

# **Analyse der Immunantwort gegen intra- zelluläre Pathogene in der mGBP2- defizienten Mauslinie**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Tim Andreas Mehlhorn**

aus Neuss

**Düsseldorf, Januar 2018**

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

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

Berichterstatter:

1. Univ.- Prof. Dr. Klaus Pfeffer
2. Univ.- Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2018



# INHALTSVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Biologie der Apicomplexa.....	1
1.1.1	Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	4
1.1.2	Stämme und Vorkommen von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.1.3	Medizinische Bedeutung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
1.1.4	Stadienkonversion von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	13
1.2	Immunsystem.....	17
1.2.1	Angeborenes Immunsystem.....	18
1.2.2	Adaptives Immunsystem.....	22
1.2.3	T-Zellen.....	24
1.2.4	Interferon induzierte GTPasen.....	26
1.2.5	Biologische Funktion von mGBP2.....	30
1.2.6	Immunantwort bei Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	34
1.3	Virusinfektionen.....	36
1.3.1	Lymphozytärer Choriomeningitis Virus (LCMV).....	36
1.3.2	Vesikulärer Stomatitis Virus (VSV).....	37
1.4	MHC - Multimere und deren Anwendung in der Immunbiologie.....	37
1.5	Fragestellung.....	39
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	41
2.1	Verwendete Materialien.....	41
2.1.1	Computersoftware.....	41
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	41
2.1.3	Enzyme.....	44

# Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Geräte .....	45
2.1.5	Kits .....	46
2.1.6	Stammlösungen und Puffer .....	46
2.1.7	Antikörper und Pentamere .....	48
2.1.8	Primer .....	49
2.1.9	Laborverbrauchsmaterialien .....	51
2.2	Zellbiologische Methoden .....	52
2.2.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	52
2.2.2	Kultivierung Humaner Vorhaut- Fibroblasten (HFF) .....	52
2.2.3	Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 .....	53
2.2.4	Induktion der Stadienkonversion von <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 <i>in vitro</i> .....	53
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	54
2.3.1	Herstellung von Protein - Lysat aus <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 .....	54
2.3.2	Isolation der RNA aus Organgewebe .....	54
2.3.3	Isolation der RNA aus der Zellkultur .....	55
2.3.4	Isolation der DNA aus Organgewebe .....	56
2.3.5	Synthese der cDNA .....	57
2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	58
2.3.7	Quantitative Taq- Man Real-Time Polymerase- Kettenreaktion (Taq-Man qRT-PCR) .....	59
2.3.8	Quantitative Sybr-Green Real-Time Polymerase- Kettenreaktion (Sybr-Green qRT-PCR) .....	60
2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese .....	61
2.3.10	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	62
2.3.11	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	65
2.3.12	Bestimmung des Titers von LCMV .....	66
2.4	Tierversuche .....	67
2.4.1	Versuchstiere .....	67

# Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Präparation der Gewebezysten aus CD-1 Mäusen .....	67
2.4.3	Infektion der Versuchstiere mit <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 .....	69
2.4.4	Infektion von Mäusen mit LCMV .....	69
2.4.5	Infektion von Mäusen mit VSV .....	70
2.4.6	Bestimmung der Mortalitätsrate .....	70
2.4.7	Euthanasie der Versuchstiere .....	70
2.4.8	Herstellung von Blutserum .....	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>73</b>
3.1	Letalitätsrate der mGBP2- defizienten Mauslinie bei Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 .....	73
3.1.1	Die mGBP2 <sup>-/-</sup> Mauslinie zeigte eine erhöhte Sterblichkeit bei einer Infektion mit 20 Zysten <i>T.gondii</i> ME49 .....	73
3.1.2	Die mGBP2 <sup>-/-</sup> Mauslinie zeigte eine signifikant erhöhte Sterblichkeit bei einer Infektion mit 40 Zysten <i>T.gondii</i> ME49 .....	74
3.2	Vergleichende Untersuchungen des <i>T.gondii</i> ME49 Infektionsverlaufs <i>in vivo</i> .....	75
3.3	Durchflusszytometrische Studien der T-Lymphozytären Immunantwort bei Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 .....	82
3.3.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl der T- Zell Immunantwort .....	82
3.3.2	Untersuchungen zur <i>Toxoplasma gondii</i> ME49 spezifischen T- Zell Antwort..	84
3.4	Extensive Analyse der pro- sowie anti-inflammatorischen Zytokine und Effektor-Moleküle .....	89
3.4.1	Untersuchungen der Genexpression und proteinbiochemische Analyse der Infektion mit 20 Zysten <i>T.gondii</i> ME49 .....	90
3.4.2	Untersuchungen der Genexpression und proteinbiochemische Analyse der Infektion mit 40 Zysten <i>T.gondii</i> ME49 .....	103
3.5	Immunantwort bei Infektion mit weiteren intrazellulären Pathogenen .....	115
3.5.1	Untersuchungen der Immunantwort der mGBP2 -defizienten Mauslinie bei einer Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) Infektion .....	115
3.5.2	Infektion der mGBP2-defizienten Mauslinie mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) .....	119

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	123
4.1	Die Abwesenheit von mGBP2 führt zu erheblichem Anstieg der Letalität nach Infektion.....	124
4.2	Stadienkonversion im 20 Zysten Infektionsmodell bei mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen ist deutlich messbar .....	126
4.3	Analysen der T- Zell Immunantwort in mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	129
4.3.1	Antigenpräsentation via MHC I Präsentationsweg ist funktional in mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen	129
4.3.2	Antigenpräsentation via MHC II ist funktional - CD4 <sup>+</sup> T- Zellen sind in Abwesenheit von mGBP2 funktionsfähig.....	131
4.4	Die Genexpression von pro- und anti- inflammatorischen Zytokinen wird in der mGBP2 defizienten Mauslinie stark induziert.....	133
4.5	mGBP2 ist nicht essentiell in der Immunabwehr gegen LCMV und VSV .....	139
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	142
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	144
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	146
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	148
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	176
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	179
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	180

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom; “ <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ”
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	Bradyzoit Antigen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BMDM	Knochenmarksmakrophagen; <i>bone marrow derived macrophages</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	Cluster of Differentiation
cDC	konventionelle Dendritische Zelle
cDNA	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
CFU	colony forming units
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DSIgM-ELISA	Double-sandwich IgMELISA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ENO	Enolase
EtOH	Ethanol

## Abkürzungsverzeichnis

ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GAS	IFN- $\gamma$ activated site
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSP	Hitzeschockprotein
i.p.	intraperitoneal
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IFNGR	IFN- $\gamma$ Rezeptor
IIFT	Immunfluorescence Test
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IRF	interferon regulatory factor
IRG	immunity-related GTPase
IRF-1	IFN regulated factor-1
ISG	IFN stimulierte Gene
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response elements</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid

## Abkürzungsverzeichnis

LCMV	Lymphozytärer Choriomeningitis Virus
LT	Lymphotoxin
M	Molar
MEF	muriner embryonaler Fibroblast
MΦ	Makrophage
min	Minute(n)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	Pathogen-assoziiertes Muster; <i>pathogen associated molecular pattern</i>
p.i.	nach Infektion (post infection)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Phox	Phagozyten Oxidase
PRR	pattern recognition receptor
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
qCRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
REIA	Reverser Enzym Immunassay
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Raumtemperatur
SAG	Oberflächenprotein von <i>T.gondii</i> ME49; <i>surface antigen</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SNP	Natriumnitroprussid; <i>sodium nitroprussid</i>
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat Lösung

## Abkürzungsverzeichnis

STAT1	Signal Transducers and Activators of Transcription 1
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
µl	Mikroliter
Ü/N	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation
VLIG	Sehr große induzierbare GTPase; <i>very large inducible GTPase</i>
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

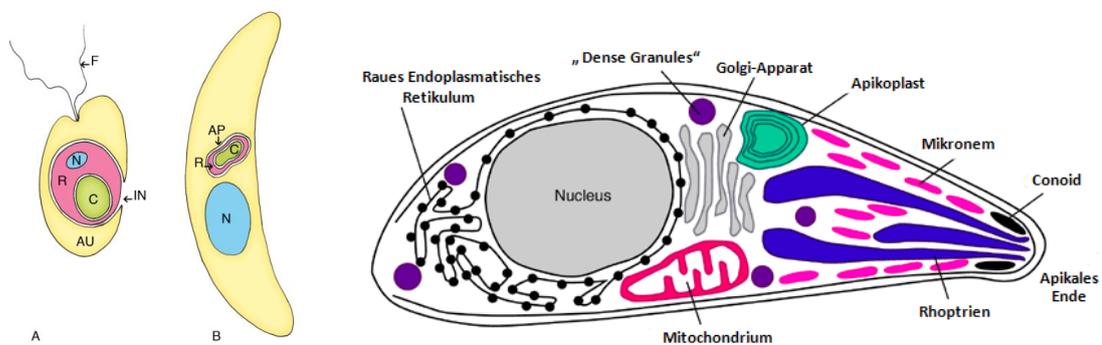


# 1 EINLEITUNG

## 1.1 BIOLOGIE DER APICOMPLEXA

Die Apicomplexa stellen eine zu den Eukaryoten gehörende Gruppe von Protozoen dar, deren Mitglieder ausnahmslos obligat intrazellulär lebende Parasiten sind. Besonders weit verbreitete und wichtige Vertreter sind der Erreger der Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii* und die Erreger der Malaria (*Plasmodium* -Arten) (Dubey et al., 1970; Hu et al., 2006). Die Apicomplexa bieten darüber hinaus eine breite Variabilität und Vielzahl von Krankheitserregern. Wegen ihrer hohen Pathogenität stellen sie die heutige Humanmedizin vor große Aufgaben.

