweinen, die experimentell mit 10^6 Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden.

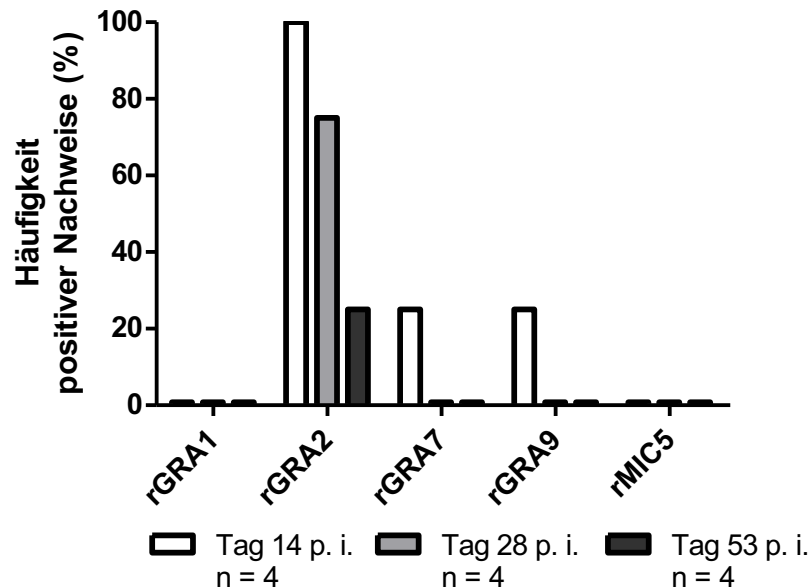


Abb. 3.8: Detektion von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM in Schweineseren mittels Western Blot-Analysen. Die Seren stammen von experimentell mit *T. gondii* infizierten Schweinen 2 Wochen post infectionem (p. i.) (Tag 14 p. i., weißer Balken), 4 Wochen p. i. (Tag 28 p. i., grauer Balken) und 8 Wochen p. i. (Tag 53 p. i., schwarzer Balken).

In allen 4 Seren vom 14. Tag p. i. konnten Reaktionen von IgM-Antikörpern mit rGRA2 in Western Blot-Analysen detektiert werden (100 %). Die Häufigkeit positiver Nachweise von IgM-Antikörpern gegen rGRA2 sinkt mit zunehmender Dauer der Infektion auf 75 % am Tag 28 p. i. bzw. 25 % am Tag 53 p. i. ab (Abbildung 3.8). Weiterhin konnten Reaktionen von IgM-Antikörpern gegen rGRA7 und rGRA9 nachgewiesen werden. Diese Reaktionen konnten jedoch nur in Seren vom Tag 14 p. i. detektiert werden (jeweils ein positiver Nachweis). Es konnte keine Reaktionen von IgM-Antikörpern mit rGRA1 und rMIC5 detektiert werden.

Weiterhin wurden die Schweineseren vom 14. Tag p. i., 28. Tag p. i. und 53. Tag p. i. auch auf Reaktivitäten von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG überprüft. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass an allen Zeitpunkten

nach der Infektion IgG-Antikörper gegen die rekombinanten Antigene rGRA2, rGRA7 und rGRA9 nachweisbar waren (100 %). Auch IgG-Antikörper gegen rMIC5 konnten in 75 % nachgewiesen werden. In keinem Schweineserum konnten rGRA1-spezifische IgG-Antikörper detektiert werden.

3.4. Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Mausseren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 51 Seren von experimentell mit *T. gondii* infizierten Mäusen analysiert.

Die Mausseren wurden entsprechend ihrer Verwendung in dieser Arbeit in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 2.4). Zunächst sollte untersucht werden, ob der Nachweis einer Reaktion von IgG-Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* mit Western Blot-Analysen möglich ist. Dazu wurden Seren von BALB/c-Mäusen (Gruppe A), sowie von C57BL/6-Mäusen (Gruppe C) verwendet. Teilweise wurden die Ergebnisse mit densitometrischen Methoden quantifiziert. Es ist nochmals hervorzuheben, dass die ECL-Entwicklung der Western Blots aus Gründen der Vergleichbarkeit für die densitometrische Auswertung untereinander jeweils genau 10 Sekunden dauerte.

Außerdem wurde die Entwicklung von Antikörpern im Verlauf einer *T. gondii*-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Diese Seren wurden auf IgM-Antikörper gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* untersucht (Gruppe B).

3.4.1. IgG-Antikörperreaktionen gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Seren von BALB/c- und BALB/c-IDO-*knockout*-Mäusen

Zunächst wurden 10 Seren von Mäusen analysiert, die experimentell mit 10^4 Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden. Die Seren stammen von Wildtyp-BALB/c-Mäusen (n = 5) und von IDO-*knockout*-Mäusen

(n = 5). Außerdem wurden als Negativkontrollen Seren von Mäusen analysiert, die mit PBS immunisiert wurden (n = 8).

Die Ergebnisse einer Western Blot-Analyse sind in Abbildung 3.9 beispielhaft anhand des Serums einer BALB/c-Wildtyp-Maus dargestellt. Hier zeigen sich Bandenmuster, die mit der erwarteten Laufhöhe der jeweiligen untersuchten rekombinanten Proteine übereinstimmen. Gegen die Antigene rGRA2 (45 kDa) und rGRA7 (47 kDa) konnten deutliche Antikörperreaktionen detektiert werden. Außerdem wurden schwach positive Reaktivitäten gegen rGRA1 (40 kDa) und rGRA9 (58 kDa) registriert. Es konnte keine rMIC5-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

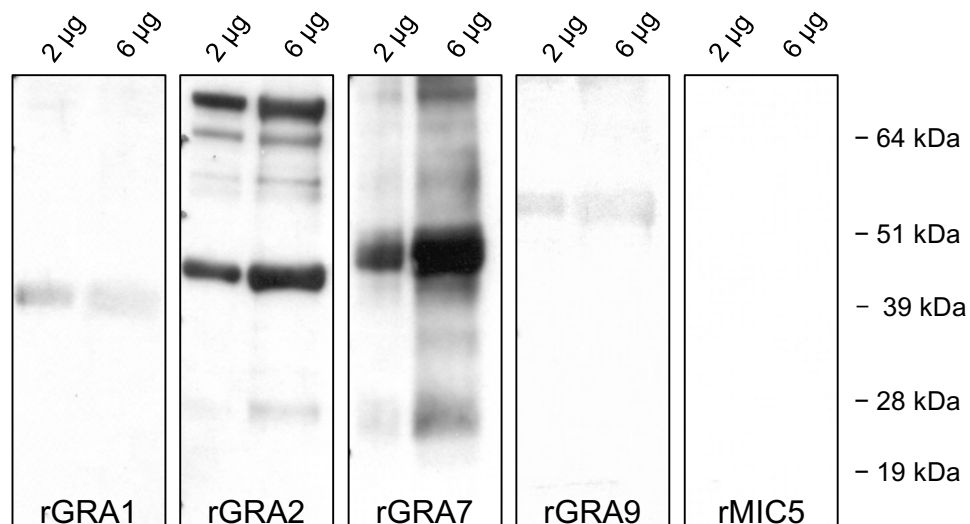


Abb. 3.9: Beispielhafte Darstellung der Detektion spezifischer Antikörper der Klasse IgG gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Mausseren. Das Serum (147 Tage post infectionem) stammt von einer BALB/c-Maus, die experimentell mit 10^4 Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurde. Die rekombinanten Proteine wurden jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen (2 µg und 6 µg) eingesetzt. Das Mausserum wurde in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Um die Antikörperreaktion zu detektieren, wurde ein horseradish-peroxidase- (HRPO) konjugierter Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:5000 eingesetzt.

In den durchgeführten Western Blot-Analysen konnten Reaktivitäten von IgG-Antikörpern gegen rGRA2 und rGRA7 in allen 10 Seren von BALB/c- und IDO^{-/-}-Tieren nachgewiesen werden (100 %). Antikörperreaktionen mit rGRA9 konnten in jeweils 4 Seren von Wildtyp-, als auch von IDO^{-/-}-Mäusen detektiert werden (80 %). Es konnten ebenfalls Reaktivitäten von IgG-Antikörpern mit rGRA1

nachgewiesen werden. Die Häufigkeit positiver Nachweise beträgt hier 20 % (WT) bzw. 40 % (IDO^{-/-}).

In den negativen Kontrollseren konnten keine Reaktivitäten von IgG-Antikörpern mit den rekombinanten Proteinen detektiert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blot-Analysen sind zusammenfassend in Abbildung 3.10 dargestellt.

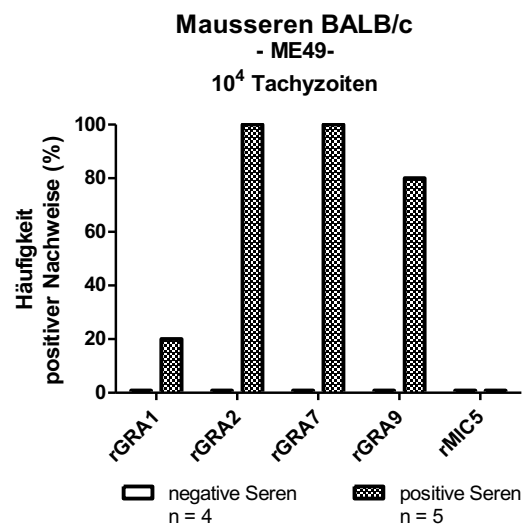
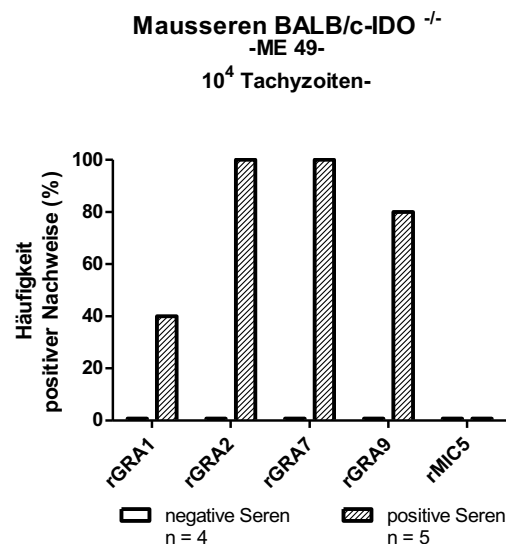
A**B**

Abb. 3.10: Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Seren von experimentell mit ME49-Tachyzoiten infizierten Mäusen. Es wurden Seren von Mäusen des BALB/c-Stamms (A), bzw. von BALB/c-IDO^{-/-}-Mäusen (B) im Western Blot-Verfahren analysiert. Die Seren stammen von Mäusen, die mit PBS immunisiert wurden (negative Seren) und von Mäusen, die experimentell mit 10⁴ Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden (positive Seren).

3.4.2. Quantitative Erfassung von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern in Seren von Wildtyp- und IDO^{-/-}- Mäusen mittels Western Blot-Analysen

Es sollte mit Western Blot-Analysen untersucht werden, ob durch einen gezielten IDO-*knockout* die humorale Immunantwort gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* in Mäusen beeinflusst wird. Dazu wurden die bereits analysierten positiven Seren von Wildtyp- und IDO^{-/-}-Mäusen (Gruppe A) weiter ausgewertet. Diese Proben (jeweils n = 5) stammen von Tieren, die mit 10⁴ Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden. Es konnte hier bereits während der ersten Auswertung der Western Blots festgestellt werden, dass sichtbare Unterschiede in der Intensität der detektierten Proteinbanden zwischen den beiden Gruppen vorliegen (Abbildung 3.11).

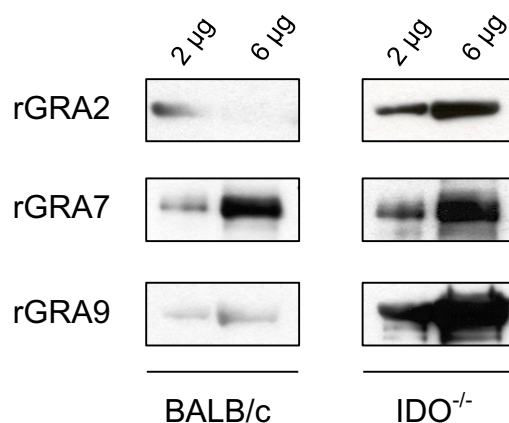


Abb. 3.11: Unterschiede der Bandenintensität in Western Blot-Analysen von Wildtyp- und IDO^{-/-}-Mausseren. Erkennbar ist die unterschiedlich starke Reaktivität von IgG-Antikörpern mit rGRA2 (45 kDa), rGRA7 (47 kDa) und rGRA9 (58 kDa) aus Seren einer BALB/c-Wildtyp- und einer IDO^{-/-}-Maus. Die Seren stammen von Tieren, die experimentell mit 10⁴ Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden (Seren vom 41. Tag post infectionem).

In dem Vergleich der Western Blot-Analysen zeigte sich, dass IgG-Antikörpernachweise gegen die rekombinanten Proteine in Seren von IDO^{-/-}-Mäusen eine stärkere Farbintensität aufweisen. Im nächsten Schritt sollte dieser Intensitätsunterschied mittels Densitometrie quantifiziert werden. Dazu wurde die Farbdichte der einzelnen Banden bestimmt. Alle gemessenen absoluten Werte wurden zwecks Kalibrierung zunächst mit den Werten der jeweiligen negativen Referenzprobe verrechnet.

Die Intensitätswerte der positiven IgG-Antikörpernachweise in IDO^{-/-}-Seren wurden dann auf die Werte der jeweiligen Probe von Wildtyp-Mäusen bezogen.

Dabei wurden die densitometrischen Messergebnisse der Wildtyp-Proben als Bezugswert mit 100 % festgelegt (Abbildung 3.12).

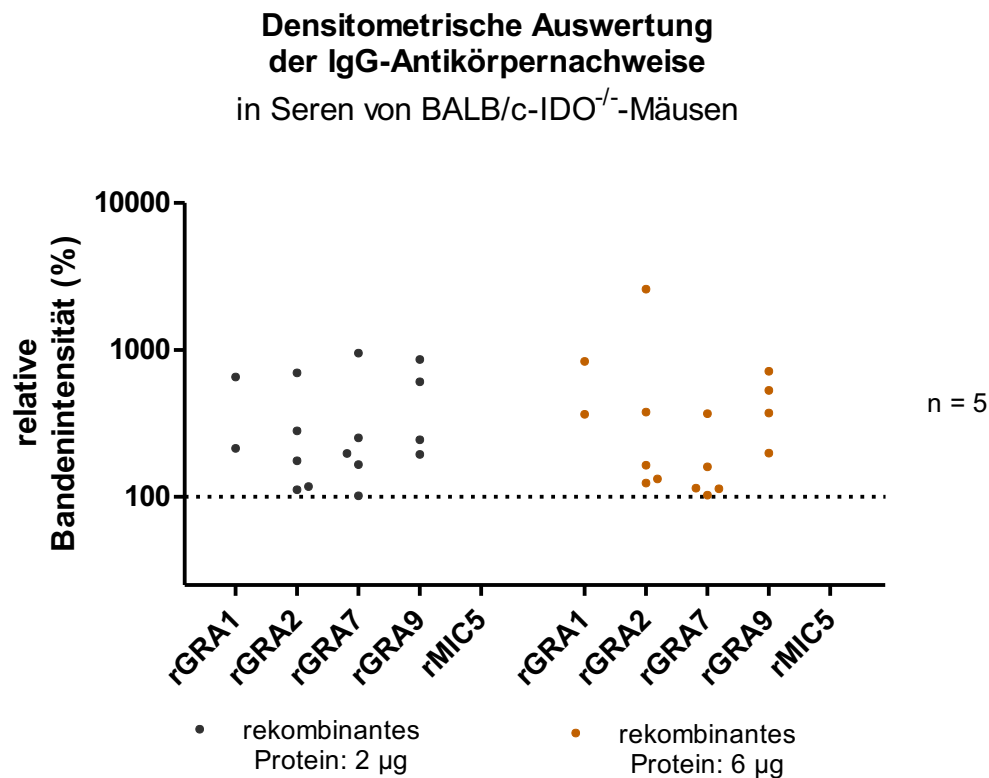


Abb. 3.12: Densitometrische Auswertung der IgG-Antikörperrnachweise in Seren von BALB/c-IDO^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist die Bandenintensität der positiven Nachweise in Bezug zu der Farbdichte der jeweiligen Wildtyp-Probe. Für diese Darstellung wurden die densitometrischen Ergebnisse der Wildtyp-Proben mit 100 % jeweils als Bezugswert festgelegt. Die Auswertung wurde für die beiden analysierten Konzentrationen der rekombinanten Proteine (2 µg und 6 µg) getrennt durchgeführt. Es konnten keine IgG-Antikörperrnachweise gegen rMIC5 detektiert werden.