Ein wesentliches Charakteristikum der beweglichen Stadien dieses Stammes ist ihr Apikal-komplex, der sich, wie der Name verrät, in der vorderen Spitze des Organismus befindet (Hu et al., 2006).



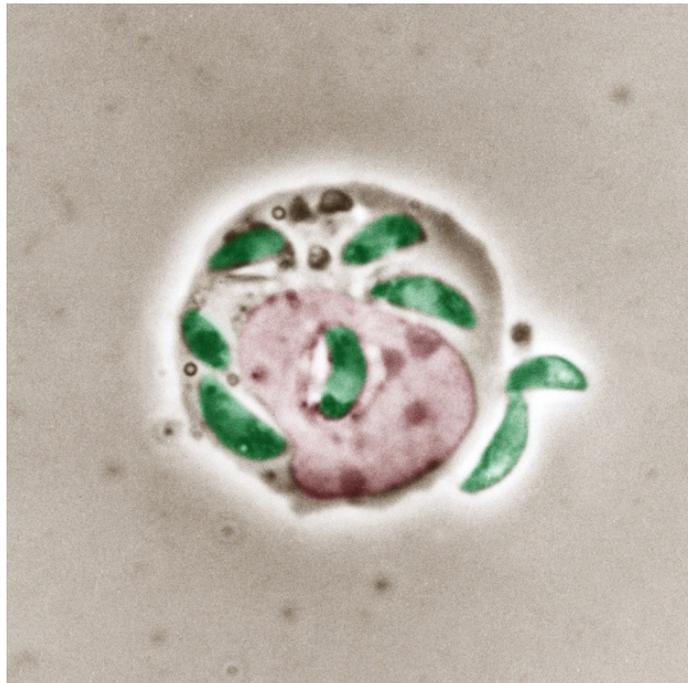
**Abbildung 1.1: Morphologie der Apicomplexa:**[A] Schema eines autotrophen Protisten (gelb) der einen Organismus mitsamt Chloroplast (C), welcher ursprünglich zu den Rotalgen (R) zählte, umschließt; [B] Schema eines motilen Stadiums der Apicomplexa (Merozoiten, Sporozoiten, Tachyzoiten, Bradyzoiten). Es wird angenommen, dass aus der Rotalge und dessen Chloroplast sich im Verlauf der Evolution der Apicoplast (AP) mit seinen 4 Membranen der Apicomplexa bildete; diese umfassen z.B. *Toxoplasma gondii* sowie Arten der Gattung *Plasmodium*, *Sarcocystis*, *Eimeria* und *Isospora*. F Flagellum, N Nucleus, IN Invagination der Rotalge; [C] Schema von motilem Stadium von *T.gondii*, nach [http://www.Laborwissen.de/wiki/img/wiki\\_up/Toxo\\_ultrastructure.gif](http://www.Laborwissen.de/wiki/img/wiki_up/Toxo_ultrastructure.gif).

Dieser besteht aus einem Polarring am apikalen Pol des Einzellers, einem Conoid, zahlreichen Mikronemen und Rhoptrien. Mikronemen sind wichtig für die Anlagerung und Penetration und die Ausbildung der Parasitophoren Vakuole (PV) innerhalb der Wirtszelle (Walker et al., 2014).

Die PV wird gleichermaßen bei Befall der Wirtszellen durch motile Stadien von *Toxoplasma*, *Plasmodium* und *Leishmania* ausgebildet. Die Wirtszellmembran bildet die äußere Schicht

und die Zellmembran des Parasiten bildet die innere Schicht der PV (Joiner et al., 1996; Lingelbach und Joiner, 1998; Virreira Winter et al., 2011). So räumlich geschützt, zum Beispiel vor Azidifizierung durch Lysosomen, kann sich der Parasit mittels seiner sekretorischen Organellen den Metabolismus der Wirtszelle zu Nutze machen und sich vermehren (Blader und Saeij, 2009; Zhao et al., 2009).

Bei den Rhoptrien handelt es sich um sekretorische Organellen: ihnen werden Funktionen in der Ausbildung der PV zugeschrieben. Außerdem können sie durch Exkretion von Proteinen den Metabolismus der Wirtszelle auf die Bedürfnisse des Parasiten ausrichten und zum Schutz vor der intrazellulären Immunabwehr beitragen (Dubremetz, 2007). Das vorstülpbare Conoid und der Polarring sind Tubulin-Polymere und tragen zur Stabilität des Apikalkomplexes bei (de Souza und Souto-Padron, 1978; Del Carmen et al., 2009). Die Funktion ist die Unterstützung der aktiven Invagination der Wirtszellmembran mit anschließender Ausbildung der PV (Abb. 1.2 und 1.3).



**Abbildung 1.2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten mit intrazellulären und extrazellulären Tachyzoiten (grün) von *T.gondii* ME49;** Man erkennt gut die bereits eingedrungenen Tachyzoiten. Diese liegen in der ihrerseits ausgebildeten Parasitophoren Vakuole in der Wirtszellmembran und nicht, wie viele Pathogene intrazellulär im Zytosol. Durch die Schaffung eines eigenen, geschützten Bereichs außerhalb der Reichweite der intrazellulären Erregerabwehr erlangen die Parasiten einen Vorteil gegenüber dem Wirt. Es wird auch deutlich, dass mehrere Parasiten dieselbe Zelle befallen können. Nach Mehlhorn 2017

Die motilen Stadien der Apicomplexa werden Sporozoitien genannt. Hierzu zählen bei *T.gondii* die Tachyzoiten, Bradyzoiten, Merozoiten und Cystozoitien. All jene Stadien verfügen über einen speziellen, für sie essentiellen Plastid, den Apicoplast (Abb.1.3) (Kohler, 2005). Dieser Plastid besitzt vier Membranen, derer inneren zwei Membranen von Algen der

Ordnung *Dinoflagellata* abstammen. Somit wird angenommen, dass der Apicoplast im Laufe der Evolution durch sekundäre Endosymbiose entstanden ist. Das Organ besitzt ein eigenes Genom, hat aber die Fähigkeit zur Photosynthese verloren. Bekannte Funktionen des Apicoplasts sind die Bereitstellung von Isoprenoiden, Fettsäuren und Eisen-Schwefel-Clustern für das jeweilige Parasitenstadium (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass der Transport dieser Moleküle über die äußeren, periplastidischen Membranen über einen angepassten Endoplasmatisches Retikulum- assoziierten Degradation (ERAD)-assoziierten Signalweg gesteuert wird (Agrawal et al., 2009; Spork et al., 2009). Dieser ist ansonsten an der Überprüfung der Faltung von Proteinen und der anschließenden Degradierung von falsch gefalteten Proteinen beteiligt (Friedlander et al., 2000).



**Abbildung 1.3: Längsschnitt durch das apikale Ende eines extrazellulären Tachyzoiten von *T.gondii*.** Das Conoid ist vorgestülpt (grau, länglich). Es dient zur aktiven Eindellung und zum Eindringen in die Wirtszellmembran. Rhoptrien (braun); Mitochondrien (grün); Apicoplast (blau); nach Mehlhorn 2017.

Der Transport der Moleküle über die beiden inneren Membranen wird über ein abgewandeltes, von Plastiden der Pflanzen bekanntes System, dem Tic/Toc gesteuert (Joiner und Roos, 2002). Berücksichtigt man die evolutionsbiologische Herkunft des Plastiden und die bereits bekannten Funktionen für den Parasiten, ist die Untersuchung der Wirkung von Herbiziden gegen Apicomplexa folgerichtig, um eventuell einen Einsatz bei der Therapie der Malaria und Toxoplasmose zu finden (Coppens, 2013; Corral et al., 2017; McFadden und Roos, 1999; Seeber, 2003). Das gesamte Spektrum der Aufgaben dieser Plastiden ist jedoch noch nicht abschließend ergründet und steht daher auch hinsichtlich der medizinischen Therapie der durch Apicomplexa hervorgerufenen Erkrankungen im Fokus aktueller Forschungen.

Die Mehrzahl der Stadien der Apicomplexa ist haploid und ihre Reproduktion verläuft stets über einen Generationswechsel. Die Gamogonie, die sexuelle Reproduktion durch Verschmelzen von je einem weiblichen und einem männlichen Gameten, findet intrazellulär in der parasitophoren Vakuole einer Wirtszelle des Endwirts statt (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Bei *Toxoplasma gondii* ist dies die Darmepithelzelle der Katze. Die anschließende Sporogonie, welche eine ungeschlechtliche Fortpflanzung durch Teilung darstellt, führt zur Bildung ungeschlechtlicher infektiöser Stadien, die dann mit den Fäzes ausgeschieden werden (Pampiglione et al., 1973; Siim et al., 1969). Nachdem das infektiöse Stadium vom Zwischenwirt aufgenommen wurde, findet die asexuelle Reproduktion statt. Im Folgenden wird vor allem auf die Biologie des Erregers der Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, eingegangen.

## 1.1.1 LEBENSZYKLUS VON *TOXOPLASMA GONDII*

Der Name *Toxoplasma gondii* stammt ursprünglich aus dem Griechischen. Toxon (τόξον, *tóxon*) bedeutet Bogen und Plasma (πλάσμα, *plásma*) bezeichnet Masse oder Gebilde. Der Artnamen *gondii* stammt vom lateinischen Namen der afrikanischen Nagerart Gundi: *Ctenodactylus gundi*, zu Deutsch: Eigentlicher Kammfinger bzw. Gewöhnlicher Gundi. Dieser Erreger wurde 1907 von den französischen Forschern Nicolle und Manceaux beim Gundi entdeckt und beschrieben (Nicolle, 1907; Nicolle et al., 1908). Dennoch blieb der Parasit lange Zeit relativ unbekannt und „von fragwürdiger Natur“ (*doubtful nature*) (Wenyon, 1926). Erst 1948 konnte durch die Entwicklung des auf serologisch auftretende „Antikörper“ beruhenden Dye-Tests die weltweite Verbreitung des Parasiten und die hohe Durchseuchung beim Menschen gezeigt werden (Sabin und Feldman, 1948). Im Jahre 1969/70 konnte dann durch mehrere Arbeitsgruppen, nicht zuletzt mit Hilfe der damals immer leistungsfähiger werdenden Elektronenmikroskopie, der Lebenszyklus erschlossen werden (Abb.1.4) (Dubey et al., 1970; Hutchison et al., 1969; Scholtyseck et al., 1970):

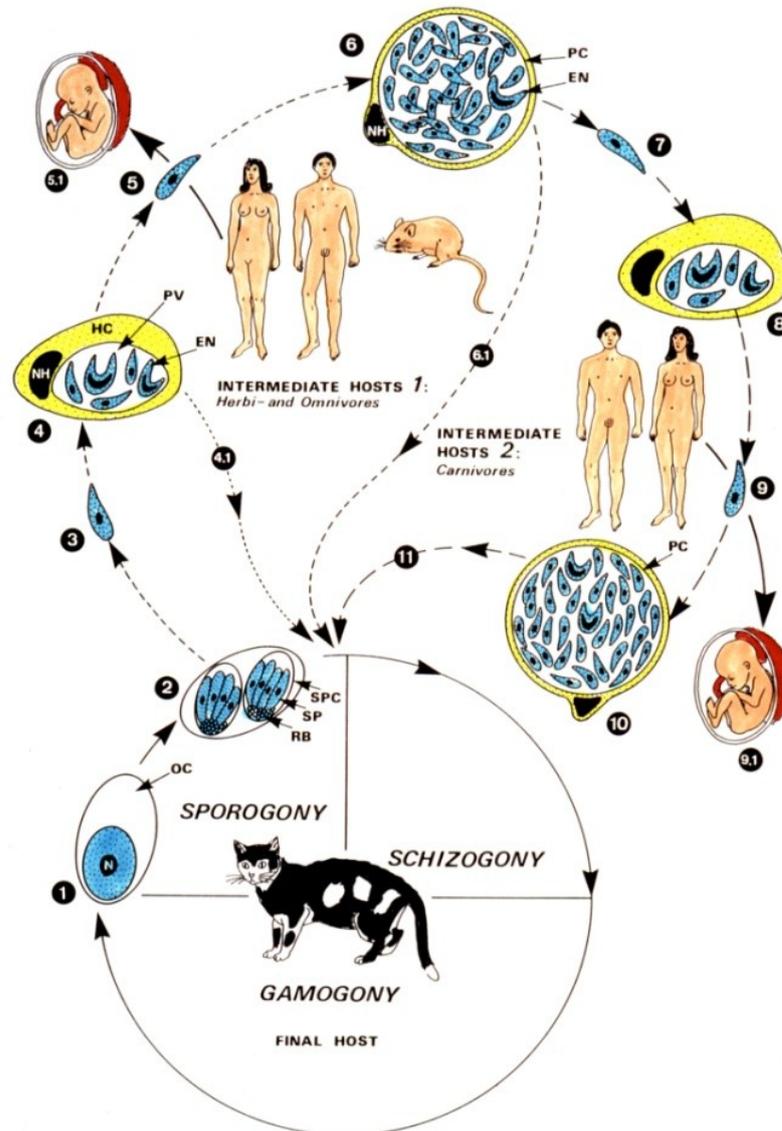
Der Lebenszyklus des in der vorliegenden Dissertation hauptsächlich verwendeten Erregers (*T.gondii*) ist wie bei allen Apicomplexa in eine sexuelle und zwei asexuelle Generationsphasen aufgeteilt. Es handelt es sich um einen Zyklus, der 2 Wirte benötigt. Der Endwirt, in welchem die sexuelle Replikation stattfindet, gehört stets zur Gruppe der Katzenartigen, den *Felidae* (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). In Westeuropa ist die Hauskatze der bedeu-

tendste Wirt und Multiplikator dieses Pathogens. Sobald sie durch Oral-Fäkal-Kontakt mit Oozysten oder durch Aufnahme einer infizierten Maus den Parasiten in Gewebezysten aufnimmt, dringen die Erreger in die intestinalen Epithelzellen des Darmlumens, die Enterozyten, ein. Nach einer einmaligen ungeschlechtlichen Vermehrung (Schizogonie) findet die Gamogonie statt (Abb.1.4). Die hieraus entstehenden, noch unsporulierten, ca.  $12 \times 10 \mu\text{m}$  großen Oozysten werden mit den Fäzes ausgeschieden. Katzen, die sich zum ersten Mal mit dem Pathogen infizieren, scheiden im Durchschnitt für die Dauer von 11 Tagen Oozysten aus (Hutchison et al., 1971) (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Anschließend, im Falle einer Zweitinfektion, ist das Immunsystem bei einer immunkompetenten Katze in der Lage den Lebenszyklus zu unterbrechen: Es werden keine Oozysten mehr ausgeschieden. Im Allgemeinen verläuft eine *T.gondii* Infektion bei ansonsten gesunden Katzen nahezu asymptomatisch. Dennoch sind bei Katzen, die Kontakt zum Erreger hatten, oft auch Zysten im Gehirn und Muskelgewebe vorzufinden. In den ausgeschiedenen Oozysten bilden sich temperaturabhängig innerhalb von 4-7 Tagen zwei Sporozysten aus, welche je vier Sporozoiten entwickeln. Die nun sporulierten Oozysten sind in der Lage, mehrere Monate in der Umwelt zu überleben und stellen daher eine ständige Infektionsquelle dar (Dubey, 1992). Werden diese Oozysten von einem Zwischenwirt aufgenommen, startet die asexuelle Reproduktion von *Toxoplasma gondii*. Als Zwischenwirt kommt die Mehrheit der Vertebraten in Frage, wobei die meisten allerdings Fehlwirte sind. In einem solchen Fehlwirt kann es zwar zur Infektion kommen und die Toxoplasmen können sich reproduzieren sowie persistieren, es kommt jedoch nicht zu einem Abschluss des Lebenszyklus, da die Aufnahme von infiziertem Gewebe solcher Wirte durch die Katze nicht stattfindet. Die aus menschlicher Sicht wichtigsten Fehlwirte sind das Schwein und der Mensch selbst.

Der eigentlich angestrebte Zwischenwirt sind die Maus und andere Nager. Nach vorwiegend oral-fäkaler Aufnahme der Oozysten passieren die meisten Parasiten unbeschadet den Magen. Im Darm rupturiert die Oozyste und die Sporozoiten infizieren durch aktive Eindellung der Zellmembran umgehend die Zellen des Wirtes (Morisaki et al., 1995; Sibley, 2011). Hierbei können potenziell alle Zellen, die einen Nukleus beinhalten, infiziert werden. Bevorzugt werden jedoch Makrophagen und Fibroblasten befallen.

Der nächste Schritt im Lebenszyklus von *T. gondii* ist die Ausbildung der parasitophoren Vakuole (PV) durch die motilen Stadien während der Infektion einer Wirtszelle in einem selbst gesteuerten, aktiven und phagozytoseunabhängigen Prozess (Drewry und Sibley, 2015; Dubremetz, 2007; Sibley und Andrews, 2000; Smith, 1995). Die Invasion des Erregers in die

Membran der Wirtszelle dauert lediglich 15 Sekunden, ist aber aus mehreren Schritten zusammengesetzt. Zunächst lagert sich das Pathogen mittels sogenannter *moving junctions* bzw. *tight junctions*, welche eine ringförmige Struktur bilden, an die potentielle Wirtszelle an. Nun stülpt der Parasit die Zellmembran der Wirtszelle ein und gleitet mit Hilfe seines Aktin-Myosin Zytoskeletts in die entstandene Vakuole ein. Sobald die Zellmembran dann den Parasiten komplett umschließt, wird dieses Gebilde als Parasitophore Vakuole bezeichnet. (Dlugonska, 2005). Unmittelbar nach Ausbildung der PV entwickeln sich aus dem Sporozoi-ten zwei Tachyzoiten (Abb.1.3), welche charakteristisch für die akute Phase der Infektion im Zwischenwirt sind. Dieses Kompartiment erlaubt es dem Parasiten, sich vor dem Immunsystem weitestgehend geschützt zu vermehren (Abb.1.2). Des Weiteren kann der Parasit durch Sekretion von Proteinen aus der PV ins Zytoplasma der Wirtszelle Einfluss auf den Metabolismus derselben nehmen. Hierbei wird deren Genexpression auf den Bedarf des Parasiten umgestellt und Nährstoffe werden zur PV geleitet (Dlugonska, 2005). Durch die Umstellung des Metabolismus der Wirtszelle auf die eigenen Bedürfnisse wird der Parasit sehr gut mit Nährstoffen versorgt und kann sich so sehr schnell vermehren. Die Tachyzoiten teilen sich alle 6 bis 9 Stunden und führen hierdurch zu einer rapide ansteigenden Infektionslast. Die infizierten Tiere zeigen erkältungsartige Symptome bis hin zur Apathie. Abhängig von der Pathogenität des *Toxoplasma*- Stamms und der Infektionsdosis können die exponentielle Ver- vielfältigung und die damit einhergehende Zerstörung von Zellen auch zum Tode führen (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017).