Die densitometrische Auswertung zeigt, dass in Seren von IDO^{-/-}-Mäusen eine stärkere Reaktivität von IgG-Antikörpern mit rekombinanten Proteinen nachweisbar ist, als in Seren von Wildtyp-Mäusen. Der Unterschied in der Reaktivität ist durch die Densitometrie quantifizierbar. Es kann festgestellt werden, dass die Farbdichte der Proteinbanden von Wildtyp-Proben nicht unterschritten wird. Am Beispiel von rGRA7 konnte gezeigt werden, dass Werte zwischen 101,21 % und 949,61 % erreicht werden (2 µg rekombinantes Protein). Weiterhin wurden bei dem Einsatz von 6 µg rGRA7 Werte von 102,41 % bis 368,15 % gemessen.

Da wie in Abbildung 3.10 gezeigt, konnten in allen Seren rGRA2- und rGRA7-spezifische IgG-Antikörper detektiert werden (Häufigkeit positiver Nachweise 100 %). Daher wurden nur die Datensätze von rGRA2 und rGRA7 in die folgenden Berechnungen mit einbezogen. Es wurde nun mit Hilfe des Standard t-Tests berechnet, ob der Unterschied der Bandenintensität signifikant ist (Abbildung 3.13).

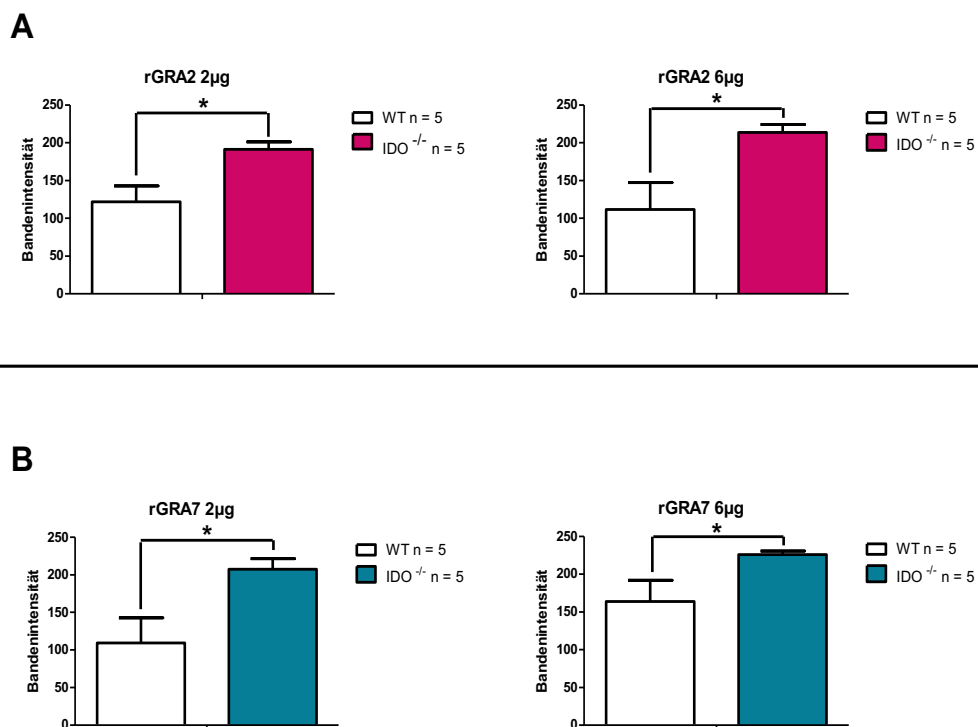


Abb. 3.13: Quantitativer Vergleich der Antikörperproduktion gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* mittels Densitometrie. Es wurden jeweils 5 Seren von BALB/c-Mäusen (Wildtyp; WT) und IDO-*knockout*-Mäusen (IDO^{-/-}; auf der Basis von BALB/c-Mäusen) untersucht. Die Seren stammen vom 147., 41., 28., und 11. Tag post infectionem. Die rekombinanten Proteine rGRA2 (A) und rGRA7 (B) wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen (2 µg und 6 µg) eingesetzt. *p < 0,05; (Mittelwert und SEM)

Der Unterschied der Intensität positiver Nachweise von IgG-Antikörpern gegen rGRA2 und rGRA7 im Vergleich von WT- mit IDO^{-/-}-Proben ist signifikant (p < 0,05). Das konnte für beide eingesetzten Proteinkonzentrationen (2 µg und 6 µg) gezeigt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass in den 5 untersuchten Seren von IDO^{-/-}-Mäusen eine signifikant vermehrte IgG-Antikörpermengung gegen rGRA2 und rGRA7 vorliegt.

3.4.3. Humorale Immunantwort in Mäusen nach oraler Infektion mit *T. gondii*-Zysten

Die bisher durchgeführten Experimente mit Mausseren haben sich auf die Detektion von Antikörperreaktionen konzentriert, die im Verlauf einer Infektion mit Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* nachweisbar sind. Es wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob auch Mäuse, die mit Zysten infiziert wurden, Antikörper gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* entwickeln. Dazu wurden Seren von BALB/c-Wildtyp- (n = 2) und von BALB/c-IDO^{-/-}-Mäusen (n = 2) analysiert, die experimentell mit 40 Zysten des ME49-Stamms von *T. gondii* oral infiziert wurden. Als negative Referenzprobe diente jeweils das Serum einer Maus, die mit PBS immunisiert wurde. Die Seren stammen vom 90. Tag p. i.

In beiden Negativkontrollen von nicht infizierten Tieren konnten keine *T. gondii*-spezifischen Antikörper gegen die untersuchten rekombinanten Antigene detektiert werden. Jedoch konnten in der Analyse von Proben infizierter Tiere IgG-Antikörper gegen rGRA1, rGRA2, rGRA7 und rGRA9 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Auffällig ist, dass die Banden in den Western Blot-Analysen der Seren von IDO^{-/-}-Mäusen deutlich stärker angefärbt sind, als die der Wildtyp-Seren. Da allerdings für diese Experimente nur jeweils zwei Seren zur Verfügung standen, wurde eine detaillierte quantitative Bestimmung nicht durchgeführt. Die deutlichere Anfärbung der Banden aus den Analysen deutet daraufhin, dass IDO-defiziente Tiere nach Infektion eine stärkere humorale Immunantwort aufweisen. Das stimmt gut mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.13 überein.

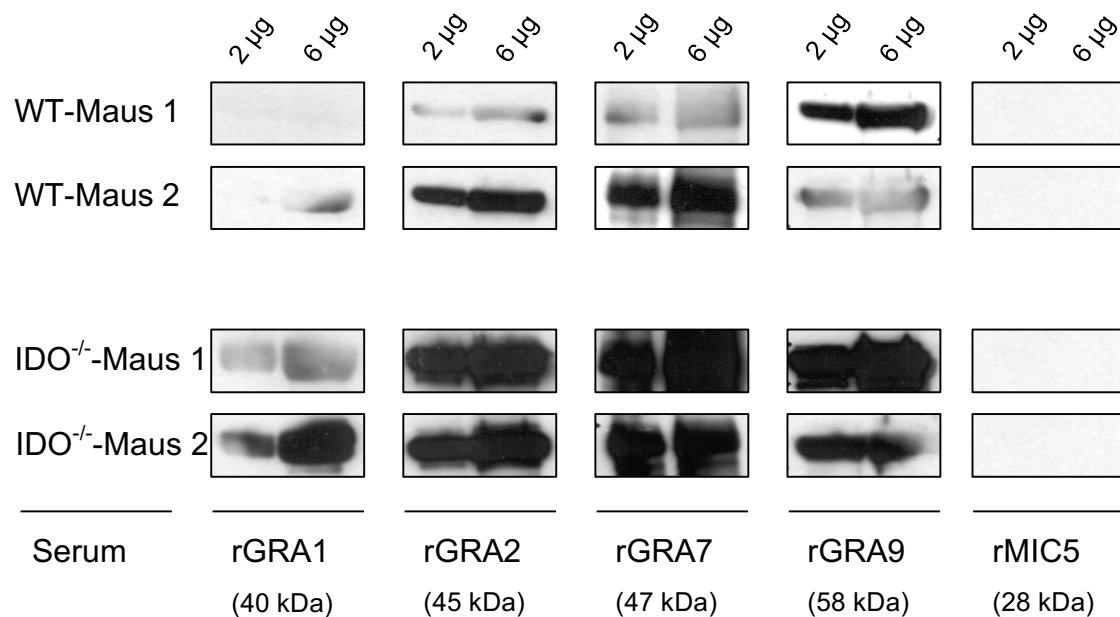


Abb. 3.14: Positive Nachweise von IgG-Antikörperreaktionen gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Seren von Mäusen, die mit Zysten infiziert wurden. Die Seren stammen von BALB/c- (Wildtyp; WT) bzw. von IDO-*knockout*-Mäusen (IDO^{-/-}; auf der Basis von BALB/c-Mäusen), die experimentell mit 40 Zysten des ME49-Stamms von *T. gondii* oral infiziert wurden. Die Seren stammen vom 90. Tag p. i. und wurden im Western Blot in einer Konzentration von 1:1000 analysiert. Zur Detektion der Antikörperreaktionen wurde ein HRPO-gekoppelter Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Die rekombinanten Antigene wurden in 2 Konzentrationen (2 µg und 6 µg) eingesetzt. Es konnten keine positiven IgG-Antikörperrnachweise gegen rMIC5 detektiert werden.

3.4.4. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgM in Seren von Mäusen, die mit Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden

In den bisherigen Experimenten der vorliegenden Arbeit konnten durch Western Blot-Analysen IgG-Antikörperreaktionen mit rekombinanten Antigenen von *T. gondii* in Seren von BALB/c- bzw. IDO^{-/-}-Mäusen detektiert werden. Diese Seren wurden zwischen dem 11. Tag und dem 147. Tag p. i. gewonnen. Bereits am 11. Tag p. i. konnten positive IgG-Antikörperrnachweise erbracht werden.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob eine Detektion von Antikörpern der Klasse IgM in Seren von frisch infizierten Mäusen möglich ist. Dazu wurden 5 Seren von C57BL/6-Mäusen (Gruppe B) vom Tag 5 bis 14 p. i. gewonnen (infiziert mit Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii*). Als Kontrolle wurden 2 Seren vom 84. Tag p. i. gewonnen. Weiterhin wurden 4 Seren von Mäusen untersucht, die mit PBS infiziert wurden (Negativkontrolle).

Tag p. i. (Infektion)	<u>rGRA1</u>		<u>rGRA2</u>		<u>rGRA7</u>		<u>rGRA9</u>		<u>rMIC5</u>	
	WT	IDO ^{-/-}	WT	IDO ^{-/-}	WT	IDO ^{-/-}	WT	IDO ^{-/-}	WT	IDO ^{-/-}
5 (PBS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 (10 ⁴)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5 (10 ⁴)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
7 (PBS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (10 ⁴)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
7 (10 ⁴)	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
14 (10 ⁴)	x	+	x	+	x	+	x	+	x	+
84 (10 ⁴)	x	-	x	+	x	+	x	+	x	+
84 (10 ⁵)	x	-	x	-	x	-	x	-	x	-

Tabelle 3.2: Übersicht über die positiven IgM-Antikörpernachweise in Mausseren. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus Western Blot-Analysen der Seren von C57BL/6-Mäusen (Wildtyp; WT) bzw. von IDO^{-/-}-Mäusen (auf der Basis einer C57BL/6-Maus). Die Seren stammen vom 5., 7., 14., und 84. Tag post infectionem (p. i.). Es wurden Seren von Mäusen analysiert, die experimentell mit 10⁴ bzw. 10⁵ Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden. Als Negativkontrolle standen Proben von Mäusen zur Verfügung, die mit PBS immunisiert wurden. Nicht vorhandene Proben wurden als solche markiert (x). Angaben zur Auswertung der Western Blots: kein Nachweis (-); positiver Nachweis (+) einer Reaktion von spezifischen Antikörpern der Klasse IgM mit rekombinanten Antigenen von *T. gondii*.

Zusammenfassend lässt sich hier zeigen, dass auch IgM-Antikörper überwiegend gegen die Antigene rGRA2 und rGRA7 gebildet werden und hauptsächlich in der frühen Phase der Infektion nachweisbar sind.

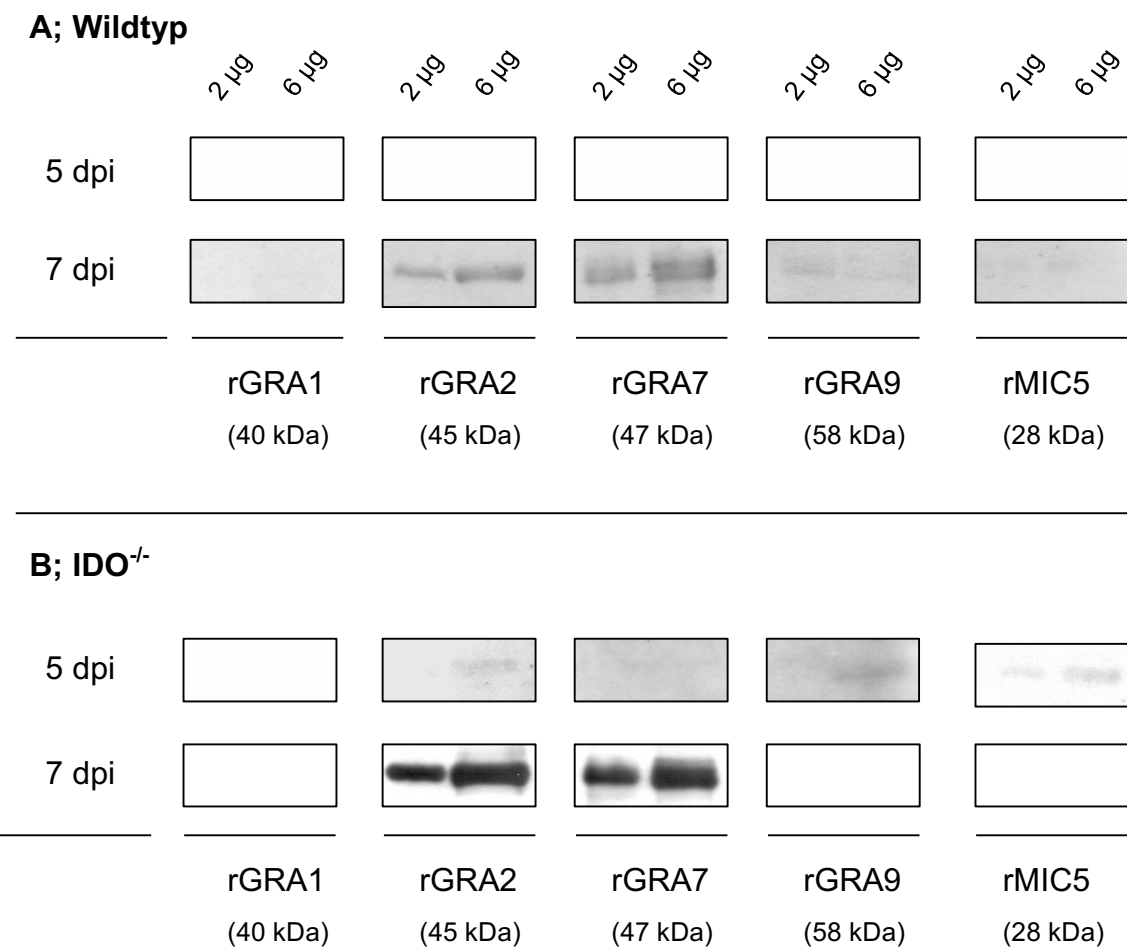


Abb. 3.15: Nachweise von IgM-Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Mausseren. Die Seren stammen von C57BL/6-Mäusen (A) und von IDO^{-/-}-Mäusen (auf der Basis einer C57BL/6-Maus; (B)), die experimentell mit 10⁴-Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden. Die Seren wurden am 5. und 7. Tag post infectionem (dpi) gewonnen. In den Western Blot-Analysen wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der HRPO-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Die rekombinanten Antigene wurden in 2 verschiedenen Konzentrationen (2 µg und 6 µg) eingesetzt.

Bei der Analyse der Daten in Abbildung 3.15 fällt erneut auf, dass die Seren von IDO^{-/-}-Tieren eine stärkere Reaktion mit den rekombinanten Antigenen aufweisen als die Seren von Wildtyp-Tieren.

3.4.5. Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG in Seren von Mäusen, die mit Tachyzoiten des TS4-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden

In den bisherigen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden Seren von Mäusen analysiert, die experimentell mit Tachyzoiten oder Zysten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden. ME49-Toxoplasmen gehören zu den sogenannten Typ II-Stämmen, die eine moderate Virulenz aufweisen. Es war jedoch zusätzlich von Interesse, wie die humorale Immunantwort gegen hochvirulente Typ I-Stämme verläuft. Da Mäuse eine Infektion mit dem Typ I-Stamm RH nur maximal 10 Tage überleben, wurde ein gentechnisch verändertes Isolat des RH-Stamms verwendet. Dieser TS4-Stamm ist eine temperatursensitive RH-Mutante, die sich bei Körpertemperatur nur noch schlecht vermehren kann. Daher ist dieser Stamm nicht mehr virulent und kann sogar in Immunisierungsmodellen verwendet werden (McLeod, Frenkel *et al.* 1988).

In den folgenden Western Blot-Analysen wurden Seren von BALB/c- bzw. von C57BL/6-Mäusen untersucht, die experimentell mit 10^5 Tachyzoiten des TS4-Stamms von *T. gondii* infiziert wurden.

Die Seren stammen von den Tagen 48, 97 und 104 p. i. (je $n = 1$). Weiterhin standen 6 Proben von Mäusen zur Verfügung, die mit PBS immunisiert wurden. In den durchgeführten Western Blot-Analysen der negativen Kontrollseren konnten wie erwartet keine IgG-Antikörperreaktionen mit den eingesetzten rekombinanten Antigenen von *T. gondii* detektiert werden (Abbildung 3.16). Es konnten jedoch spezifische IgG-Antikörper gegen rGRA2 und rGRA7 in allen Proben von infizierten Mäusen nachgewiesen werden (Häufigkeit positiver Nachweise rGRA2 und rGRA7: 100 %). Es wurden außerdem nur in jeweils einem positiven Serum Reaktionen von IgG-Antikörpern mit rGRA1 und rGRA9 detektiert. Gegen rMIC5 konnten keine Reaktionen von Antikörpern der Klasse IgG detektiert werden. Ferner gab es keine Unterschiede zwischen infizierten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Damit ist das Erkennungsmuster ähnlich dem in den Infektionsmodellen mit ME49-Tachyzoiten.

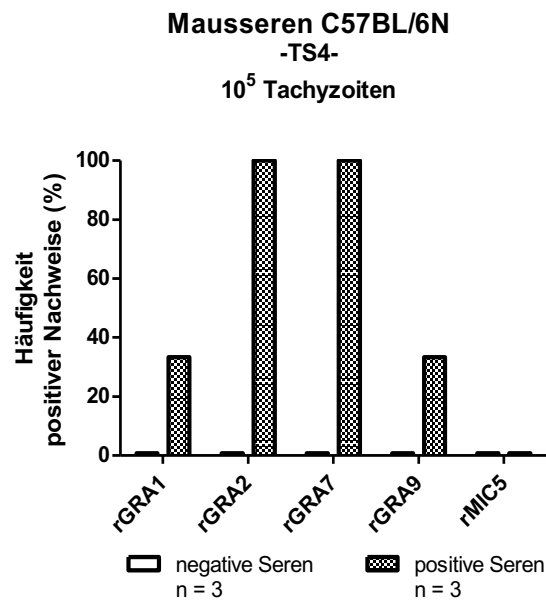
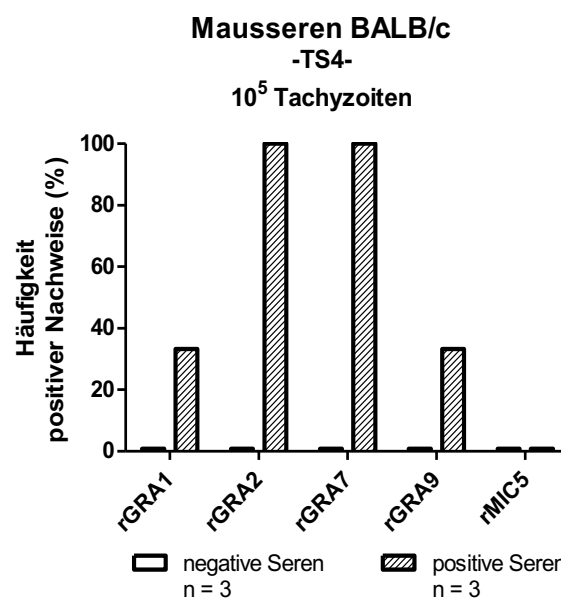
A**B**

Abb. 3.16: Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG in Seren von experimentell mit TS4-Tachyzoiten infizierten Mäusen. Dargestellt ist die Häufigkeit positiver Nachweise von IgG-Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *T. gondii* in Western Blot-Analysen. Die untersuchten Seren stammen von C57BL/6- (A) bzw. von BALB/c-Mäusen (B). Die Tiere wurden experimentell mit 10^5 Tachyzoiten des avirulenten TS4-Stamms von *T. gondii* infiziert und stammen von den Tagen 48, 97 und 104 p. i (je $n = 1$).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Western Blot-Analysen Reaktionen von spezifischen Antikörpern der Klassen IgM und IgG mit rekombinanten Antigenen von *T. gondii* nachzuweisen. Dazu wurden Seren von drei verschiedenen Spezies Mensch, Schwein und Maus untersucht. Es erfolgt zunächst eine speziesvergleichende Gegenüberstellung und Diskussion der Ergebnisse. Dabei wurden die positiven IgG-Antikörpernachweise für einen Interspezies-Vergleich berücksichtigt. Es wurden speziesübergreifende Gemeinsamkeiten, aber auch speziesspezifische Merkmale deutlich.

Mittels Western Blot-Analysen der Mausseren wurde zusätzlich untersucht, ob ein gezielter *IDO-knockout*, der zum Ausfall des immunregulatorischen Effektormechanismus führt, sich auf die Antikörperproduktion auswirkt. Die erhobenen Daten und Beobachtungen werden ebenfalls im Folgenden diskutiert.

4.1. Diskussion der Methoden

Zur Durchführung konventioneller Methoden zur Diagnose der Toxoplasmose werden typischerweise komplette Parasiten, Parasitenlysate oder gereinigte Antigene verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit rekombinant hergestellten Antigenen gearbeitet und das Prinzip der Western Blot-Analysen angewendet.

4.1.1. Western Blot-Analysen

Das klassische Western Blot-Verfahren beruht auf der Detektion einer Immunreaktion von Antikörpern mit immundominanten Proteinen, die vorher ihrer Größe nach im SDS-Gel aufgetrennt wurden. Daher weist der klassische Western Blot im Vergleich zu ELISA-Verfahren eine deutlich höhere Spezifität auf. Die denaturierte Aufreinigung der rekombinanten Proteine und die

Herstellung von Blot-Membranen ist ein zeitaufwändiger und kostenintensiver Prozess, sodass das Prinzip der Western Blot-Analysen trotz der hohen Sensitivität und Spezifität für die Routinediagnostik einer Toxoplasmose in den Hintergrund rückt.

In den Western Blot-Analysen dieser Arbeit kamen Human-, Schweine- oder Mausseren als Primärantikörper zum Einsatz. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht. Daher ist die klassische Western Blot-Methode nicht zur Schnell Diagnostik geeignet. Pro Blot-Membran konnten gemeinsam mit der Größenkontrolle bis zu drei rekombinante Antigene analysiert werden. Daher kamen mindestens zwei NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gele zur Analyse je eines Serums und je einer Antikörperklasse zum Einsatz. Daher ist das hier durchgeführte klassische Western Blot-Verfahren mit einem hohen Materialaufwand verbunden. In Bezug auf die Praktikabilität in der Analyse größerer Probenzahlen stellt das Line Blot-Verfahren eine mögliche Alternative dar.

Der Line Blot-Assay zur Detektion von Antikörpern gegen rekombinante Antigene in Seren von experimentell mit *T. gondii* infizierten Hühnern und Truthähnen wurde in einer Studie 2014 untersucht (Hotop, Buschtons *et al.* 2014).

Der Vorteil einer Verwendung des Line Blot-Assays liegt auf der einen Seite darin, eine größere Anzahl von Antigenen in einem Arbeitsschritt zu analysieren. Auf der anderen Seite fehlt bei Line Blot-Analysen im Vergleich zu dem klassischen Western Blot-Verfahren die Größenkontrolle der analysierten Antigene. Beim Line-Blot werden die Antigene direkt auf die Blot-Membran aufgetragen. Die Spezifität der Reaktion ist daher vom Reinheitsgrad des verwendeten Antigens abhängig und folglich geringer als im klassischen Western Blot-Verfahren nach der Größenseparation. In Western Blot-Analysen lassen sich Ergebnisse außerdem schnell und direkt über ein Bandenmuster visualisiert darstellen.

4.1.2. Die Produktion rekombinanter Proteine von *T. gondii*

Zur Diagnostik der Toxoplasmose werden vielfach ganze Erregerlysate oder aufgereinigte Proteine verwendet. Vorteil dabei ist, dass die Antigene häufig in ihrer nativen Konformation und dem physiologischen Glykosylierungszustand vorliegen. Der Nachteil ist, dass sich bei verschiedenen Chargen quantitative Unterschiede bei der Zusammensetzung der Antigene kaum vermeiden lassen. Daher werden in der Diagnostik zunehmend häufig rekombinante Antigene eingesetzt, die sich in großen Mengen bei gleichbleibender Qualität vergleichsweise kostengünstig produzieren lassen.

In der Literatur sehr verbreitet ist die Beschreibung des Oberflächen Antigens SAG1 von *T. gondii*. SAG1, vormals als P30 bezeichnet, ist ein Antigen von *T. gondii*, dessen immunogene Eigenschaften bereits in vielen Testsystemen ausgenutzt wurden. Die immunogenen Eigenschaften von SAG1 sind jedoch von der korrekten Faltung des Proteins abhängig (Chen, Gong *et al.* 2001). Aufgrund dieser Konformationsspezifität kann die Immunogenität von SAG1 eingeschränkt sein, solange es in der denaturierten Form fehlgefaltet vorliegt. Einige in *E. coli* exprimierte rekombinante SAG1-Varianten zeigten eine eingeschränkte Verwendungsmöglichkeit aufgrund inkorrektter Faltung, bei der Disulfid-Brücken eine besondere Bedeutung in der Bildung antigenen Determinanten spielen (Burg, Perelman *et al.* 1988).

Daher konzentrierten wir uns in der vorliegenden Arbeit auf die Herstellung und Verwendung von anderen Antigenen, die ebenfalls immunogene Eigenschaften aufweisen. In dieser Arbeit werden die rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 untersucht. Insbesondere für GRA1 (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989; Pietkiewicz, Hiszczynska-Sawicka *et al.* 2004), GRA2 (Prince, Araujo *et al.* 1989; Murray, Mercier *et al.* 1993), GRA7 (Jacobs, Dubremetz *et al.* 1998; Jacobs, Vercammen *et al.* 1999; Velmurugan, Tewari *et al.* 2008) und GRA9 (Holec-Gasior, Ferra *et al.* 2014) gibt es bereits Studien, die die Aufreinigung dieser rekombinanten Proteine von *T. gondii* und deren Einsatz zur serologischen Diagnostik in humanen oder tierischen Proben beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Produktion größerer Mengen rekombinanter Proteine zur Verwendung in Western Blot-Analysen. Hier wurde als Expressionsorganismus der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm BL21 verwendet. Doch nicht nur *E. coli* kann als Expressionsorganismus für rekombinante Proteine verwendet werden, sondern auch *S. cerevisiae* aus der Gattung der Zuckerhefen oder das *Baculovirus*, das als DNA-Virus Wirbellose (Invertebrata) befällt.

Nach Einbringung des Zielgens in einen pET-32a(+)-Vektor ist die Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* möglich. Mit dem His-Tag[®] und weiteren N-terminal gelegenen Tags in dem Fusionsprotein ist eine affinitätschromatographische Aufreinigung möglich. Die Methode, über eine Affinitätschromatographie-Säule größere Mengen rekombinanter His₆-Fusionsproteine von *T. gondii* auch für Western Blot-Analysen zu produzieren, wurde bereits 2003 von Hisczynska-Sawicka *et al.* beschrieben (Hisczynska-Sawicka, Brillowska-Dabrowska *et al.* 2003). Hisczynska-Sawicka *et al.* verwendete keinen Trx-Tag, der normalerweise die Löslichkeit der Proteine unterstützt und erhöht. In der vorliegenden Arbeit aber war der Trx-Tag Teil des Fusionsproteins. Velmurugan *et al.* (2008) verwendete ebenfalls erfolgreich einen Trx-Tag bei der Produktion von rekombinanten Antigenen für Western Blot-Analysen (Velmurugan, Tewari *et al.* 2008).