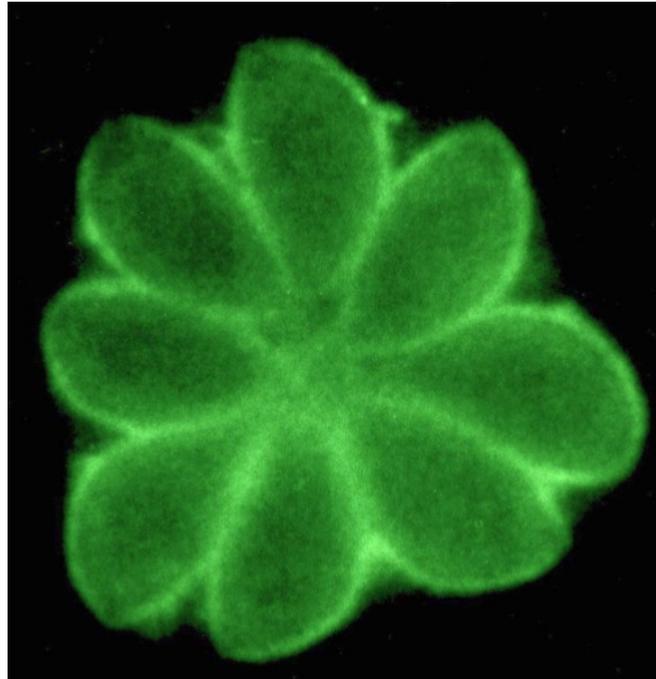


**Abbildung 1.4: Lebenszyklus von *T.gondii*.** Die Infektion des Endwirts (Final Host) geschieht über die Aufnahme von Oozysten (2), „Pseudozysten“(8) oder Bradyzoiten beinhaltende Gewebezysten (6,11). Die Oozysten werden vom Endwirt unsporuliert ausgeschieden (1). Bei der folgenden Sporulation entstehen aus 2 Sporozysten 4 Sporoziten (2). Nach oraler Aufnahme der Oozysten durch den Zwischenwirt und Passage des Magens, werden die Sporoziten im Darm freigesetzt und verlassen den Darm (3). Das sich schnell teilende Stadium der Sporoziten, die Tachyzoiten, infiziert eine Vielzahl von Wirtszellen, repliziert durch Endodyogenie und bildet sog. „Pseudozysten“(4). Diese Phase stellt die akute Phase der Erkrankung dar. Ungefähr 14 Tage post Infektion kommt es zur Stadienkonversion mit sich langsam teilenden Stadium, dem Bradyzoiten. Dieses Stadium der chronischen Infektionsphase ist in der Lage in Gehirn- und Muskelgewebe Gewebezysten zu bilden (6). Sofern diese Zysten mit Fleisch des Zwischenwirts (ZW) vom Endwirt aufgenommen werden, entwickeln sie sich zu Schizonten (6.1). Im Fall der Aufnahme durch andere Wirte findet die Vermehrung über Pseudozysten statt, woraus sich wieder zuerst Tachyzoiten, dann Bradyzoiten und später Gewebezysten entwickeln (7-10). Diaplazentale Übertragung der Erreger ist bei Erstinfektion vieler ZW möglich (5.1. und 9.1).

EN=Endodyogenie; HC=Wirtszelle; HN=Nucleus der Wirtszelle; OC= Oozyste; PC= Primäre Zystenwand; PV= Parasitophore Vakuole; RB= Restkörper; SP= Sporozoit; SPC= Sporozyste; ZW= Zwischenwirt. Nach Mehlhorn, 2017.

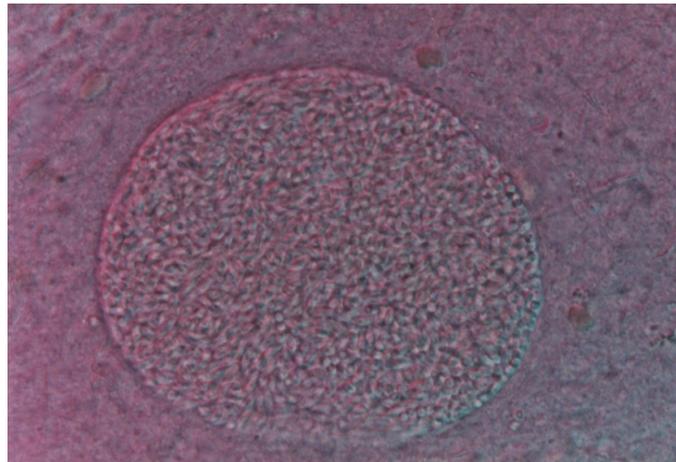
Die Art der ungeschlechtlichen Reproduktion innerhalb der PV wird Endodyogenie genannt (van den Zypen und Piekarski, 1968). Hierbei entstehen zwei Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle. Diese Art der Zellteilung ist einerseits kennzeichnend für Sporozoiten von *T.gondii*, allerdings auch bei verwandten Arten (*Sarcocystis* etc.) anzutreffen. Häufig nehmen Parasiten die *in vitro* kultiviert werden, innerhalb der PV eine Rosetten-ähnliche Position ein

(Abb.1.5) (Masihi und Werner, 1976). Nachdem sich der Parasit innerhalb der PV in einer Wirtszelle vielfach reproduziert hat, platzt diese, auch als Pseudozyste bezeichnete Wirtszelle auf und die neu entstandenen Tachyzoiten infizieren weitere Wirtszellen. Im immunkompetenten Zwischen- oder Fehlwirt übt die Reaktion des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems Stress auf den Parasiten aus.



**Abbildung 1.5: Intrazelluläre Tachyzoiten in einer Wirtszelle.** Die Rosetten-artige Anordnung der Parasiten ist deutlich zu erkennen. Es wurde das Oberflächenprotein Surface Antigen 1 (SAG-1) von *T.gondii* mit einem Fluoreszenz gekoppelten Antikörper inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Nach David Sibley, Quelle: [http://sibleylab.wustl.edu/images/SAG1\\_Rosette.jpg](http://sibleylab.wustl.edu/images/SAG1_Rosette.jpg)

Dadurch kommt es zu einer Stadienkonversion, bei welcher aus den sich sehr schnell teilenden Tachyzoiten das Stadium der sich langsam teilenden Bradyzoiten hervorgeht. Dieses Zystenstadium ist charakteristisch für die einsetzende chronische Phase der Infektion. In dieser Phase entstehen vor allem im Nervengewebe wie dem Gehirn oder Muskelgewebe die Bradyzoiten-beinhaltenen Gewebezysten (Abb.1.6). Diese können im immunkompetenten Wirt lebenslang persistieren (Sullivan und Jeffers, 2012). Es gibt allerdings Untersuchungen, die belegen, dass mit *T.gondii* infizierte Mäuse Verhaltensänderungen aufweisen. So zeigten infizierte Mäuse weniger Angst vor dem Urin von Katzen (Flegr, 2011). Somit ist eine Maus potenziell weniger vorsichtig und wird daher mit einer höheren Wahrscheinlichkeit vom Endwirt des Parasiten erlegt. Diese Verhaltensweise erhöht die Chancen, dass der Lebenszyklus des Parasiten zu Ende geführt und seine weitere Verbreitung gewährleistet wird.



**Abbildung 1.6: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Gewebezyste mit Bradyzoiten im Inneren.** Gewebezysten werden überwiegend von *T.gondii* des Typs II gebildet. Sie entstehen im Gehirn und Muskelgewebe des Zwischen- und Endwirts. Sie sind Dauerstadien des Parasiten im Wirt und können lebenslang persistieren; nach Enzyklopädie der Parasiten, 2017.

Nimmt ein Fehlwirt infiziertes rohes Fleisch oder Oozysten bzw. Tachy- oder Bradyzoiten auf oral-fäkalem Wege auf, so durchläuft der immunkompetente Wirt die akute Phase der Infektion. Bis auf leichte grippeartige Beschwerden bleibt er weitestgehend symptomfrei. In der chronischen Phase bilden sich auch im Fehlwirt Zysten in den Muskel- und Nervenzellen, die lebenslang persistieren können und zu einer Reaktivierung in der Lage sind, sofern das Immunsystem eines infizierten Menschen durch eine Organtransplantation, Chemotherapie oder durch das Ausbrechen des „*acquired immunodeficiency syndrome*“ (AIDS) im Zuge einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV), supprimiert wird (Dubey, 1998; Oksenhendler et al., 1994; Pereira-Chioccola et al., 2009).