4.2. Bedeutung einzelner rekombinanter Antigene zur Serodiagnostik einer Toxoplasmose

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Antigene rGRA1, rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 wurden von verschiedenen seropositiven Individuen in unterschiedlicher Häufigkeit als immundominante Antigene erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammenfassend dargestellt. Insbesondere die Antigene rGRA2 und rGRA7 scheinen nach diesen Daten besonders gut geeignet zu sein, eine Toxoplasmose im Western Blot-Verfahren zu diagnostizieren.

rekombinante Antigene	<u>Mensch</u>		<u>Schwein</u>		<u>Maus</u>	
	n = 13 IFT 1:16 – 1:512	n = 11 IFT ≥ 1:512	n = 5 ELISA positiv 10 ³ Oozysten	n = 5 ELISA positiv 10 ⁵ Oozysten	n = 5 WT, ME49 10 ⁴ Tachyzoiten	n = 5 IDO ^{-/-} , ME49 10 ⁴ Tachyzoiten
rGRA1	23,1 %	18,2 %	20 %	0 %	20 %	40 %
rGRA2	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
rGRA7	53,8 %	90,9 %	100 %	100 %	100 %	100 %
rGRA9	61,5 %	54,5 %	80 %	100 %	80 %	80 %
rMIC5	53,8 %	63,6 %	100 %	100 %	0 %	0 %

Tabelle 4.1: Vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse aus den durchgeführten Western Blot-Analysen von Human-, Schweine-, und Mäusseren. Es wurden Humanseren mit einem Immunfluoreszenz-Titer (IFT-Titer) > 1:16, Schweineseren mit ELISA positivem Vorbefund und experimentell mit ME49-Tachyzoiten infizierte Mäusseren berücksichtigt. WT, Wildtyp; IDO^{-/-}, IDO-knockout-Maus auf Basis einer BALB/c-Maus

4.2.1. GRA2 und seine Bedeutung in der humoralen Immunantwort gegen *T. gondii*

Es ist besonders hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit eine IgG-Antikörperreaktion gegen rGRA2 in allen untersuchten positiven Humanseren und allen Proben von experimentell infizierten Schweinen und Mäusen nachgewiesen werden konnte.

Es konnten insbesondere auch in allen analysierten Humanseren mit niedrigem IFT-Titer (IFT 1:16-1:512) rGRA2-spezifische IgG-Antikörper detektiert werden. Diese Nachweishäufigkeit von 100 % konnte mit den anderen getesteten rekombinanten Antigenen in Western Blot-Analysen nicht erreicht werden.

Die Nachweishäufigkeit von rGRA2-spezifischen IgG-Antikörpern in Western Blot-Analysen ist in einer Studie von Ching *et al.* (2013) ebenfalls untersucht worden. Dort wurde eine Detektionshäufigkeit von 65,1 % in Seren von Patienten mit einer chronischen Infektion angegeben (Ching, Lau *et al.* 2013). In derselben Studie konnte jedoch auch eine Nachweishäufigkeit von 100 % in Seren mit IgM-positivem Vorbefund ermittelt werden (Ching, Lau *et al.* 2013). Rekombinantes GRA2 wurde daher in dieser Studie als ein geeignetes Protein für die Diagnose einer akuten Toxoplasmose beim Menschen beschrieben.

In einer weiteren, jedoch ELISA-basierten Studie von Holec-Gasior *et al.* (2009) unter Verwendung des Volllängen GRA2 Proteins, wurden ebenfalls IgG-Antikörper gegen rGRA2 in Serumproben mit einem positiven IgM-Antikörpernachweis detektiert (Holec-Gasior, Kur *et al.* 2009). In IgM negativen Proben hingegen war die Nachweishäufigkeit von GRA2-spezifischen IgG-Antikörpern mit 22,5 % jedoch niedriger (Holec-Gasior, Kur *et al.* 2009). Die im Vergleich zu dieser Arbeit niedrigere Detektionsrate in Proben von chronisch infizierten Patienten könnte durch die Verwendung eines niedriger sensitiven ELISA Systems im Vergleich zur Western Blot-Analyse bedingt sein.

Murray *et al.* (1993) hingegen verwendet lediglich ein C-terminales Peptidfragment von GRA2 mit einer Glutathion S-Transferase Domäne und konnte mittels ELISA IgG-Antikörper in 75 % der Proben von chronisch und in 82,6 % der Proben von akut infizierten Patienten nachweisen (Murray, Mercier

et al. 1993). Möglicherweise unterscheiden sich die Epitope des 59 Aminosäuren großen Peptidfragments von denen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten 45 kDa großen Fusionsproteins.

Eigene Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von GRA2 schon während der akuten Phase der Infektion. Es standen sieben Humanseren mit IgM-positivem Vorbefund zur Verfügung. In fünf dieser Seren konnten spezifische Antikörper der Klasse IgM gegen die ausgetesteten rekombinanten Proteine nachgewiesen werden. In vier Serumproben konnten in Western Blot-Analysen Reaktionen mit IgM-Antikörpern gegen rGRA2 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend nimmt GRA2 als immundominantes Antigen für die humorale Immunantwort eine zentrale Stellung ein. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass GRA2 auch eine Stimulation von T-Helfer Zellen induziert (Prigione, Facchetti *et al.* 2000). Da GRA2, das zu den sogenannten *excreted-secreted-antigens* (ESA) zählt, daher kontinuierlich produziert wird und gleichermaßen in Tachy-, sowie Bradyzoiten vorkommt, ist es möglicherweise für eine kontinuierliche Stimulation der zellvermittelten Immunantwort gegen den Parasiten verantwortlich (Prigione, Facchetti *et al.* 2000). Dies passt gut zu den Daten, die nach experimenteller Infektion in Mausmodellen erhalten wurden und die zeigten, dass durch gezielten GRA2-*knockout* im RH-Stamm von *T. gondii* eine Virulenzminderung der *knockout*-Mutante resultiert (Mercier, Howe *et al.* 1998). *In vitro* konnte zwar eine im Vergleich zum RH-Wildtyp uneingeschränkte Teilungsrate und Invasion des Parasiten in Makrophagen beobachtet werden (Mercier, Howe *et al.* 1998). *In vivo* zeigte sich jedoch die Virulenzminderung durch das Überleben von 51 % der experimentell mit dem GRA2-*knockout* Stamm von *T. gondii* infizierten Mäusen (Mercier, Howe *et al.* 1998).

4.2.2. GRA7 und seine Bedeutung in der humoralen Immunantwort gegen *T. gondii*

In der vorliegenden Arbeit konnten in allen positiven Seren von Schweinen und Mäusen IgG-Antikörperreaktionen gegen rGRA7 detektiert werden. Bei Humanseren mit einem IFT-Titer $\geq 1:512$ ist die Häufigkeit positiver Nachweise ebenfalls sehr hoch (90,9 %).

GRA7 wurde nach seiner Beschreibung im Jahr 1998 Gegenstand weiterer Forschung in Bezug auf seine Einsatzfähigkeit in ELISA und Western Blot-Verfahren zum Nachweis einer Toxoplasmose. GRA7 konnte in der Parasitophoren Vakuole (PV), assoziiert mit der PV-Membran und in dem Zytoplasma der Wirtszelle während der Infektion im Tachyzoitenstadium nachgewiesen werden (Jacobs, Dubremetz *et al.* 1998). Damit übereinstimmend konnte im ELISA eine Sensitivität von 94 % in Humanseren von Patienten mit IgM-positivem Vorbefund – also in der Phase der akuten Infektion – gezeigt werden (Jacobs, Vercammen *et al.* 1999). In derselben Studie konnte jedoch auch für hoch IgG-positive Humanseren (IFT-Titer $> 1:1024$) im ELISA eine Detektionshäufigkeit von 100 % nachgewiesen werden (Jacobs, Vercammen *et al.* 1999). Da ebenfalls eine hohe Nachweishäufigkeit in der vorliegenden Arbeit durch Western Blot-Analysen bestätigt wurde, eignet sich rGRA7- neben rGRA2-Antigen für Screeninguntersuchungen zum Nachweis einer chronischen Infektion von Menschen mit *T. gondii*.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin am Beispiel von jeweils 5 Serum-Proben aus experimentell mit Oozysten infizierten Schweinen gezeigt werden, dass unabhängig von der Infektionsdosis in allen untersuchten Proben IgG-Antikörperreaktionen mit rGRA7 detektierbar waren. Spätestens 4 Wochen nach der Infektion mit *T. gondii* konnte durch Verhelst *et al.* (2011) mittels ELISA nachgewiesen werden, dass in allen dort untersuchten Schweineseren eine Antikörperbildung gegen GRA7 stattgefunden hat und nach dem Zeitpunkt von 4 Wochen p. i. alle Schweine weiterhin Antikörper gegen GRA7 gebildet haben (Verhelst, De Craeye *et al.* 2011). In dieser Studie stellte sich ebenfalls heraus, dass Antikörper gegen GRA7 im Gegensatz zu Antikörpern gegen

GRA1 in Schweineseren bereits in der Frühphase der Infektion innerhalb von 2 Wochen nachweisbar waren (Verhelst, De Craeye *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnten lediglich in einem Serum IgG-Antikörperreaktionen mit rGRA1 nachgewiesen werden.

Verhelst *et al.* (2015) hat ebenfalls Seren von Schweinen mittels ELISA und PCR analysiert. Im Hinblick auf die IgG-Antikörperantwort gegen 5 verschiedene *T. gondii*-spezifische Antigene (rGRA7, rGRA1, rMIC3 sowie rEC2, einem chimären Antigen, das für MIC2-MIC3-SAG1 kodiert) konnte gezeigt werden, dass von diesen Antigenen nur rGRA7 von spezifischen Antikörpern erkannt wurde (Verhelst, De Craeye *et al.* 2015).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass rGRA7 in Western Blot-Analysen ein zuverlässiger Indikator einer Infektion von Schweinen mit *T. gondii* sein könnte. Rekombinantes GRA7 zeigte sich außerdem im Immunchromatographie-Assay als zuverlässiger Indikator einer Infektion bei Schweinen und könnte sich daher sowohl in der Routine-Untersuchung, als auch im breiten Screening vieler Proben eignen (Terkawi, Kameyama *et al.* 2013).

4.2.3. Die Rolle rekombinanter Antigene von *T. gondii* in der humoralen Immunantwort zur Differenzierung einer akuten und chronischen Infektion

Wie in den bisherigen Ergebnissen gezeigt, eignen sich rGRA2 und rGRA7 als Zielantigene zur Diagnose einer Toxoplasmose, jedoch kann die Reaktivität mit rGRA2 und rGRA7 nicht zur Unterscheidung zwischen einer akuten und einer chronischen Infektion genutzt werden. Daher wurden zusätzliche Immunoblot-Analysen auf Reaktivität gegen rGRA1, rGRA9 und rMIC5 mit Seren von akut bzw. chronisch infizierten Patienten durchgeführt.

Micronemen spielen in der Frühphase der Zellinvasion eine zentrale Rolle. Sie sezernieren MIC-Proteine, die während des Adhäsionsprozesses des Parasiten an die Wirtszelle mit dessen Oberfläche assoziiert sind (Brydges, Zhou *et al.* 2006). Die Western Blot-Analysen dieser Arbeit zeigen eine Reaktion von

Antikörpern der Klasse IgG mit rMIC5 von 63,6 % in Humanseren mit stark positivem IFT-Titer $\geq 1:512$. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass rMIC5-spezifische IgG-Antikörper auch in der chronischen Phase einer Infektion, die zum Teil mit einem hohen Antikörpertiter einher geht, nachgewiesen werden können. In Seren mit IgM-positivem Vorbefund war die Nachweisfrequenz mit 85,7 % etwas höher.

In einer 2003 durchgeführten Studie konnte für MIC5 anhand von rekombinant hergestellten, spezifischen GST-Fusionsproteinen im ELISA eine Nachweishäufigkeit von 23 % in 60 Humanseren aus der akuten Infektionsphase nachgewiesen werden (Beghetto, Spadoni *et al.* 2003). rMIC5 zeigte im Vergleich zu den anderen in dieser Studie analysierten Antigenen (SAG1, rGRA1, rGRA7 und rGRA8) eine geringere Detektionshäufigkeit und führte in zwei negativen Seren zu falsch positiven Ergebnissen (Beghetto, Spadoni *et al.* 2003).

Eine Reaktion von Antikörpern der Klasse IgM oder IgG mit rMIC5 in negativen Kontrollseren konnte in den Western Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden und bestätigt die hohe Spezifität des Western Blot-Verfahrens.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IgG-Antikörpernachweise gegen rMIC5 in allen analysierten Schweinseren möglich ist, hingegen in keinem untersuchten Mausserum. Lediglich in Seren von frisch infizierten Mäusen konnten IgM-Antikörper gegen rMIC5 detektiert werden. Demnach kann rMIC5, ebenso wie rGRA7, als geeignetes Antigen in Western Blot-Analysen für die Detektion einer Infektion mit *T. gondii* in Schweinen genutzt werden. Jedoch kann der Nachweis von rMIC5-spezifischen Antikörpern nicht zu einer Unterscheidung zwischen einer chronischen und einer akuten Infektion genutzt werden.

Es konnte als gemeinsames speziesübergreifendes Merkmal weiterhin herausgearbeitet werden, dass rGRA1 kein immundominantes Antigen für die humorale Immunantwort ist. Die Detektionshäufigkeit von rGRA1-spezifischen IgG-Antikörpern liegt bei nur ca. 20 % in humanen Seren. Von den 7

analysierten Seren mit IgM-positivem Vorbefund ließen sich in zwei Proben IgG-Antikörper gegen rGRA1 nachweisen (28,5 %).

Zur Bedeutung von rGRA1-spezifischen Antikörpern zur Detektion von Infektionen mit *T. gondii* in humanen Seren gibt es in der Studienlage gegensätzliche Ergebnisse. rGRA1 wurde z. B. als Marker einer chronischen Infektion in humanen Seren beschrieben (Cesbron-Delauw, Guy *et al.* 1989). Damit stünde es im zeitlichen Gegensatz zu GRA2 und GRA7, die auch schon während der akuten Phase der Infektion vom Immunsystem erkannt werden (Pietkiewicz, Hiszczynska-Sawicka *et al.* 2004; Golkar, Rafati *et al.* 2007). Andererseits konnte gezeigt werden, dass sich rGRA1 mittels ELISA-Methodik nicht zur Unterscheidung zwischen einer frischen oder einer chronischen Infektion mit *T. gondii* eignet (Ferrandiz, Mercier *et al.* 2004). Auch unsere Western Blot-Daten zeigen, dass der Nachweis rGRA1-spezifischer Antikörper sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase der Infektion möglich ist.

rGRA9-spezifische IgG-Antikörper konnten in ca. 60 % aller humanen Seren nachgewiesen werden. Auffallend ist jedoch, dass in 6 von 7 Seren mit IgM-positivem Vorbefund (85,7 %) rGRA9-spezifische Antikörper nachweisbar waren. Dennoch kann der Nachweis rGRA9-spezifischer Antikörper aufgrund der häufigen positiven Befunde auch bei chronisch erkrankten Patienten nicht zur Differenzierung des Infektionsstadiums genutzt werden. Vergleichsdaten zur Verwendung von rGRA9 als diagnostische Zielstruktur liegen zur Zeit noch nicht vor.

Nach unseren Befunden sind IgG-Antikörper gegen die hier ausgetesteten Antigene nicht zur Verlaufskontrolle einer Toxoplasmose geeignet. Hier sind für zukünftige Untersuchungen möglicherweise bradyzoiten-spezifische Antigene besser geeignet.