## 1.1.2 STÄMME UND VORKOMMEN VON *TOXOPLASMA GONDII*

Die Diversität der Stämme bei *Toxoplasma gondii* ist sehr groß. Grundsätzlich können die Stämme absteigend nach ihrer Virulenz bei Labormäusen, basierend auf der mittleren letalen Dosis (LD50), eingeordnet werden (Sibley et al., 2002). Diese beschreibt die benötigte Menge der applizierten oder aufgenommenen Parasiten, bei welcher 50% der Versuchstiere versterben. So ergeben sich 3 Klassen. Die erste Klasse, **Typ I** genannt, zeigt die höchste Virulenz. Hier reicht bereits die Applikation eines Tachyzoiten aus, um eine Maus innerhalb von 7 Tagen zu töten. Bekannte Stämme sind der RH - Stamm und der BK- Stamm (Bohne et al., 1993; Saeij et al., 2005a; Saeij et al., 2005b). Sie zeichnen sich durch eine hohe Replikations-

rate aus und können durch Sekretion von eigenen spezifischen Proteinen die Immunantwort der Wirtszelle nahezu vollständig inhibieren. Wie Fentress et al., 2010 zeigen konnten, wird von Tachyzoiten des RH- Stamms das Protein Rhoptry Kinase 18 (Rop18) in das Zytoplasma sezerniert, woraufhin es zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung von GTPasen, unter anderem auch mGBP2, kommt (Fentress et al., 2012; Hermanns et al., 2016; Niedelman et al., 2012). Diese sind im aktiven, nicht-phosphoryliertem Zustand an der Zerstörung der PV beteiligt. Phosphoryliert und somit inaktiv sind sie zwar weiterhin ubiquitär im Zytoplasma verteilt, können ihre anti-parasitäre Funktion aber nicht mehr erfüllen.

Toxoplasmen des **Typ II** sind weit weniger virulent. Der bekannteste und in der vorliegenden Dissertation ausschließlich verwendete Stamm ist ME49 (Howe und Sibley, 1995). Die Parasiten sind im Vergleich zum BK- und RH- Stamm gute Zystenbildner. Sofern das Versuchstier keiner zu hohen Infektionsdosis ausgesetzt wird, überlebt das Tier. In der akuten Phase sind bei der immunkompetenten Versuchsmaus keine, bzw. nur leichte grippale Symptome zu erkennen. Das infizierte Tier ist zunächst lediglich ein wenig träger als ein gesundes, verliert aber Gewicht, da es weniger Wasser und Nahrung aufnimmt. Spätestens 14 Tage post Infektion (p.i.) sind die Symptome weitestgehend überwunden und die chronische Phase der Toxoplasmen- Infektion tritt ein. Hierbei bilden sich eine hohe Anzahl von Zysten im Muskel- und Nervengewebe. Auch ist dieser Stamm weniger immunevasiv (Behnke et al., 2012; Zheng et al., 2013). Da der Stamm ME49 eine mittelmäßige Virulenz aufweist und zugleich ein guter Zystenbildner ist, wird er weltweit in vielen immun- und mikrobiologischen Laboratorien verwendet. Die beim Menschen auftretenden Infektionen mit *T.gondii* sind meist durch Stämme des Typs II verursacht (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017) (Boothroyd und Grigg, 2002; Boothroyd und Sibley, 1993).

*Toxoplasma* Stämme vom **Typ III** sind selbstklärende bzw. non- virulente Stämme. Hier ist das Immunsystem des Wirtstieres in der Lage, die Parasiten erfolgreich zu bekämpfen und das Pathogen vollständig, ohne oder nur mit sehr geringer Persistenz, aus dem Organismus zu verdrängen. Die Parasiten werden daran gehindert, Zysten zu bilden und so eine lebenslange Persistenz auszubilden (Hunter und Sibley, 2012) . Infektionen des Menschen mit Stämmen des Typ III werden nur selten berichtet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine recht hohe Dunkelziffer vorliegt, da eine Infektion vom Patienten unbemerkt verlaufen kann.

## 1.1.3 MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON *TOXOPLASMA GONDII*

Die Bedeutung von Infektionen mit Erregern aus der Gruppe der Apicomplexa ist sehr groß. Insbesondere die Erreger der Toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) und der Malaria (*Plasmodium falciparum*) gehören weltweit zu den bedeutendsten Pathogenen: laut WHO gab es im Jahr 2015 weltweit 214 Millionen Malaria- Patienten, wovon 438.000 dem Pathogen zum Opfer gefallen sind.

Verglichen mit den Zahlen der Malaria ist der Erreger der Toxoplasmose dennoch die weltweit häufigste Zoonose des Menschen (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Während die Malaria vorwiegend in den Tropen und Subtropen vorkommt, ist *Toxoplasma gondii* ubiquitär auf dem Globus anzutreffen. Es wird angenommen, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit diesem Erreger latent infiziert ist. Weitere Schätzungen ergaben, dass etwa 60-80 % der über Sechzigjährigen entweder infiziert sind oder zumindest Antikörper gegen *T.gondii* aufweisen (Hill et al., 2005) (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Es existieren verschiedene Infektionswege für den Menschen. So kann die orale Aufnahme von sporulierten Oozysten aus Fäzes oder vom Fell der Katzen erfolgen. Auch kann die orale Aufnahme von Gewebestypen aus infiziertem, rohem oder nicht ausreichend gekochtem Fleisch, wie zum Beispiel Salami, Mett oder roher Schinken, zu einer Infektion führen. Weiterhin sind Fliegen in der Lage, Oozysten von den Fäzes infizierter Katzen auf Nahrung oder Gegenständen des menschlichen Gebrauchs zu transportieren, sodass diese Oozysten durch orale Aufnahme in den Körper gelangen. Weitere wichtige Infektionsquellen sind die intrauterine, diaplazentale und kongenitale Infektion. Bei diesen ist vor allem der Fötus einer Mutter gefährdet, die sich während der Schwangerschaft erstmalig mit *T.gondii* infiziert. Da die Tachyzoiten plazentagängig sind und mütterlicherseits noch keine Immunität vorhanden ist, kann diese Infektion einen besonders schweren Verlauf nehmen (Chintana et al., 1998; Janssen et al., 1970). Es können Symptome wie der „Wasserkopf“ (Hydrocephalus), Kalzifikation und Störungen in der Entwicklung des Nervensystems, wie beispielsweise des Sehnervs, auftreten. Auch Schwangerschaftsabbrüche und Frühgeburten sind nicht selten. Die hieraus resultierenden Komplikationen, wie etwa eine Sepsis, können auch für die schwangere Frau schwerwiegende oder sogar tödliche Auswirkungen haben. Des Weiteren sind Bluttransfusionen mit Blut von infizierten Patienten eine mögliche Infektionsquelle (Shulman, 1994).

In den meisten immunkompetenten Menschen verläuft die Infektion mit *T.gondii* unbemerkt oder es treten nur unspezifische Symptome, wie Abgeschlagenheit, leichtes Fieber, geringfü-

giges Anschwellen der Lymphknoten oder Gliederschmerzen, auf. Diese Symptome sind nach wenigen Wochen wieder auskuriert, sodass der Patient die Infektion mit einem grippalen Infekt oder einer milden Viruserkrankung verwechseln kann. Sobald jedoch das Immunsystem eines Individuums supprimiert ist, profitiert dieser opportunistische Erreger davon. Kommt ein immunsupprimierter Patient erstmalig in Kontakt mit *T.gondii*, so ist er nicht in der Lage, die Infektion ausreichend zu bekämpfen (Basavaraju, 2016). Bei einem bereits infizierten Patienten wird es zu einer Reaktivierung der Parasiten innerhalb der Zysten kommen und aus den dort befindlichen Bradyzoiten bilden sich innerhalb weniger Tage Tachyzoiten, welche dann einen schweren Infektionsverlauf induzieren können (Basavaraju, 2016). Die Symptome der Infektion von Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem unterscheiden sich sehr deutlich von denen mit intaktem Immunsystem. Innerhalb der ersten Wochen der Infektion kann es zunächst ebenfalls zu Grippe-ähnlichen Symptomen kommen, wobei die Lymphknoten anschwellen können. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zu Entzündungen der Iris und des Ziliarkörpers (Iridozyklitis) oder zu Entzündungen der Choroidea unter Beteiligung der Retina (Chorioretinitis) kommen (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Dies bewirkt eine Affektion der Augen mit zum Teil irreversiblen, erheblichen Sehstörungen. Ebenso können andere viszerale Organe durch Entzündungen großen Schaden nehmen. So kann eine Infektion zu einer Entzündung der Leber (Hepatitis), des Herzmuskels (Myocarditis), des Verdauungstraktes (Enterocolitis) oder des Lungengewebes (Pneumonie) führen. Der Tod kann durch Organversagen oder durch eine Sepsis eintreten. Entzündliche Infektionen des Gehirns, z.B. Meningoencephalitis, gehören zum schwersten Verlauf der Infektion, da hierbei irreparabler Schaden entstehen kann und der Patient hat eine hohe Wahrscheinlichkeit zu versterben (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Insgesamt gehören die Infektion mit *T.gondii* und die davon ausgelöste Toxoplasmose zu den 3 häufigsten Todesursachen bei immunsupprimierten Patienten (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017).

Die Diagnose einer Infektion erfolgt über den Nachweis eines *T.gondii*-spezifischen Antikörpers (AK)-Titers von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) im Serum des Patienten (Cesbron et al., 1986; Leinikki et al., 1985). Hierbei lässt sich auch bestimmen, ob es sich um eine Neuinfektion handelt oder ob die Person bereits infiziert war: Sofern sich die für eine klassische Erstinfektion typischen, auftretenden IgM- Antikörper ein hoher Titer nachweisen lässt, deutet dies auf eine kürzlich erworbene Infektion hin. Sind jedoch mehrheitlich IgG-Antikörper nachweisbar, die typischerweise erst einige Wochen nach Erregerkontakt gebildet werden, handelt es sich um eine bereits bestehende Infektion. Zu den häufig verwendeten Nachweismethoden für die IgM-AK gehören der indirekte Immunfluorescence Test

(IIFT), der Reverse enzyme immune assay (REIA) und der double-sandwich IgM-enzyme linked immunosorbent assay (DSIgM-ELISA) (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Der Nachweis der IgG-Ak im Serum wird zumeist ebenfalls durch IIFT oder ELISA geführt. Die Wiederholung des Tests ist indiziert. Besonders ist bei naiven Schwangeren auf eine durchgängige Kontrolle des *T.gondii* spezifischen AK Titer Wert zu legen, sodass im Falle einer Infektion schnell Therapiemaßnahmen ergriffen werden können.