Es ist bereits gezeigt worden, dass bradyzoiten-spezifische Antigene, wie z. B. das Bradyzoiten-Antigen 1 (BAG1) oder das Matrix-Antigen 1 (MAG1) eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Antikörperantwort spielen (Bohne, Heesemann *et al.* 1993; Parmley, Yang *et al.* 1994; Bohne, Gross *et al.* 1995; Di Cristina, Del Porto *et al.* 2004). Im Rahmen der Reaktivierung einer

chronischen Infektion mit *T. gondii*, kann es durch die Ruptur der Zysten zu einer Freisetzung der Antigene aus der Zystenwand kommen. MAG1-spezifische Antikörper konnten in ELISA-Analysen von Humanseren als Differenzierungsmerkmal zwischen einer akuten und einer reaktivierten Infektion herausgearbeitet werden (Xiao, Viscidi *et al.* 2013).

Es ist allgemein akzeptiert, dass das Vorhandensein spezifischer IgM-Antikörper auf eine eher akute Infektion hinweist. In den hier gezeigten Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass rGRA2 und rGRA7, aber auch rGRA9 Zielstrukturen für humane IgM-Antikörper darstellen.

Im Infektionsmodell mit Mäusen konnten rGRA2-, rGRA7-, und rGRA9-spezifische IgM-Antikörper in der Frühphase der Infektion nachgewiesen werden, während diese Antikörper in der chronischen Phase nicht mehr bzw. nur noch schwachpositiv nachweisbar waren.

Zusammenfassend konnte in Western Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es rekombinante Antigene von *T. gondii* gibt, die sich aufgrund ihrer hohen Nachweishäufigkeit in Seren seropositiver Individuen zur Diagnose einer Toxoplasmose eignen.

Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, erscheint es jedoch sinnvoll, für diagnostische Tests mehrere Antigene zu kombinieren.

Der erste Versuch einer Kombination der rekombinanten Antigene rSAG1 und rGRA7 wurde 2008 von Velmurugan *et al.* zur Analyse von Ziegenseren mittels ELISA beschrieben und war den Testergebnissen mit den Einzelantigenen deutlich überlegen (Velmurugan, Tewari *et al.* 2008).

In einer weiteren Studie wurde in ELISA-Analysen von Schafseren eine Kombination der rekombinanten Antigene rGRA1, rROP1 und des Oberflächenantigens rP22 verwendet (Holec-Gasior, Ferra *et al.* 2014). Durch die Addition der Oberflächenantigene wird die Zahl der Epitope, die durch die Antikörper im Serum erkannt werden, erhöht. Die Sensitivität des ELISA mit den rekombinanten Antigenen betrug 100 % (Holec-Gasior, Ferra *et al.* 2014). Trotz der vielen unterschiedlichen Antigene im ELISA trat keine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen *N. caninum* (das phylogenetisch eng mit *T. gondii* verwandt

ist (Ellis, Luton *et al.* 1994)) auf, d. h. das ELISA System hatte neben der hohen Sensitivität auch eine hohe Spezifität (Holec-Gasior, Ferra *et al.* 2014).

4.3. Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* in Schweinen

Schweine können sich als Zwischenwirte prinzipiell mit allen drei infektiösen Stadien des Parasiten (Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten (in Oozysten)) infizieren. Das Vorkommen von Infektionen mit *T. gondii* bei Schweinen hat auf Grund der hohen Durchseuchungsrate eine große epidemiologische Bedeutung. Durch den Verzehr von zystenhaltigem Schweinefleisch kann beim Menschen eine Infektion erfolgen.

Beim Schlachtvorgang wird Schweinefleisch im Rahmen der Inspektion nicht routinemäßig auf eine Infektion mit *T. gondii* untersucht. Die Größe der Zysten macht eine rein visuelle Diagnostik unmöglich (Basso, Hartnack *et al.* 2013). Außerdem sind histologische Methoden, bedingt durch die geringe Dichte von Zysten im Schweinefleisch (eine Gewebszyste pro 25 Gramm Schweinefleisch), nicht sensitiv genug (Dubey 2009). Ergänzend zu den herkömmlichen serologischen Testverfahren für eine Toxoplasmose kann auch eine Antikörperdiagnostik aus dem Fleischsaft der Tiere erfolgen. Allerdings sollte bei der Verwendung von Fleischsaft berücksichtigt werden, dass die Konzentration von Antikörpern gegen *T. gondii* zwischen den unterschiedlichen Muskelgruppen des Schweins variiert (Wallander, Frossling *et al.* 2015).

Über viele Jahre hinweg sind der Sabin-Feldmann-Test (SFT), der indirekte Fluoreszenz Antikörper-Test (IFAT) und verschiedene Agglutinations-Tests in der Serodiagnostik der Toxoplasmose in Schweinen angewendet worden. Zu den Agglutinationstests zählen z. B. der Latex-Agglutinations-Test (LAT), der modifizierte Agglutinations-Test (MAT) und der indirekte Hämagglutinations-Test (IHAT). Die weitere Entwicklung und der Einsatz standardisierter Testsysteme zur Diagnose einer Toxoplasmose bei Schweinen ist Gegenstand aktueller veterinärmedizinischer Forschung.

Die Toxoplasmose ist gemäß der Überwachungsleitlinie 2003/99/EG der *European Food Safety Authority* (EFSA) in Abhängigkeit von der

epidemiologischen Situation überwachungspflichtig (EFSA, 2007). Dafür steht mit dem ELISA ein automatisierbares Verfahren zur Verfügung, das für das breite Screening vieler Proben geeignet ist. Das Problem besteht aber nach wie vor in der mangelnden Vergleichbarkeit der ELISA-Verfahren untereinander. Zum einen fehlen die für eine Standardisierung notwendigen definierten Referenzseren (EFSA, 2007). Zum anderen sind für die mangelnde Vergleichbarkeit auch die Verwendung verschiedener Antigene und unterschiedlicher *cut-off* Werte verantwortlich (EFSA, 2007). Allerdings gibt es inzwischen einige kommerziell erhältliche ELISA, z. B. den PrioCHECK® Toxoplasma Ab porcine ELISA, mit dem eine Sensitivität von 98,9 % und eine Spezifität von 92,7 % erreicht werden konnte (Basso, Hartnack *et al.* 2013). Die ELISA-Platten dieses Test-Kits sind mit einem aus Zellkulturen stammenden Tachyzoiten-Antigen beschichtet.

Neben klassischen Antigengemischen aus Tachyzoitenlysate, die in ELISA-Verfahren verwendet werden, gibt es auch die Möglichkeit, rekombinante Antigene einzusetzen. Der Vorteil in der Verwendung rekombinanter Antigene liegt in der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Möglichkeit kostengünstiger auf eine große Menge an Antigenen konstanter Qualität zurückgreifen zu können.

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes rekombinanter Antigene gegenüber den parasitären Totallysaten liegt in der geringeren Anzahl von Epitopen. Es konnten bei Verwendung von Tachyzoitenlysaten vermehrt Kreuzreaktionen nachgewiesen werden (Uggla, Hilali *et al.* 1987). Uggla *et al.* zeigten z. B. nach einer experimentellen Infektion von Kälbern mit *Sarcocystis cruzi*, dass bei Verwendung eines zytoplasmatischen Tachyzoitenlysates von *T. gondii* Antikörperreaktionen im ELISA im Sinne einer Kreuzreaktivität detektiert wurden, während z. B. das Ergebnis des herkömmlichen IFT mit intakten Tachyzoiten negativ blieb (Uggla, Hilali *et al.* 1987).

Die diagnostischen Vorteile des Western Blot Verfahrens zur Diagnose von Zoonosen können auch beim Screening auf andere Erreger ausgenutzt werden. Zum Nachweis einer experimentellen Infektion mit *Trichinella spiralis* konnte durch Western Blot-Analysen von 159 positiven Schweineseren und 144 negativen, bzw. mit anderen Nematoden infizierten Proben gezeigt werden,

dass die Spezifität 100 % und die Sensitivität 98,1 % beträgt (Nöckler, Reckinger *et al.* 2009). Die Vorteile des Western Blot-Verfahrens liegen somit in der höheren Sensitivität und Spezifität im Screening von Proben gegenüber dem ELISA. Daher kann das Western Blot-Verfahren als Bestätigungstest aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität ergänzend eingesetzt werden. Eine hohe Spezifität des Western Blot-Verfahrens konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In keinem der negativen Kontrollseren war eine spezifische Antikörperreaktion gegen rekombinante Proteine von *T. gondii* nachweisbar, d. h. es gab keine falsch positiven Ergebnisse. Zur primären Detektion einer Toxoplasmose hat sich das Western Blot-Verfahren trotz der beschriebenen Vorteile, wahrscheinlich aus Kostengründen, aber bisher nicht etablieren können (EFSA, 2007).

4.3.1. Die Anwendung rekombinanter Antigene in der Analyse der Antikörperentwicklung in Schweineseren

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Seren von Schweinen gearbeitet, die experimentell mit Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* infiziert worden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass chronisch infizierte Schweine IgG-Antikörper gegen die verwendeten rekombinanten Proteine von *T. gondii* ausbilden. Hierbei konnten in allen analysierten Seren vom 98. Tag p. i. (Infektionsdosis 10^5 Oozysten p. o.) IgG-Antikörperreaktionen gegen rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 detektiert werden. Auch die Infektion mit einer niedrigen Infektionsdosis (Infektionsdosis 10^3 Oozyten p. o.) führte zu einer nahezu identischen Antikörperantwort. Nur die Nachweisfrequenz von rGRA9-spezifischen Antikörpern fiel von 100 % auf 75 %.

In weiteren Western Blot-Analysen wurden Seren von frisch infizierten Tieren analysiert (Infektionsdosis 10^6 Oozysten p. o.). Es konnten in allen vier untersuchten Seren vom 14. Tag p. i. IgM-Antikörper gegen rGRA2 nachgewiesen werden. Weiterhin sinkt die Häufigkeit positiver Nachweise von rGRA2-spezifischen IgM-Antikörpern mit zunehmender Infektionsdauer auf 25 % am Tag 53 p. i. ab. Der Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern in

diesen Seren zeigte hingegen keine Kinetik. Es konnten IgG-Antikörperreaktionen gegen rGRA2, rGRA7 und rGRA9 in allen Proben von Tag 14 p. i., Tag 28 p. i. und Tag 53 p. i. detektiert werden (100 %). Zudem lag die Nachweisrate rMIC5-spezifischer Antikörper in Proben aller Untersuchungstage konstant bei 75 %. Hingegen konnten gegen rGRA1 keine IgG-Antikörperreaktionen detektiert werden. Leider standen keine Serumproben zur Verfügung, die vor dem 14. Tag p. i. gewonnen wurden. Ansonsten wäre unter Berücksichtigung einer hier nachgewiesenen IgM-Antikörperkinetik möglicherweise auch eine ansteigende Dynamik in der Bildung von IgG-Antikörpern im Western Blot-Verfahren nachweisbar gewesen.

Die IgG-Antikörperdynamik nach einer experimentellen Oozysteninfektion von Schweinen wurde mittels ELISA-Analysen von Schweineseren bereits 2011 untersucht (K. Görlich, Dissertation 2011). Es konnte mittels ELISA-Analysen mit nativem SAG1 als Antigen gezeigt werden, dass bereits 7 Tage nach einer Infektion mit 10^6 Oozysten eine Serokonversion auftritt (K. Görlich, Dissertation 2011).

In der Dissertationsarbeit von K. Görlich (2011) konnte mittels ELISA und nativem SAG1 als Antigen weiterhin gezeigt werden, dass am Tag 14 p. i. alle Schweine seropositiv waren (K. Görlich, Dissertation 2011). Von den Schweinen mit höheren Inokulationsdosen (10^6 Oozysten) wurden hohe Antikörperspiegel jedoch signifikant früher erreicht als von den Schweinen mit niedrigen Inokulationsdosen (10^3 Oozysten) (K. Görlich, Dissertation 2011). In der Dissertationsarbeit von K. Görlich (2011) wurden in ELISA-Analysen neben nativem SAG1 auch rekombinantes SAG1 und Tachyzoitenlysate als Antigene verwendet. Natives SAG1 ist im Gegensatz zu rekombinantem SAG1 glykosyliert und wird unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Es zeigte sich wiederum die Abhängigkeit der Analyseergebnisse von den verwendeten Antigenen: Abhängig von der Molekülgröße und der unterschiedlichen Faltung der Proteine mit der Folge unterschiedlicher Bindungsstellen oder sterischer Hemmung kann es zu einer verzögerten Detektion der Serokonversion kommen (K. Görlich, Dissertation 2011).

Damit ist die Antigen-Antikörper-Bindung von der Zugänglichkeit der Epitope und damit auch von dem Aufreinigungsverfahren abhängig. Ein Epitop ist die

Region des Antigens, welche mit dem Antikörper interagiert. Man unterscheidet grundsätzlich lineare Epitope und Konformationsepitope. Hierbei werden durch die primäre Aminosäuresequenz lineare Epitope, die sogenannten primären Determinanten, gebildet. In der Konformation eines nativen Antigens sind primäre Determinanten aus Gründen der Faltung des Proteins oftmals nicht direkt zugänglich. Erst im denaturierten Zustand des Proteins können sie von Antikörpern erkannt werden. Das zeigt den Vorteil der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methode der denaturierten Proteinaufreinigung gegenüber der Verwendung von parasitären Totallysaten oder nativen Antigenen, wenn insbesondere lineare Epitope von Antikörpern erkannt werden sollen.

4.4. Einfluss unterschiedlicher Maus- und *T. gondii*-Stämme auf die humorale Immunantwort und den Infektionsverlauf

In dieser Arbeit wurden Seren der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 verwendet. Diese Mausstämme wurden bereits vor Jahren in Bezug auf ihre antiparasitären Abwehrmechanismen untersucht. Es konnten beispielsweise Unterschiede der produzierten IFN- γ -Serumkonzentration nach einer Infektion mit *T. gondii* und des Infektionsverlaufes zwischen den beiden Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 festgestellt werden: Shirahata *et al.* (1986) konnte in Mäusen des C57BL/6-Stamms signifikant höhere IFN- γ -Spiegel 36 Stunden p. i. und 48 Stunden p. i. nachweisen als in BALB/c-Mäusen (Shirahata, Mori *et al.* 1986). Damit scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der IFN- γ -Produktion und dem Überleben der Toxoplasmeninfektion zu geben. Gegen eine direkte Korrelation zwischen der Suszeptibilität für den Parasiten und der IFN- γ -Serumkonzentration sprechen jedoch Daten mit *T. gondii* „resistenten“ C3H/He-Mäusen. Diese Mäuse überstehen eine *T. gondii* Infektion besser als C57BL/6 Mäuse, haben jedoch deutlich niedrigere IFN- γ -Serumspiegel (Shirahata, Mori *et al.* 1986).

Liesenfeld *et al.* (1996) zeigte, dass C57BL/6-Mäuse 7 Tage nach der oralen Infektion mit *T. gondii* eine schwere isolierte Ileum-Nekrose entwickelten,

welche BALB/c-Mäuse hingegen nicht entwickelten und länger überlebten (Liesenfeld, Kosek *et al.* 1996). Die IFN- γ -Serumkonzentration war in C57BL/6-Mäusen geringer als in resistenten BALB/c-Mäusen (Liesenfeld, Kosek *et al.* 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Seren von Mäusen analysiert, die experimentell mit 40 Zysten des ME49-Stamms, einem Typ II-Stamm, oral infiziert wurden. Hier konnten in Western Blot-Analysen der Seren von IDO^{-/-}-Mäusen stark positive Antikörperreaktionen der Klasse IgG mit rGRA1, rGRA2, rGRA7 und rGRA9 detektiert werden. Es konnten identisch zu den Seren der Wildtyp-Mäuse keine IgG-Antikörperreaktionen gegen rMIC5 detektiert werden. Damit besteht formal zunächst kein Unterschied zu den Ergebnissen der Analysen von Mäuseseren, die mit Tachyzoiten des ME49-Stamms intraperitoneal infiziert wurden, da auch hier keine Antikörperreaktionen mit rMIC5 nachweisbar waren. Im Mausmodell konnte bereits 1984 gezeigt werden, dass der klinische Verlauf der Infektion mit *T. gondii* außer durch den Parasitenstamm auch durch den experimentellen Infektionsweg selbst beeinflusst wird (Johnson 1984). Es konnte kein signifikanter Unterschied der Suszeptibilität zwischen oralem oder intraperitonealem Infektionsweg in BALB/c-Mäusen gezeigt werden; C57BL/6-Mäuse aber waren einer intraperitonealen Infektion gegenüber resistent und einer oralen hingegen weniger (Johnson 1984). Diese Ergebnisse ließen sich späterhin auch in weiteren Studien reproduzieren. Nach einer oralen Infektion von Mäusen des C57BL/6-Stamms mit ME49-Zysten von *T. gondii* kam es zu der Entwicklung einer schweren und letalen Verlaufsform mit der Entwicklung u. a. einer Lebernekrose, während signifikant mehr Mäuse überlebt haben, die intraperitoneal infiziert worden sind (McLeod, Eisenhauer *et al.* 1989).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BALB/c- und C57BL/6-Mäuse sowohl nach intraperitonealer Infektion mit Tachyzoiten, als auch nach oraler Infektion mit Zysten eine starke Immunantwort gegen rGRA2 und rGRA7 zeigen, während rGRA1 und rGRA9 weniger gut erkannt wurden. Beide Mausstämme zeigen keine Reaktion auf rMIC5.

Infektionen von Mäusen mit dem Typ I-Stamm von *T. gondii* führen zu einem unkontrollierten Parasitenwachstum und enden dosisunabhängig überwiegend letal, während der Typ II-Stamm dosisabhängig zu einer chronischen Infektion führt. Beim Typ II-Stamm wird die Replikationsrate der Tachyzoiten kontrolliert, welches schließlich in einer Stadienkonversion endet und die Ausbildung einer chronischen Infektion einleitet. Beide Stämme induzieren eine IL-12- und IFN- γ -Produktion (Tait, Jordan *et al.* 2010). Es konnte ein spezifischer Einfluss der unterschiedlichen Stämme von *T. gondii* auf die Zahl der Dendritischen Zellen und damit auf die Zahl der antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (Tait, Jordan *et al.* 2010). Nach einer experimentellen Infektion von C57BL/6-Mäusen mit dem Typ II-Stamm konnte gezeigt werden, dass eine starke Dendritische Zell-Antwort ausgelöst wird und mehr antigenspezifische CD8⁺-T-Zellen produziert werden, als bei einer Infektion mit dem Typ I-Stamm von *T. gondii* (Tait, Jordan *et al.* 2010).

Eine Infektion von Mäusen mit hochvirulenten Mäusen führt häufig so schnell zum Versterben der Tiere, dass eine vollständige Ausbildung der humoralen Immunantwort nicht möglich ist. Wir haben daher für Infektionsstudien den TS4-Stamm benutzt. Der TS4-Stamm ist eine temperatur-sensitive Mutante des virulenten RH-Stamms von *T. gondii* (Pfefferkorn und Pfefferkorn 1976). Im Gegensatz zu dem RH-Stamm ist der TS4-Stamm in immunkompetenten Mäusen avirulent und wurde vielfach zur Immunisierung vor einer späteren experimentellen Infektion mit virulenten Stämmen von *T. gondii* eingesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Immunisierung mit dem TS4-Stamm *in vitro* zu einer Produktion von T_H1-assoziierten Zytokinen wie IFN- γ und IL-2 führt, aber auch CD8⁺-Zellen in die zelluläre Immunantwort mit eingebunden sind (Gazzinelli, Hakim *et al.* 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurden je drei Seren von immunkompetenten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen analysiert, die experimentell mit Tachyzoiten des TS4-Stamms von *T. gondii* intraperitoneal infiziert worden waren. Auch in diesen Tieren wurden nach Infektion hauptsächlich Antikörper gegen rGRA2 und rGRA7 und in geringerem Umfang gegen rGRA1 und rGRA9 gefunden. Somit ist die Art der humoralen Immunantwort auf Typ I TS4-Toxoplasmen und auf Typ II ME49-Toxoplasmen vergleichbar.

4.5. Einfluss der Indolamin 2,3-Dioxygenase auf die humorale Immunantwort in *T. gondii*-infizierten Mäusen

Einen wesentlichen Beitrag zum Abwehrmechanismus gegen *T. gondii*, aber auch gegen andere Parasiten, Bakterien und Viren stellt die lokale Tryptophan-Depletion durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) dar (Däubener, Posdziech *et al.* 1999; Heseler, Spekker *et al.* 2008). IFN- γ spielt eine wesentliche Rolle in der Induktion des IDO-vermittelten antiparasitären Effektes. Erstmals konnte 1984 eine IFN- γ -induzierte Aktivierung der IDO mit konsekutiver Toxoplasmostase in Fibroblasten nachgewiesen werden (Pfefferkorn 1984). Die Stimulation der IDO durch IFN- γ kann im Sinne eines kostimulatorischen Effektes durch TNF- α oder IL-1 verstärkt werden (Heseler, Spekker *et al.* 2008). Umgekehrt lässt sich die Funktion der IDO kompetitiv durch den IDO-Inhibitor 1-Methyl-L-Tryptophan hemmen (Cady und Sono 1991).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich *T. gondii* als intrazellulärer Parasit der humoralen Immunantwort teilweise entziehen kann, hat der antiparasitäre Effektormechanismus der IFN- γ -induzierten IDO einen hohen Stellenwert.

Der antiparasitäre Effekt der IDO konnte schon in frühen Publikationen bestätigt werden. Es konnte *in vitro* anhand einer humanen Karzinomzelllinie gezeigt werden, dass in Zellen mit gezieltem IDO-*knockout* das Wachstum obligat intrazellulärer Erreger wie z. B. Chlamydien oder *T. gondii* selbst unter Stimulation mit IFN- γ nicht zu hemmen ist (Thomas, Garrity *et al.* 1993).

Es ist bekannt, dass die IDO neben ihrer antiparasitären Wirkung auch immunregulatorische Effekte vermittelt und eine T-Zell-Toleranz auslösen kann. Die lokale Tryptophandepletion durch die IDO führt z. B. in der Plazenta trächtiger Mäuse zu einer Inaktivierung von maternalen T-Zellen, und verhindert dadurch eine Abstoßung des nur haploidischen fötalen Gewebes (Munn, Zhou *et al.* 1998). Eine Toleranzentwicklung durch die IDO-Expression kann auch gegenüber Tumorzellen nachgewiesen werden. So führt die IDO-Expression in Endometriumkarzinom-Zellen tatsächlich zu einer T-

Zellhemmung und fördert somit die Tumorprogression (Yoshida, Ino *et al.* 2008).

CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen spielen als IFN γ -Produzenten eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr gegen *T. gondii*. So konnte z. B. die protektive Wirkung von CD8⁺-T-Zellen durch einen neutralisierenden anti-IFN- γ -Antikörper aufgehoben werden (Suzuki und Remington 1990). Außerdem konnte diese Studie die schon vorbeschriebene Rolle von IFN- γ als wesentlichen Effektormechanismus bestätigen (Suzuki, Orellana *et al.* 1988; Suzuki und Remington 1990).

Die Funktion spezifischer Antigene von *T. gondii* in der Induktion von CD8⁺-T-Zellen ist beschrieben, aber noch nicht vollständig geklärt. Anhand von Milzzellen immunisierter Mäuse konnte gezeigt werden, dass SAG1 eine starke CD8⁺-T-Zellantwort auslösen kann und *in vitro* die Produktion von IFN- γ induziert, das über ein murines IFN- γ ELISA-Kit gemessen wurde (Khan, Ely *et al.* 1991). Auch ROP2 wurde als Antigen beschrieben, das mit humanen T-Zell Klonen reagiert und ebenfalls eine IFN- γ -Produktion bedingt (Saavedra, de Meuter *et al.* 1991; Saavedra und Herion 1991; Saavedra, Becerril *et al.* 1996).

Es ist allgemein bekannt, dass sich im Rahmen der adaptiven Immunantwort CD4⁺-T-Zellen zu spezialisierten Effektorzellen entwickeln. Nach dem Priming von T_H1-Zellen kommt es zu der gezielten Sekretion von IFN- γ und einer Aktivierung von Makrophagen, die den CD40 Liganden exprimieren. Beide Zelltypen bilden die zellvermittelte Immunität. Dabei vermittelt IL-12 die Induktion einer T_H1-spezifischen Immunantwort, die in der Abwehr intrazellulärer Erreger wie *T. gondii* essentiell ist (Sher, Collazzo *et al.* 2003). Doch andererseits ist die Induktion einer T-Zell Immunantwort trotz ihrer Relevanz im Abwehrmechanismus gegen *T. gondii* kein Garant für das Langzeit-Überleben einer Infektion im Mausmodell. Während einer chronischen Infektion mit *T. gondii* konnte eine progrediente Erschöpfung von CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (Bhadra, Gigley *et al.* 2011).

Daher müsste nun in weiteren Analysen untersucht werden, in wieweit die in dieser Arbeit als zuverlässig herausgearbeiteten rekombinanten Antigene im

Mausmodell eine T-Zell-Proliferation induzieren und ob diese in IDO-defizienten Tieren beeinflusst ist.

Im Gegensatz zu der zentralen Rolle der T-Zell-vermittelten Immunantwort ist die B-Zell- und Antikörperantwort auf eine Infektion mit *T. gondii* im Mausmodell weniger detailliert beschrieben. Kang *et al.* konnten zeigen, dass alle B-Zell-defizienten Mäuse der *in vivo* Studie zwischen der dritten und vierten Woche nach einer Infektion mit *T. gondii* gestorben sind, wohingegen alle Mäuse aus der Kontrollgruppe die achte Woche p. i. überlebten (Kang, Remington *et al.* 2000).

Um den Einfluss eines IDO-*knockouts* auf die Antikörperproduktion gegen rekombinante Antigene im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* im Mausmodell zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Western Blot-Analysen von Mausseren durchgeführt. In dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns zunächst auf die Analyse der Seren von BALB/c-Mäusen (WT) und im Folgenden von BALB/c-IDO-*knockout*-Mäusen (IDO^{-/-}). Beide Mausstämme wurden vor der Serumgewinnung experimentell mit 10⁴ Tachyzoiten des ME49-Stamms von *T. gondii* infiziert. Es konnte bei der Nachweishäufigkeit IgG-spezifischer Antikörperreaktionen gegen rGRA2 (100 %), rGRA7 (100 %), rGRA9 (80 %) und rMIC5 (keine Nachweise) zunächst kein Unterschied zwischen WT- und IDO^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Lediglich IgG-Antikörper gegen rGRA1 konnten in Seren von IDO^{-/-}-Mäusen häufiger detektiert werden (Nachweishäufigkeit von 40 %). Ausschlaggebend für die folgenden Analysen dieser Arbeit war die Feststellung, dass die IgG-Antikörpernachweise in Seren von IDO^{-/-}-Mäusen deutlich stärker ausfielen, als die von WT-Tieren. Dabei konnte mittels Densitometrie diese unterschiedliche Farbintensität als Ausdruck einer unterschiedlich hohen Antikörperproduktion quantifiziert werden. Die Analyse der Bandenintensität zeigt, dass der Unterschied in der Intensität positiver IgG-Antikörpernachweise gegen rGRA2 und rGRA7 signifikant ist (Abbildung 3.13). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass in den fünf untersuchten Seren von IDO^{-/-}-Mäusen eine signifikant vermehrte Antikörperproduktion gegen rGRA2 und rGRA7 vorliegt. Diese Daten werden zudem bestärkt durch die Beobachtung einer stärkeren Antwort gegen beide

Antigene auch in C57BL/6-Mäusen nach i. p. Infektion mit Tachyzoiten und in BALB/c-Mäusen die oral mit Zysten infiziert wurden.

In der Literatur ist bisher nur ein Versuchsaufbau mit gezieltem IDO-*knockout* beschrieben; allerdings in C57BL/6-Mäusen und mit der Bestimmung von Titern des Antigens SAG2 (Murakami, Hoshi *et al.* 2012). Hier erfolgte im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit eine experimentelle Infektion der Mäuse mit Zysten des Typ II Fukaya-Stamms von *T. gondii* welcher im Vorfeld zur Analyse der Immunreaktionen hauptsächlich in IFN- γ -*knockout* Mausmodellen eingesetzt wurde (Fujigaki, Saito *et al.* 2002; Norose, Mun *et al.* 2003; Kudo, Aosai *et al.* 2004; Norose, Naoi *et al.* 2008).

Murakami *et al.* bestimmte mit Hilfe des Latexagglutinationstests 7 Tage p. i. höhere Antikörpertiter gegen SAG2 in WT-Mäusen als in IDO^{-/-}-Mäusen. Hingegen konnte 14 Tage p. i. kein signifikanter Unterschied in der Antikörperproduktion zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Murakami, Hoshi *et al.* 2012). Diese grundlegend gegensätzlichen Ergebnisse von Murakami *et al.* zu den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit könnten allerdings durch folgende Erklärungsmodelle begründet sein: (1) Die Bestimmung der Antikörpertiter durch Murakami *et al.* wird nur in Seren von frisch infizierten Tieren (Tag 7 p. i.) angegeben. Zudem wird der in dieser Studie verwendete Toxotest-MT kit (Eiken Chemical Co. Ltd., Hyogo, Japan) in der Literatur als wenig sensitiv beschrieben (Suzuki und Remington 1990). (2) Es gibt weiterhin in der Studie keine Angaben zu der detektierten Antikörperklasse, was vor dem Hintergrund der Analyse frisch infizierter Mäuse relevant ist, da IgM in Agglutinationstests effektiver wirkt als IgG. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörperreaktionen mit IgM bzw. IgG in Seren vom 11. Tag p. i. bis zum 147. Tag p. i. analysiert, sodass eine relativ breite Zeitspanne erfasst wurde.

Auf der Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint es naheliegend zu sein, dass eine vermehrte IgG-Antikörperproduktion gegen rGRA2 und rGRA7 in Mäusen mit gezieltem IDO-*knockout* durch den fehlenden immunregulatorischen Effekt der IDO bedingt ist.