Eine Therapie erfolgt in der Regel erst bei auftretender Immunsuppression des Patienten und den daraus resultierenden, schweren Symptomen der Toxoplasmose, wie Hepatitis, Myocarditis und Encephalitis. Die Standardmethode der medikamentösen Therapie ist die Applikation von chemotherapeutischen Antiparasitika, welche die Folsäuresynthese hemmen, (z.B. Pyrimethamine und Sulfadiazine). Die Dauer der Therapie schwankt zwischen 2-6 Wochen bei postnatal erworbener und 6-12 Monaten bei kongenital erworbener Toxoplasmose (Enzyklopädie der Parasitologie, 2017). Bei immunkompetenten Patienten wird aufgrund der milden und vorübergehenden Symptome in der Regel auf eine Therapie verzichtet. Um sich vor einer Infektion mit *T. gondii* zu schützen kann der Mensch einige Regeln beachten. Da sich in rohem Fleisch von z.B. Schweinen Zysten befinden können, sollte Fleisch vor dem Verzehr vollständig gar sein oder gänzlich gemieden werden. Besitzer von Haustieren, insbesondere Freigänger- Katzen, haben ein besonderes Risiko sich zu infizieren, da die Tiere häufig Kontakt mit Mäusen haben. Hier sollten erhöhte Hygieneregeln ergriffen werden, wie das Händewaschen nach dem Berühren des Haustiers, da sich durch die Körperpflege der Katzen auch leicht Zysten im Fell befinden könnten. Des Weiteren wäre es ratsam bei einer anstehenden Schwangerschaft seinen Immunstatus durch den Arzt untersuchen zu lassen, um erkennen zu können ob der Fötus durch die eigenen AK bereits geschützt sein wird, oder ob ein Risiko der Infektion besteht, welche dann dem Fötus schaden könnte.

### 1.1.4 STADIENKONVERSION VON *TOXOPLASMA GONDII*

Die Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii* stellt einen zentralen Schritt im Verlauf der Infektion im Zwischenwirt dar. Sie wird definiert als die Umwandlung des sich sehr schnell teilenden Stadiums der akuten Phase, den Tachyzoiten, hin zu den sich nur noch sehr langsam teilenden Stadium der chronischen Phase, den Bradyzoiten (Dubey, 1997; Soete und

Dubremetz, 1996). Vor dem Immunsystem sehr gut geschützt, können letztere in einem dormanten Status in Zysten persistieren. Gelegentlich kommt es zur Ruptur einer Zyste und aus den Bradyzoiten entstehen wieder die sich schnell teilenden Tachyzoiten. Diese als Reaktivierung bezeichnete Umwandlung von Brady- zu Tachyzoiten kann, sofern das Immunsystem supprimiert ist, zu einem schweren bis tödlichen Verlauf der Infektion führen (Chew et al., 2012). Der exakte Mechanismus, dem diese Konversion unterliegt, ist noch nicht geklärt, steht aber im Mittelpunkt aktueller Forschung. Bei *in vitro* Versuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass sich die Stadienkonversion durch äußere Einflüsse, wie dem Ausüben eines Hitzeschocks, induzieren lässt. Hierzu setzte man Wirtszellen, wie z.B. humane Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts*, HFF), die mit *T. gondii* infiziert wurden, einem Hitzeschock (43°C) aus. Daraufhin exprimiert der Parasit zahlreiche Hitzeschockproteine (HSP), wie HSP30 und HSP70 (Silva et al., 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass HSPs und ähnliche Proteine eine Funktion in der Induktion und Regulierung der Konversion haben. So wird HSP70 sowohl während der Differenzierung vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten als auch im umgekehrten Fall exprimiert, während HSP90 im Bradyzoiten, im Nukleus sowie im Zytosol, angereichert wird. Bei Tachyzoiten hingegen liegt es nur in geringer Menge zytosolisch vor (Angel et al., 2014). Dies ist bereits ein Beispiel dafür, dass sich Tachyzoiten und Bradyzoiten aufgrund ihres Genexpressionsmusters differenzieren lassen. Ob eine Erhöhung der Temperatur *in vivo* für die Stadienkonversion maßgeblich verantwortlich ist, ist nicht endgültig erforscht. Da die meisten Infektionen mit *T.gondii* nahezu asymptomatisch verlaufen und es so im infizierten Körper zu keiner nennenswerten Temperaturerhöhung kommt, ist dies aber eher unwahrscheinlich. Eine weitere, effektive Methode, um die Stadienkonversion *in vitro* auszulösen, ist die Erhöhung des pH-Wertes im Kulturmedium. Eine Inkubation der infizierten Wirtszellen in einem Kulturmedium mit einem alkalischen pH von etwa 8 (anstatt eines physiologischen pH Werts von 7) für 3-4 Tage führt zu einer deutlichen Induktion der Stadienkonversion vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten. Eine Induktion der Stadienkonversion findet sogar dann statt, wenn die nicht-infizierten Wirtszellen vor der Infektion einem alkalischen pH-Wert ausgesetzt werden, zur Infektion dann aber wieder zum physiologischen pH-Wert zurückgekehrt wird. Die effektivste Methode zur Induktion der Stadienkonversion ist das Auslösen von chemischem Stress durch Zugabe des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP). Nach täglicher Zugabe von 70 µM SNP in das Kulturmedium über einen Zeitraum von 8 Tagen haben sich 70-90% der Tachyzoiten zu Bradyzoiten umgewandelt (Ajioka et al., 2007).

Tachyzoiten weisen einen deutlich aktiveren Metabolismus als Bradyzoiten auf. Dies zeigt sich zum Beispiel in der Geschwindigkeit der Reproduktion durch Endodyogenie als auch durch eine erhöhte Aufnahme sowie Abgabe von metabolischen Stoffen (Weilhammer et al., 2012; Weiss und Kim, 2000). Im Falle von Nährstoffmangel, z.B. beim Fehlen der Aminosäure Arginin, verlangsamt sich der Metabolismus der Tachyzoiten und es kommt zur Stadienkonversion (Bohne et al., 1994; Luder und Rahman, 2017). Daher wird vermutet, dass die einsetzende Wirkung des Immunsystems *in vivo* auch zu einer Deprivation der für den Parasiten verfügbaren Nährstoffe führt und somit zur Konversion beiträgt (Luder und Rahman, 2017). Es ist daher nicht verwunderlich, dass dem Immunsystem des Wirtes die größte Bedeutung bei der Induktion der Stadienkonversion zugewiesen wird. Dazu existieren zwei bevorzugte Theorien. Zum einen wird vermutet, dass durch eine effektive, vor allem durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induzierte Immunreaktion in der akuten Phase der Infektion die allermeisten Tachyzoiten eliminiert werden. Nach dieser Theorie würden dann vor allem im Muskelgewebe und im Gewebe des Zentralen Nervensystems die Parasiten überleben, die bereits die Konversion zum Bradyzoiten abgeschlossen oder aber zumindest begonnen haben (Skariah et al., 2010; Suzuki et al., 1989; Suzuki et al., 1988). Die andere Theorie besagt, dass die Immunantwort des Wirtes selbst das wichtigste Signal für die Differenzierung zu Bradyzoiten darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *T.gondii*-infizierten Zellen, wie Astrozyten und Neuralzellen von Ratten oder HFF-Zellen, mit IFN- $\gamma$  die Replikation des Parasiten verlangsamt und die Stadienkonversion einleitet (Suzuki et al., 1989; Suzuki et al., 1988). Insbesondere die IFN- $\gamma$  induzierte Produktion von NO durch die NO-Synthase in der Wirtszelle ist wichtig für die Inhibition der Replikation (Gazzinelli et al., 1991; Gutierrez-Escobar et al., 2008).

Es lässt sich festhalten, dass die Parasiten die Konversion als Reaktion auf äußere und innere Faktoren durchführen. Hierbei scheinen sowohl der Stress, welcher auf die Wirtszelle ausgeübt wird, als auch die zelluläre Immunabwehr den Parasiten direkt betreffend, Bedeutung zu haben. Im Detail ist jedoch nur unzureichend bekannt, welche Faktoren vor allem *in vivo* maßgeblich die Stadienkonversion einleiten und wie der Parasit Signale und Einflüsse aus seiner unmittelbaren Umwelt wahrnimmt und verarbeitet. Es ist jedoch bekannt, dass die Stadienkonversion durch eine zeitlich geordnete Transkription von spezifischen Genen bestimmt wird. So ließen sich mittels der „Seriellen Analysen der Genexpression“ (SAGE) Genprodukte bestimmter Gene jeweils nur in einer distinkten Phase während des Tachyzoiten- oder des Bradyzoiten-Stadiums nachweisen. Hierbei handelt es sich um eine effektive Methode zur

Analyse des Transkriptom einer Zelle (Behnke et al., 2008; Radke et al., 2005; Radke et al., 2001).

Wichtige Gene, anhand derer man die einzelnen Stadien differenzieren kann, werden im Folgenden vorgestellt.

Das Protein „Surface Antigen 1“ (SAG-1) ist, wie Untersuchungen zeigen, eines der wichtigsten Tachyzoiten-spezifischen Oberflächenproteine. Es wird von dem Gen *p30* kodiert und gehört zur Familie der SAG- Proteine, einer Gruppe von Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-gekoppelten Proteinen, die membranständig bei Toxoplasmen zu finden sind (Zinecker et al., 2001). SAG-1 spielt eine wichtige Rolle beim Anlagern des Parasiten an die Wirtszelle und bei der aktiven Penetration der Zellmembran (Robinson et al., 2004). So konnte durch die Applikation von Antikörpern gegen SAG-1 die Anlagerung und Penetration der Wirtszelle erfolgreich inhibiert werden (Angus et al., 2000; Velge-Roussel et al., 2001).

Ein sehr wichtiges und stark exprimierte Bradyzoiten-spezifische Gen stellt das „Bradyzoite Antigen 1“ (BAG-1) dar. Das Genprodukt besitzt ein Hitzeschockmotiv und wird früh in der Entwicklung zum Bradyzoiten messbar (Mahittikorn et al., 2010). Am N- Terminus konnte eine Synapsin Ia-ähnliche Sequenz nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein Phosphoprotein, welches beim Menschen auf synaptischen Vesikeln zu finden ist und somit eine Rolle in der Neurotransmission spielt (Opportunistic Infections; *Toxoplasma*, *Sarcocystis* and Microsporidia; Lindsay, Weiss; Volume 9,2004; Springer Verlag). Es wird vermutet, dass dieses auch für die korrekte Faltung von BAG-1 bei *T.gondii* wichtig ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem BAG-1 ein protektiver Effekt eintritt (Nielsen et al., 2006). Dies zeigt, dass BAG-1 sehr immunogen ist und die Erkennung von *T.gondii* im Immunsystem fördert.

Eine weitere Gruppe von stadienspezifischen Genen sind die Enolasen (ENO-2, ENO-1) (Holmes et al., 2010). Sie katalysieren die Umwandlung von 2-Phosphoglycerin in Phosphoenolpyruvat (PEP) innerhalb der Glykolyse der Parasiten. Beide Proteine befinden sich jedoch hauptsächlich im Nukleus (Ferguson et al., 2002). Sie zeigen eine vergleichbar hohe Substrat-affinität und ihre Genprodukte sind jeweils nur in einem der beiden Stadien nachzuweisen. ENO-2 wird hauptsächlich in Tachyzoiten und ENO-1 in Bradyzoiten exprimiert (Ferguson et al., 2002). Für das im metabolisch aktiveren Tachyzoiten vorkommende ENO-2 wurde eine 3-fach erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu ENO-1 nachgewiesen. ENO-1 zeigt jedoch mit einer erhöhten Denaturierungstemperatur eine höhere Hitzeresistenz. Es wird ver-

mutet, dass dies eine Anpassung des Parasiten im Dauerstadium ist, um die Stressresistenz potentiell zu erhöhen und somit das Überleben wahrscheinlicher zu machen (Ruan et al., 2015). Da Enolasen in anderen Organismen regulierend auf die Transkription von Genen einwirken, ist nicht auszuschließen, dass sie diese Aufgabe auch im Genom von *T.gondii* innehaben (Mouveaux et al., 2014).

Die Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten und die Reaktivierung der aus rupturierten Zysten freiwerdenden Bradyzoiten zu Tachyzoiten sind somit hoch komplexe Vorgänge, deren Verlaufs- und Steuerungsmechanismen noch weiterer, intensiver Grundlagenforschung benötigen, gleichzeitig jedoch auch Ansätze bieten können, gezielt Pharmazeutika für eine Therapie der Infektion mit *T.gondii* zu entwickeln.

## 1.2 IMMUNSYSTEM

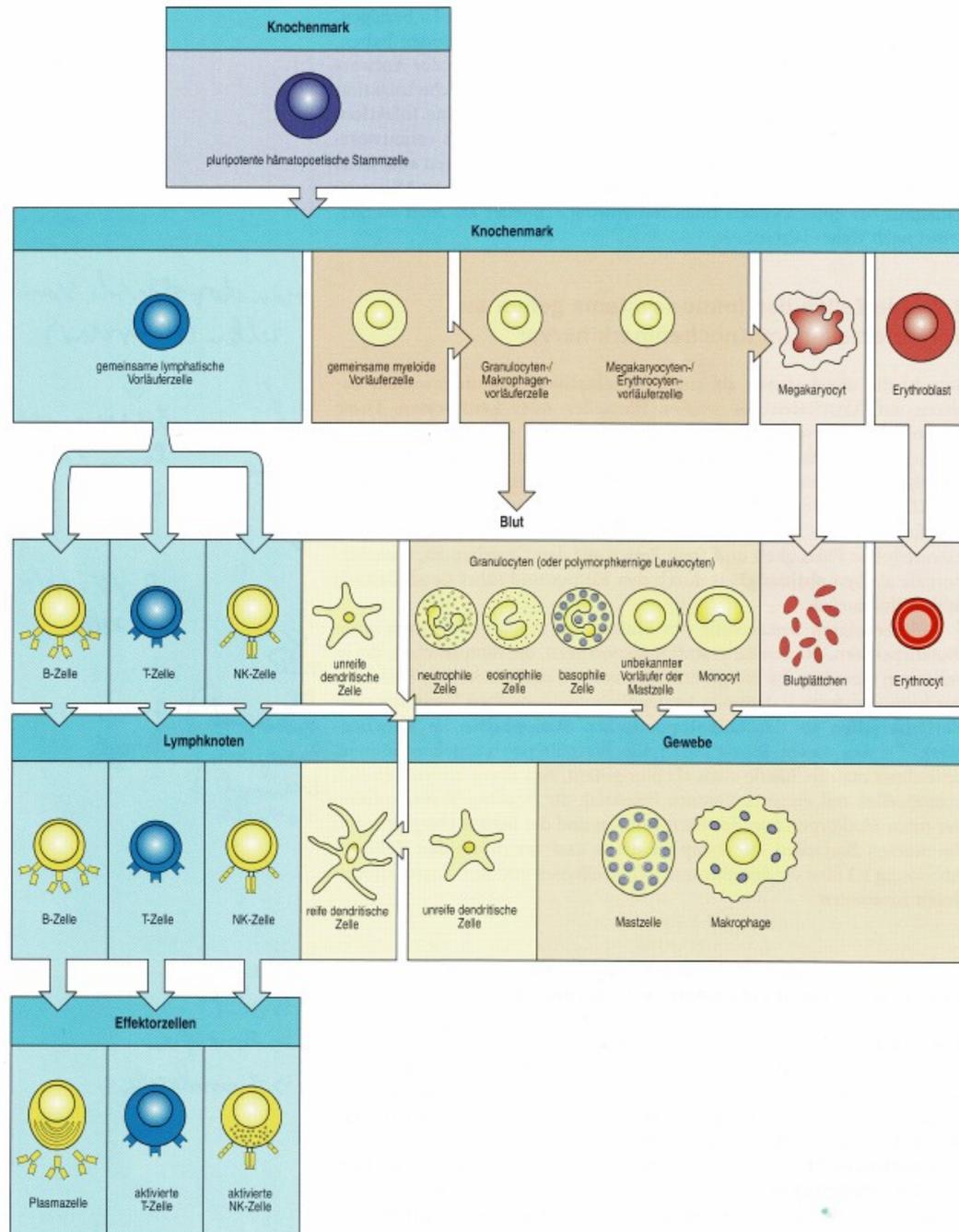
Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk zur Abwehr von Pathogenen, körperfremden, schädigenden Partikeln und entarteten Zellen. Es besteht bei höheren Tieren wie dem Menschen oder der Maus aus einem Portfolio von Organen, speziellen Zelltypen, löslichen Molekülen und Botenstoffen, den sogenannten Zytokinen. Das Immunsystem kann in zwei große Untergruppen gegliedert werden: das angeborene und das adaptive Immunsystem (Janeway, 2009). Für einen Organismus ist die richtige und kontrollierte Funktionsweise dieser Systeme überlebenswichtig, da dieser zu jeder Zeit mit Partikeln und Mikroben aus der Umwelt konfrontiert ist. Kommt es zu einem Defekt und damit zu einer geringen oder überhaupt keiner Immunreaktion, kann dies sehr schnell zum Tod führen. Auf der anderen Seite kann eine sehr heftige Reaktion auf Umweltreize oder gar gegen körpereigene, nicht entartete Zellen zu massiven Problemen führen. Diese „Überreaktion“ äußert sich dann in Autoinflammationserkrankungen wie z.B. Morbus Crohn, wo es zu Entzündungen im Verdauungstrakt kommt, oder in der Entstehung von Allergien. Hierbei reagiert das Immunsystem intensiv auf eigentlich harmlose Antigene (Janeway, 2009).

Das angeborene Immunsystem ist durch eine schnelle, dafür aber unspezifische Immunreaktion charakterisiert. Das adaptive oder auch erworbene Immunsystem fällt durch eine zunächst zeitlich verzögerte Reaktion auf, zeigt dann allerdings eine weitaus spezifischere und daher

effizientere Wirkung. Lange wurden diese beiden Teile des Netzwerks strikt getrennt voneinander betrachtet. Heutzutage ist allerdings bekannt, dass nur durch eine enge Kooperation und Verzahnung der Regulation der Vorgänge eine effektive Immunreaktion erfolgen kann. Die Unterschiede und Interaktion dieser beiden Bestandteile des Immunsystems sollen in den nächsten Kapiteln erörtert werden.