5. Zusammenfassung

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist der Erreger der Toxoplasmose. Als obligat intrazellulärer Parasit ist er in der Lage, alle kernhaltigen Zellen von Säugetieren, also auch dem Menschen, zu infizieren. Für den Menschen stellen der Verzehr von zystenhaltigem Fleisch und die Aufnahme von Zysten aus der Umwelt, z. B. bei der Gartenarbeit die wichtigsten Infektionsquellen dar. Während der akuten Infektion organisiert sich der Parasit in Form einer Parasitophoren Vakuole und sezerniert Antigene, die vom humoralen und zellulären Immunsystem des Wirts erkannt werden.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertationsarbeit ist zunächst, ob man durch Western Blot-Analysen mit rekombinanten Proteinen von *T. gondii* zwischen Seren von immunisierten und nicht immunisierten Patienten unterscheiden kann. Zunächst wurden die rekombinanten Antigene rGRA1, rGRA2, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurden die rekombinanten Fusionsproteine auch zur Analyse von Schweine- und Mausseren verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass speziesübergreifend IgG-Antikörperreaktionen gegen rekombinantes GRA2 in allen untersuchten positiven Seren nachweisbar war. Weiterhin konnten IgG-Antikörperreaktionen gegen rGRA7 in Humanseren mit stark positivem IFT ($\geq 1:512$; 90,9 %), sowie in Seren von experimentell mit *T. gondii* infizierten Schweinen (100 %) und Mäusen (100 %) nachgewiesen werden. Ebenfalls möglich war der Nachweis spezifischer Antikörper der Klasse IgM in der frühen Phase der Infektion in Seren der drei Spezies. Speziesübergreifend konnten rGRA1-spezifische IgG-Antikörper in den Western Blot-Analysen nur selten nachgewiesen werden. IgG-Antikörperreaktionen gegen rMIC5 hingegen konnten mit einer Nachweishäufigkeit von 100 % nur in Schweineseren detektiert werden. Nach diesen Daten sind die Antigene rGRA2 und rGRA7 zur Verwendungen in Bestätigungstests einer chronischen Toxoplasmose bei Menschen oder bei Schweinen geeignet.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IFN- γ -induzierte Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) das Wachstum verschiedener Erreger, u. a. von *T. gondii* hemmt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ergänzend untersucht, ob sich ein gezielter IDO-*knockout* mit dem Ausfall des immunregulatorischen Effektormechanismus auf die Antikörperproduktion in experimentell mit *T. gondii* infizierten Mäusen auswirkt. Dabei konnte durch densitometrische Analyse gezeigt werden, dass in IDO-*knockout*-Mäusen eine signifikant höhere IgG-Antikörperproduktion gegen rGRA2 und rGRA7 vorliegt, als in Wildtyp-Mäusen. Detaillierte Zusatzuntersuchungen in einer größeren Anzahl von Einzelseren sind nötig, um diesen Befund auch in anderen Testsystemen abzusichern.

6. Literaturverzeichnis

- Adams L. B., Hibbs J. B., Jr., Taintor R. R. und Krahenbuhl J. L. (1990).** Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol*; 144: 2725-2729.
- Adjogble K. D., Mercier C., Dubremetz J. F., Hucce C., Mackenzie C. R., Cesbron-Delauw M. F. und Däubener W. (2004).** GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol*; 34: 1255-1264.
- Aliberti J., Valenzuela J. G., Carruthers V. B., Hieny S., Andersen J., Charest H., Reis e Sousa C., Fairlamb A., Ribeiro J. M. und Sher A. (2003).** Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol*; 4: 485-490.
- Asai T., Miura S., Sibley L. D., Okabayashi H. und Takeuchi T. (1995).** Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*; 270: 11391-11397.
- Aubert D., Foudrinier F., Villena I., Pinon J. M., Biava M. F. und Renoult E. (1996).** PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting. *J Clin Microbiol*; 34: 1347.
- Basso W., Hartnack S., Pardini L., Maksimov P., Koudela B., Venturini M. C., Schares G., Sidler X., Lewis F. I. und Deplazes P. (2013).** Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. *Int J Parasitol*; 43: 565-570.
- Beck H. P., Blake D., Darde M. L., Felger I., Pedraza-Diaz S., Regidor-Cerrillo J., Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L. M., Putignani L., Shiels B., Tait A. und Weir W. (2009).** Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int J Parasitol*; 39: 175-189.
- Beckers C. J., Dubremetz J. F., Mercereau-Puijalon O. und 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: 947-961.
- Beghetto E., Spadoni A., Buffolano W., Del Pezzo M., Minenkova O., Pavoni E., Pucci A., Cortese R., Felici F. und Gargano N. (2003).** Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int J Parasitol*; 33: 163-173.

- Bermudes D., Peck K. R., Afifi M. A., Beckers C. J. und Joiner K. A. (1994).** Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*; 269: 29252-29260.
- Bhadra R., Gigley J. P., Weiss L. M. und Khan I. A. (2011).** Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8⁺ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108: 9196-9201.
- Bohne W., Gross U., Ferguson D. J. und Heesemann J. (1995).** Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol*; 16: 1221-1230.
- Bohne W., Heesemann J. und Gross U. (1993).** Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun*; 61: 1141-1145.
- Bowie W. R., King A. S., Werker D. H., Isaac-Renton J. L., Bell A., Eng S. B. und Marion S. A. (1997).** Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet*; 350: 173-177.
- Bradley P. J., Ward C., Cheng S. J., Alexander D. L., Collier S., Coombs G. H., Dunn J. D., Ferguson D. J., Sanderson S. J., Wastling J. M. und Boothroyd J. C. (2005).** Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*; 280: 34245-34258.
- Brecht S., Carruthers V. B., Ferguson D. J., Giddings O. K., Wang G., Jakle U., Harper J. M., Sibley L. D. und Soldati D. (2001).** The *toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J Biol Chem*; 276: 4119-4127.
- Brossier F., Jewett T. J., Sibley L. D. und Urban S. (2005).** A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102: 4146-4151.
- Brydges S. D., Sherman G. D., Nockemann S., Loyens A., Däubener W., Dubremetz J. F. und Carruthers V. B. (2000).** Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 111: 51-66.
- Brydges S. D., Zhou X. W., Huynh M. H., Harper J. M., Mital J., Adjogble K. D., Däubener W., Ward G. E. und Carruthers V. B. (2006).** Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. *Eukaryot Cell*; 5: 2174-2183.

Burg J. L., Perelman D., Kasper L. H., Ware P. L. und Boothroyd J. C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*; 141: 3584-3591.

Cady S. G. und Sono M. (1991). 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys*; 291: 326-333.

Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y. und Bendelac A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*; 163: 4647-4650.

Carruthers V. B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int*; 48: 1-10.

Carruthers V. B., Giddings O. K. und Sibley L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol*; 1: 225-235.

Carruthers V. B., Moreno S. N. und Sibley L. D. (1999). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J*; 342 (Pt 2): 379-386.

Carruthers V. B. und Sibley L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*; 73: 114-123.

Carruthers V. B. und Sibley L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*; 31: 421-428.

Cerede O., Dubremetz J. F., Bout D. und Lebrun M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J*; 21: 2526-2536.

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. und et al. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 86: 7537-7541.

Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M. F. und Capron A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp Parasitol*; 71: 114-124.

- Chaturvedi S., Qi H., Coleman D., Rodriguez A., Hanson P. I., Striepen B., Roos D. S. und Joiner K. A. (1999).** Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J Biol Chem*; 274: 2424-2431.
- Chen X. G., Gong Y., Hua L., Lun Z. R. und Fung M. C. (2001).** High-level expression and purification of immunogenic recombinant SAG1 (P30) of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*; 23: 33-37.
- Ching X. T., Lau Y. L., Fong M. Y. und Nissapatorn V. (2013).** Evaluation of *Toxoplasma gondii*-recombinant dense granular protein (GRA2) for serodiagnosis by western blot. *Parasitol Res*; 112: 1229-1236.
- Cook A. J., Gilbert R. E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum P. A., Foulon W., Semprini A. E. und Dunn D. T. (2000).** Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*; 321: 142-147.
- Coppens I., Dunn J. D., Romano J. D., Pypaert M., Zhang H., Boothroyd J. C. und Joiner K. A. (2006).** *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*; 125: 261-274.
- Cortina-Borja M., Tan H. K., Wallon M., Paul M., Prusa A., Buffolano W., Malm G., Salt A., Freeman K., Petersen E., Gilbert R. E. und European Multicentre Study on Congenital T. (2010).** Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Med*; 7.
- Couvreux J., Desmonts G. und Thulliez P. (1988).** Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *J Antimicrob Chemother*; 22 Suppl B: 193-200.
- Dannemann B., McCutchan J. A., Israelski D., Antoniskis D., Leport C., Luft B., Nussbaum J., Clumeck N., Morlat P., Chiu J. und et al. (1992).** Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med*; 116: 33-43.
- Darcy F., Deslee D., Santoro F., Charif H., Auriault C., Decoster A., Duquesne V. und Capron A. (1988).** Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*; 10: 553-567.
- Darcy F., Maes P., Gras-Masse H., Auriault C., Bossus M., Deslee D., Godard I., Cesbron M. F., Tartar A. und Capron A. (1992).** Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide

construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J Immunol*; 149: 3636-3641.

Däubener W., Pilz K., Seghrouchni Zennati S., Bilzer T., Fischer H. G. und Hadding U. (1993). Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol*; 43: 31-38.

Däubener W., Posdziech V., Hadding U. und MacKenzie C. R. (1999). Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol*; 187: 143-147.

Däubener W., Spors B., Huckle C., Adam R., Stins M., Kim K. S. und Schroten H. (2001). Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 69: 6527-6531.

Deckert-Schlüter M., Rang A., Weiner D., Huang S., Wiestler O. D., Hof H. und Schlüter D. (1996). Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest*; 75: 827-841.

Decoster A., Darcy F. und Capron A. (1988). Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin Exp Immunol*; 73: 376-382.

Denkers E. Y., Gazzinelli R. T., Martin D. und Sher A. (1993). Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J Exp Med*; 178: 1465-1472.

Desmonts G., Naot Y. und Remington J. S. (1981). Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol*; 14: 486-491.

Di Cristina M., Del Porto P., Buffolano W., Beghetto E., Spadoni A., Guglietta S., Piccolella E., Felici F. und Gargano N. (2004). The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes Infect*; 6: 164-171.

Dobrowolski J. M. und Sibley L. D. (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*; 84: 933-939.

Dubey J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*; 28: 1019-1024.

- Dubey J. P. (2004).** Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*; 126: 57-72.
- Dubey J. P. (2009).** *Toxoplasmosis* in pigs--the last 20 years. *Vet Parasitol*; 164: 89-103.
- Dubey, J.P. und Beattie, C.P. (1988).** Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press*, Boca Raton.
- Dubey J. P. und Frenkel J. K. (1972).** Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool*; 19: 155-177.
- Dubey J. P., Kotula A. W., Sharar A., Andrews C. D. und Lindsay D. S. (1990).** Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol*; 76: 201-204.
- Dubey J. P., Lindsay D. S. und Speer C. A. (1998).** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*; 11: 267-299.
- Dubremetz J. F., Achbarou A., Bermudes D. und Joiner K. A. (1993).** Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res*; 79: 402-408.
- Dubremetz J. F., Garcia-Reguet N., Conseil V. und Fourmaux M. N. (1998).** Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*; 28: 1007-1013.
- Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C. und Gilbert R. (1999).** Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*; 353: 1829-1833.
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) (2007).** Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. doi:10.2903/j.efsa.2007; 583: 1-64.
- Ellis J., Luton K., Baverstock P. R., Brindley P. J., Nimmo K. A. und Johnson A. M. (1994).** The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol*; 64: 303-311.
- Ferguson D. J. und 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: 483-491.
- Ferrandiz J., Mercier C., Wallon M., Picot S., Cesbron-Delauw M. F. und Peyron F. (2004).** Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt

of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. *Clin Diagn Lab Immunol*; 11: 1016-1021.

Fischer H. G., Stachelhaus S., Sahm M., Meyer H. E. und Reichmann G. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol*; 91: 251-262.

Fourmaux M. N., Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferragut C., Camus D. und Dubremetz J. F. (1996). The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol Biochem Parasitol*; 83: 201-210.

Frenkel J. K., Dubey J. P. und Miller N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*; 167: 893-896.

Frucht D. M., Fukao T., Bogdan C., Schindler H., O'Shea J. J. und Koyasu S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*; 22: 556-560.

Fujigaki S., Saito K., Takemura M., Maekawa N., Yamada Y., Wada H. und Seishima M. (2002). L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 70: 779-786.

Gazzinelli R. T., Hakim F. T., Hieny S., Shearer G. M. und Sher A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol*; 146: 286-292.

Gendrin C., Mercier C., Braun L., Musset K., Dubremetz J. F. und Cesbron-Delauw M. F. (2008). *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic*; 9: 1665-1680.

Godard I., Estaquier J., Zenner L., Bossus M., Auriault C., Darcy F., Gras-Masse H. und Capron A. (1994). Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Mol Immunol*; 31: 1353-1363.

Golkar M., Rafati S., Abdel-Latif M. S., Brenier-Pinchart M. P., Fricker-Hidalgo H., Sima B. K., Babaie J., Pelloux H., Cesbron-Delauw M. F. und Mercier C. (2007). The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 58: 419-426.

Görlich, K (2011). Toxoplasma-Infektionen bei Schweinen: Semi-automatisiertes Testsystem für Surveillance und Monitoring, Querschnittsstudie

in Niedersachsen. Inaugural-Dissertation, veröffentlicht.

Gross U. (2004). [Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 47: 692-697.

Gross U., Holpert M. und Goebel S. (2004). Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann Ist Super Sanita*; 40: 65-70.

Harris D. P., Haynes L., Sayles P. C., Duso D. K., Eaton S. M., Lepak N. M., Johnson L. L., Swain S. L. und Lund F. E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*; 1: 475-482.

Hayaishi O., Hirata F., Fujiwara M., Senoh S. und Tokuyama T. (1975). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol*; 29: 291-293.

Hedman K., Lappalainen M., Seppä I. und Makela O. (1989). Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis*; 159: 736-740.

Hehl A. B., Lekutis C., Grigg M. E., Bradley P. J., Dubremetz J. F., Ortega-Barria E. und Boothroyd J. C. (2000). *Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun*; 68: 7078-7086.

Heseler K., Spekter K., Schmidt S. K., MacKenzie C. R. und Däubener W. (2008). Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 52: 273-281.

Hill D., Coss C., Dubey J. P., Wroblewski K., Sautter M., Hosten T., Munoz-Zanzi C., Mui E., Withers S., Boyer K., Hermes G., Coyne J., Jagdis F., Burnett A., McLeod P., Morton H., Robinson D. und McLeod R. (2011). Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 97: 328-337.

Hill D. und Dubey J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*; 8: 634-640.

Hiszczyńska-Sawicka E., Brillowska-Dąbrowska A., Dąbrowski S., Pietkiewicz H., Myjak P. und Kur J. (2003). High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*; 27: 150-157.

Holec-Gasior L., Ferra B., Hiszczyńska-Sawicka E. und Kur J. (2014). The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet Parasitol*; 206: 146-152.

- Holec-Gasior L., Kur J. und Hiszczynska-Sawicka E. (2009).** GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*; 16: 510-514.
- Hotop A., Buschtons S., Bangoura B., Zoller B., Koethe M., Spekter-Bosker K., Hotop S. K., Tenter A. M., Däubener W., Straubinger R. K. und Gross U. (2014).** Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. *Parasitol Res*; 113: 1473-1480.
- Hotop A., Hlobil H. und Gross U. (2012).** Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*; 54: 1545-1552.
- Hunter C. A. und Sibley L. D. (2012).** Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*; 10: 766-778.
- Hunter C. A., Subauste C. S., Van Cleave V. H. und Remington J. S. (1994).** Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*; 62: 2818-2824.
- Huynh M. H. und Carruthers V. B. (2006).** *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog*; 2: e84.
- Jacobs D., Dubremetz J. F., Loyens A., Bosman F. und Saman E. (1998).** Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 91: 237-249.
- Jacobs D., Vercammen M. und Saman E. (1999).** Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol*; 6: 24-29.
- Johnson A. M. (1984).** Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. *Z Parasitenkd*; 70: 303-309.
- Johnson A. M. und Illana S. (1991).** Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene*; 99: 127-132.
- Jones J. L., Kruszon-Moran D., Rivera H. N., Price C. und Wilkins P. P. (2014).** *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. *Am J Trop Med Hyg*; 90: 1135-1139.
- Kang H., Remington J. S. und 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: 2629-2634.

- Kasper L. H. (1989).** Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*; 57: 668-672.
- Kawase O., Nishikawa Y., Bannai H., Zhang H., Zhang G., Jin S., Lee E. G. und Xuan X. (2007).** Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*; 7: 3718-3725.
- Khan I. A., Ely K. H. und Kasper L. H. (1991).** A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol*; 147: 3501-3506.
- Kieffer F., Wallon M., Garcia P., Thulliez P., Peyron F. und Franck J. (2008).** Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*; 27: 27-32.
- Kudo M., Aosai F., Mun H. S., Norose K., Akira S., Iwakura Y. und Yano A. (2004).** The role of IFN-gamma and Toll-like receptors in nephropathy induced by *Toxoplasma gondii* infection. *Microbiol Immunol*; 48: 617-628.
- Kuticic V. und Wikerhauser T. (1996).** Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr Top Microbiol Immunol*; 219: 261-265.
- Laliberte J. und Carruthers V. B. (2011).** *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Mol Biochem Parasitol*; 177: 49-56.
- Lecordier L., Fourmaux M. P., Mercier C., Dehecq E., Masy E. und Cesbron-Delauw M. F. (2000).** Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*; 7: 607-611.
- Lecordier L., Mercier C., Sibley L. D. und Cesbron-Delauw M. F. (1999).** Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell*; 10: 1277-1287.
- Leriche M. A. und Dubremetz J. F. (1990).** Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol Res*; 76: 559-562.
- Liesenfeld O., Kosek J., Remington J. S. und Suzuki Y. (1996).** Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*; 184: 597-607.
- Logan G. J., Smyth C. M., Earl J. W., Zaikina I., Rowe P. B., Smythe J. A. und Alexander I. E. (2002).** HeLa cells cocultured with peripheral blood

lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology*; 105: 478-487.

Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S. und Gruissem W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*; 14 Suppl: S389-400.

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. und Meunier-Carpentier F. (1983). Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet*; 1: 781-784.

Luft B. J. und Remington J. S. (1988). AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis*; 157: 1-6.

Luft B. J. und Remington J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*; 15: 211-222.

Marechal E. und Cesbron-Delauw M. F. (2001). The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci*; 6: 200-205.

McLeod R., Eisenhauer P., Mack D., Brown C., Filice G. und Spitalny G. (1989). Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*; 142: 3247-3255.

McLeod R., Frenkel J. K., Estes R. G., Mack D. G., Eisenhauer P. B. und Gibori G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol*; 140: 1632-1637.

Mercier C., Cesbron-Delauw M. F. und Sibley L. D. (1998). The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci*; 111 (Pt 15): 2171-2180.

Mercier C., Dubremetz J. F., Rauscher B., Lecordier L., Sibley L. D. und Cesbron-Delauw M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell*; 13: 2397-2409.

Mercier C., Howe D. K., Mordue D., Lingnau M. und Sibley L. D. (1998). Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect Immun*; 66: 4176-4182.

Mercier C., Lecordier L., Darcy F., Deslee D., Murray A., Tourvieille B., Maes P., Capron A. und Cesbron-Delauw M. F. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 58: 71-82.

- Michel R., Schupp K., Raether W. und Bierther F. W. (1980).** Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int J Parasitol*; 10: 309-313.
- Miller S. A., Binder E. M., Blackman M. J., Carruthers V. B. und Kim K. (2001).** A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*; 276: 45341-45348.
- Montoya J. G. (2002).** Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis*; 185 Suppl 1: S73-82.
- Montoya J. G. und Liesenfeld O. (2004).** Toxoplasmosis. *Lancet*; 363: 1965-1976.
- Morisaki J. H., Heuser J. E. und Sibley L. D. (1995).** Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci*; 108 (Pt 6): 2457-2464.
- Munn D. H., Zhou M., Attwood J. T., Bondarev I., Conway S. J., Marshall B., Brown C. und Mellor A. L. (1998).** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*; 281: 1191-1193.
- Murakami Y., Hoshi M., Hara A., Takemura M., Arioka Y., Yamamoto Y., Matsunami H., Funato T., Seishima M. und Saito K. (2012).** Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine*; 59: 245-251.
- Murray A., Mercier C., Decoster A., Lecordier L., Capron A. und Cesbron-Delauw M. F. (1993).** Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*. *Appl Parasitol*; 34: 235-244.
- Nicolle, C., u. L. Manceaux (1908).** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*; 147: 763-766.
- Nockemann S., Dlugonska H., Henrich B., Kitzerow A. und Däubener W. (1998).** Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 97: 109-121.
- Nöckler K., Reckinger S., Broglia A., Mayer-Scholl A. und Bahn P. (2009).** Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Vet Parasitol*; 163: 341-347.
- Norose K., Mun H. S., Aosai F., Chen M., Piao L. X., Kobayashi M., Iwakura Y. und Yano A. (2003).** IFN-gamma-regulated *Toxoplasma gondii* distribution and load in the murine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 44: 4375-4381.

- Norose K., Naoi K., Fang H. und Yano A. (2008).** *In vivo* study of toxoplasmic parasitemia using interferon-gamma-deficient mice: absolute cell number of leukocytes, parasite load and cell susceptibility. *Parasitol Int*; 57: 447-453.
- Ong Y. C., Reese M. L. und Boothroyd J. C. (2010).** Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J Biol Chem*; 285: 28731-28740.
- Parmley S. F., Yang S., Harth G., Sibley L. D., Sucharczuk A. und Remington J. S. (1994).** Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol*; 66: 283-296.
- Pettersen E. K. (1979).** Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. *Acta Pathol Microbiol Scand B*; 87: 217-220.
- Pfefferkorn E. R. (1984).** Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81: 908-912.
- Pfefferkorn E. R. und Pfefferkorn L. C. (1976).** *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol*; 39: 365-376.
- Pietkiewicz H., Hiszczynska-Sawicka E., Kur J., Petersen E., Nielsen H. V., Stankiewicz M., Andrzejewska I. und Myjak P. (2004).** Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*; 42: 1779-1781.
- Pinon J. M., Dumon H., Chemla C., Franck J., Petersen E., Lebech M., Zufferey J., Bessieres M. H., Marty P., Holliman R., Johnson J., Luyasu V., Lecolier B., Guy E., Joynson D. H., Decoster A., Enders G., Pelloux H. und Candolfi E. (2001).** Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol*; 39: 2267-2271.
- Prigione I., Facchetti P., Lecordier L., Deslee D., Chiesa S., Cesbron-Delauw M. F. und Pistoia V. (2000).** T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol*; 164: 3741-3748.
- Prince J. B., Araujo F. G., Remington J. S., Burg J. L., Boothroyd J. C. und Sharma S. D. (1989).** Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 34: 3-13.

- Rabenau K. E., Sohrabi A., Tripathy A., Reitter C., Ajioka J. W., Tomley F. M. und Carruthers V. B. (2001).** TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Mol Microbiol*; 41: 537-547.
- Rey L. C. und Ramalho I. L. (1999).** Seroprevalence of toxoplasmosis in fortaleza, Ceara, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 41: 171-174.
- Ridel P. R., Auriault C., Darcy F., Pierce R. J., Leite P., Santoro F., Neyrinck J. L., Kusnierz J. P. und Capron A. (1988).** Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. *J Immunol*; 141: 978-983.
- Robert-Gangneux F. und Darde M. L. (2012).** Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*; 25: 264-296.
- Robert Koch-Institut (2007).** Toxoplasmose RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin*; 42: 390-394.
- Rosowski E. E., Lu D., Julien L., Rodda L., Gaiser R. A., Jensen K. D. und Saeij J. P. (2011).** Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med*; 208: 195-212.
- Saavedra R., Becerril M. A., Dubeaux C., Lippens R., De Vos M. J., Herion P. und Bollen A. (1996).** Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*; 64: 3858-3862.
- Saavedra R., de Meuter F., Decourt J. L. und 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: 1975-1982.
- Saavedra R. und Herion P. (1991).** Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity. *Parasitol Res*; 77: 379-385.
- Saffer L. D., Mercereau-Puijalon O., Dubremetz J. F. und Schwartzman J. D. (1992).** Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool*; 39: 526-530.
- Saouros S., Dou Z., Henry M., Marchant J., Carruthers V. B. und Matthews S. (2012).** Microneme protein 5 regulates the activity of *Toxoplasma* subtilisin 1 by mimicking a subtilisin prodomain. *J Biol Chem*; 287: 36029-36040.
- Scanga C. A., Aliberti J., Jankovic D., Tilloy F., Bennouna S., Denkers E. Y., Medzhitov R. und 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: 5997-6001.

- Scharton-Kersten T. M., Yap G., Magram J. und Sher A. (1997).** Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*; 185: 1261-1273.
- Schlüter D., Däubener W., Schares G., Gross U., Pleyer U. und Lüder C. (2014).** Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol*.
- Schwartzman J. D. (1986).** Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect Immun*; 51: 760-764.
- Schwartzman J. D. und Pfefferkorn E. R. (1982).** *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp Parasitol*; 53: 77-86.
- Sher A., Collazzo C., Scanga C., Jankovic D., Yap G. und Aliberti J. (2003).** Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res*; 27: 521-528.
- Shirahata T., Mori A., Ishikawa H. und Goto H. (1986).** Strain differences of interferon-generating capacity and resistance in toxoplasma-infected mice. *Microbiol Immunol*; 30: 1307-1316.
- Sibley L. D., Hakansson S. und Carruthers V. B. (1998).** Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol*; 8: R12-14.
- Sibley L. D., Niesman I. R., Parmley S. F. und 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): 1669-1677.
- Sibley L. D., Pfefferkorn E. R. und Boothroyd J. C. (1991).** Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*; 7: 327-328.
- Sohn C. S., Cheng T. T., Drummond M. L., Peng E. D., Vermont S. J., Xia D., Cheng S. J., Wastling J. M. und Bradley P. J. (2011).** Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. *PLoS One*; 6: e18383.
- Stepick-Biek P., Thulliez P., Araujo F. G. und Remington J. S. (1990).** IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis*; 162: 270-273.
- Stuehr D. J. und Nathan C. F. (1989).** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*; 169: 1543-1555.

- Suarez C., Volkmann K., Gomes A. R., Billker O. und Blackman M. J. (2013).** The malarial serine protease SUB1 plays an essential role in parasite liver stage development. *PLoS Pathog*; 9: e1003811.
- Suzuki Y., Orellana M. A., Schreiber R. D. und Remington J. S. (1988).** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*; 240: 516-518.
- Suzuki Y. und Remington J. (1990).** Insufficient sensitivity of the Toxo-test-MT kit for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 9: 238-239.
- Suzuki Y. und Remington J. S. (1990).** The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J Immunol*; 144: 1954-1956.
- Tait E. D., Jordan K. A., Dupont C. D., Harris T. H., Gregg B., Wilson E. H., Pepper M., Dzierszynski F., Roos D. S. und Hunter C. A. (2010).** Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *J Immunol*; 185: 1502-1512.
- Taylor G. A., Feng C. G. und Sher A. (2004).** p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*; 4: 100-109.
- Taylor G. A., Feng C. G. und Sher A. (2007).** Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes Infect*; 9: 1644-1651.
- Taylor M. W. und Feng G. S. (1991).** Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*; 5: 2516-2522.
- Tenter A. M., Heckeroth A. R. und Weiss L. M. (2000).** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*; 30: 1217-1258.
- Terkawi M. A., Kameyama K., Rasul N. H., Xuan X. und Nishikawa Y. (2013).** Development of an immunochromatographic assay based on dense granule protein 7 for serological detection of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol*; 20: 596-601.
- Thomas S. M., Garrity L. F., Brandt C. R., Schobert C. S., Feng G. S., Taylor M. W., Carlin J. M. und Byrne G. I. (1993).** IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol*; 150: 5529-5534.
- Torrey E. F. und Yolken R. H. (2013).** *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol*; 29: 380-384.

- Uggla A., Hilali M. und Lovgren K. (1987).** Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. *Res Vet Sci*; 43: 127-129.
- Velmurugan G. V., Tewari A. K., Rao J. R., Baidya S., Kumar M. U. und Mishra A. K. (2008).** High-level expression of SAG1 and GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* (Izatnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis. *Vet Parasitol*; 154: 185-192.
- Verhelst D., De Craeye S., Dorny P., Melkebeek V., Goddeeris B., Cox E. und Jongert E. (2011).** IFN-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. *Vet Parasitol*; 179: 14-21.
- Verhelst D., De Craeye S., Jennes M., Dorny P., Goddeeris B. und Cox E. (2015).** Interferon-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues in experimentally infected sheep in comparison with pigs. *Vet Parasitol*; 207: 7-16.
- Wallander C., Frossling J., Vagsholm I., Burrells A. und Lunden A. (2015).** "Meat juice" is not a homogeneous serological matrix. *Foodborne Pathog Dis*; 12: 280-288.
- Wan K. L., Carruthers V. B., Sibley L. D. und Ajioka J. W. (1997).** Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol*; 84: 203-214.
- Wilson C. B., Remington J. S., Stagno S. und Reynolds D. W. (1980).** Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics*; 66: 767-774.
- Wulf M. W., van Crevel R., Portier R., Ter Meulen C. G., Melchers W. J., van der Ven A. und Galama J. M. (2005).** Toxoplasmosis after renal transplantation: implications of a missed diagnosis. *J Clin Microbiol*; 43: 3544-3547.
- Xiao J., Viscidi R. P., Kannan G., Pletnikov M. V., Li Y., Severance E. G., Yolken R. H. und Delhaes L. (2013).** The *Toxoplasma* MAG1 peptides induce sex-based humoral immune response in mice and distinguish active from chronic human infection. *Microbes Infect*; 15: 74-83.
- Yoshida N., Ino K., Ishida Y., Kajiyama H., Yamamoto E., Shibata K., Terauchi M., Nawa A., Akimoto H., Takikawa O., Isobe K. und Kikkawa F. (2008).** Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res*; 14: 7251-7259.

7. Danksagung

Das Verfassen einer Danksagung eröffnet mir nun die Möglichkeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich während meiner Arbeit an dieser Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Däubener für das Überlassen des Dissertationsthemas und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Ich möchte hierbei insbesondere die vertrauensvolle Zusammenarbeit betonen und mich auch für seine stete Ansprechbarkeit und kontinuierliche Erreichbarkeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertationsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anzufertigen.

Ich danke Frau Prof. Dr. A. Tenter, Tierärztliche Hochschule Hannover, für die Bereitstellung von Probenmaterial zur Analyse.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Katrin Spekker-Bosker und Vanessa Ince für die fundierte Einarbeitung in das Thema, sowie Dr. Silvia Eller und Dr. Margret Leineweber für die Möglichkeit fachlicher Diskussionen bedanken. Weiterhin danke ich Julia Nau, Sabine Pudelko und Silke Stuhlsatz für die Bereitstellung von Probenmaterialien und für gute Ratschläge.

Mein Dank gilt dem gesamten Institut für eine kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich ununterbrochen unterstützt und stets ermutigt.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Westerstede, den

Johannes Martin Wenning