### 1.2.1 ANGEBORENES IMMUNSYSTEM

Die erste Hürde, die Pathogene und körperfremde Partikel überwinden müssen, sind die physikalischen Barrieren. Hierzu zählen beispielsweise die Epidermis, Schleimhäute, die Mundhöhle mit antimikrobiellen Enzymen oder auch der Magen mit der enthaltenen Salzsäure (Janeway, 2009). Ist die Passage dieser den Organismus schützenden Sperren überwunden, tritt das angeborene Immunsystem in Aktion. Es besteht aus zellulären Bestandteilen, den Phagozyten wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen ( $M\Phi$ ), Dendritischen Zellen (*dendritic cells*; DC's) sowie aus Akute Phase Proteinen, dem Komplementsystem und einer Vielzahl an zellulären Botenstoffen, den Chemokinen und Zytokinen (Janeway, 2009). Alle Zellen des angeborenen, aber auch des adaptiven Immunsystems entstammen den sogenannten weißen Blutkörperchen, den Leukozyten (altgriechisch: λευκός *leukós* - weiß; κύτος *kýtos* - Höhlung, Gefäß), welche im Knochenmark entstehen und heranreifen (Janeway, 2009). Die Vorläuferzellen der Leukozyten, aber auch der Erythrozyten und Thrombozyten, sind die hämatopoetischen Stammzellen (Janeway, 2009). Hieraus entwickeln sich dann die zwei Linien der Leukozyten: die lymphatische und die myeloide Zelllinie (Abb.1.7). Die Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln sich mit Ausnahme der Natürlichen Killer (*natural killer*; NK) Zellen hauptsächlich aus der myeloiden Zelllinie.



**Abbildung 1.7: Überblick der zellulären Bestandteile des Blutes inklusive der Lymphozyten der adaptiven Immunantwort.** Die Teilung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle führt einerseits zur Bildung der lymphatischen Vorläuferzelle aus der sich die lymphatische Zelllinie, bestehend aus den B-, T- und Natürlichen Killer- (NK) Zellen, entwickelt. Andererseits kommt es zur Bildung der myeloiden Zelllinie, welche zur Entstehung von Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten führt. (Nach Janeway, 7. Auflage, 2009)

MΦ sind langlebige, phagozytierende Zellen (Janeway, 2009). Sie kommen ubiquitär im Körper vor und differenzieren sich aus Monozyten, nachdem sie die Blutbahn verlassen haben und ins Gewebe eingewandert sind. Hier können sie, wie alle Phagozyten, Zelltrümmer oder Pathogene aufnehmen und so eliminieren. Dazu erkennen sie sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs), wie Lipopolysacchari-

de oder Glykoproteine durch ihre *pattern recognition receptors* (PRRs), zu denen auch die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*; TLRs) gehören (Janeway, 2009). Die PAMPs sind meist für den Fremdorganismus typische und konservierte Muster, die zur Identifizierung der Pathogene durch die Immunzelle herangezogen werden. Nach Erkennung des Fremdorganismus oder Fremdkörpers durch die PRRs wird die Phagozytose eingeleitet. Wurde das Pathogen erfolgreich phagozytiert, werden dessen Epitope über den Präsentationsweg des Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major histocompatibility complex*; MHC; hier durch MHC Klasse II) an der Oberfläche der Immunzelle präsentiert (Janeway, 2009). Diese Antigenpräsentation führt dazu, dass Zellen des adaptiven Immunsystems, die sogenannten T-Zellen, durch Bindung an diese antigen-präsentierenden MHC-Moleküle, aktiviert werden. Monozyten, Makrophagen und DCs als auch die dem adaptiven Immunsystem zugerechneten B-Lymphozyten, werden zu der Gruppe dieser *antigen presenting cells*, kurz APCs gezählt (Janeway, 2009).

Die Granulozyten, bestehend aus den neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen, sind die zweite große Gruppe der Phagozyten des Immunsystems. Vor allem von Neutrophilen und Eosinophilen ist bekannt, dass sie durch Phagozytose von Pathogenen, welche dann in intrazellulären Vesikeln zerstört werden, einen großen Beitrag bei der Immunabwehr leisten.

Die dritte Gruppe der Phagozyten stellen die Dendritischen Zellen (*Dendritic cells*; DCs) dar, welche namensgebende Fortsätze aufweisen. Ihre Aufgabe bei der adaptiven Immunabwehr besteht ebenso wie bei den anderen Phagozyten in der Aufnahme von Pathogenen. Dies können sie einerseits durch Phagozytose oder aber auch durch Makropinozytose durchführen (Sallusto et al., 1995; Savina und Amigorena, 2007). Makropinozytose ist die Aufnahme von Flüssigkeit mit den darin gelösten Substanzen aus der unmittelbaren Umgebung der Zelle (Lim und Gleeson, 2011). Die wichtigste Funktion der DCs ist allerdings nicht die massenhafte Aufnahme und Eliminierung von Pathogenen, sondern die Präsentation von Antigenen über ihre MHC Klasse II Moleküle für die T-Zellen. Hierzu wandern sie nach Aufnahme oder Erkennung von PAMPs über das lymphatische System zu einem Lymphknoten. Dort präsentieren sie die Antigene den dort vorhandenen T-Zellen und aktivieren so die adaptive Immunabwehr. DCs sind darüber hinaus die weitaus effektiveren Zellen für die Aktivierung der T-Lymphozytischen Immunantwort. Im Gegensatz zu Makrophagen sind DCs auch in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und so auf ein bestimmtes Antigen festzulegen. Somit sind die DCs das wichtigste Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr (Janeway, 2009).

Zusätzlich zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort führt die Erkennung von Pathogenen durch PRRs zur schnellen Aktivierung der Immunzellen, wie Makrophagen, DCs und Granulozyten. Dies hat zur Folge, dass Chemokine sezerniert werden, die jeweils weitere Immunzellen aus der Blutbahn zur betroffenen Stelle im Gewebe rekrutieren (Turner et al., 2014; Zhang und An, 2007). Die darauffolgende weitere Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer Erweiterung und Durchlässigkeit der Blutgefäße, lokalen Schwellung und Rötung. Dauert die lokale Bekämpfung des Pathogens lange genug an und kommt es zur ausreichenden Antigenpräsentation durch APCs, tritt zusätzlich zu der relativ unspezifischen angeborenen Immunantwort der spezifische Teil des Immunsystems in Aktion (Janeway, 2009).

Eine weitere Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Natürlichen Killer Zellen (*natural killer*; NK). Dies sind große Zellen mit granulärem Zytoplasma. Sie stammen von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle ab, aus der auch die T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems entstehen (Janeway, 2009). NK-Zellen sind ohne vorherige Stimulation in der Lage Zellen spezifisch zu töten (Vivier et al., 2008). Sie besitzen KIR-Rezeptoren an ihrer Oberfläche, wodurch sie mit intrazellulären Erregern-infizierte Zellen oder entartete Zellen von gesunden Zellen unterscheiden können (Janeway, 2009)(Campbell und Purdy, 2011). Diese Funktion wird durch die sogenannte „Missing self-Hypothese“ beschrieben (Ljunggren und Karre, 1990; Shifrin et al., 2014).

Ein weiterer Teil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem (Carroll, 2004; Sarma und Ward, 2011). Es besteht aus Plasmaproteinen, die sich an extrazelluläre Mikroorganismen heften können und so den Phagozyten aufzeigen, wo sich das Pathogen befindet (Janeway, 2009). Diese können wiederum das Pathogen aufnehmen und zerstören. Der Vorgang des Anheftens wird auch als Opsonierung bezeichnet (Boackle et al., 1998). Teilweise sind die Proteine des Komplementsystems auch alleine zur Zerstörung von Pathogenen fähig. Des Weiteren wirken manche Spaltprodukte des Komplementsystems als Chemokine und sind so in der Lage, die lokale Entzündungsreaktion zu verstärken (Janeway, 2009).

## 1.2.2 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM

Das adaptive Immunsystem besteht aus den B- und T-Lymphozyten, die aus einer Vorläuferzelle der lymphatischen Zelllinie hervorgehen (Janeway, 2009). Es zeigt eine wesentlich spezifischere Immunreaktion gegen das jeweilige Pathogen im Vergleich zum angeborenen Immunsystem (Janeway, 2009). Die adaptive Immunreaktion wird erst durch die Präsentation von den Epitopen der Antigene auf den zum angeborenen Teil des Immunsystems gehörenden APCs aktiviert, wie z.B. bei Makrophagen, DCs oder B- Zellen. (Janeway, 2009). Diese können die zuvor naiv und unstimuliert vorliegenden T- Zellen durch Bindung an den T- Zell Rezeptor (TCR-CD3-Komplex) aktivieren (Morris et al., 1994) (Janeway, 2009). Zusätzlich zu diesem ersten Signal benötigen die T-Zellen kostimulatorische Signale (Signal 2), welche sie durch Bindung an die Membranproteine CD80 oder CD86 auf der Membranoberfläche aktivierter APCs erhalten (Bretscher, 1999; den Haan et al., 2014; Lanier et al., 1995; Rossjohn et al., 2015). Nur sofern diese auf der APC vorhanden sind und sie an die Rezeptoren CD28 oder CTLA4 auf der T- Zell- Membran binden kommt es zu einer Aktivierung der T- Zelle (Bretscher, 1999). Falls diese kostimulatorischen Signale, auch Signal 2 genannt, fehlen, die T- Zelle jedoch mit ihrem T- Zell- Rezeptor an den MHC- Komplex der APC bindet und sich somit reaktiv auf ein körpereigenes Antigen zeigt, kommt es nicht zu einer Aktivierung der T- Zelle, sondern die T- Zelle geht in einen hyporesponsiven Zustand über, der auch als T - Zell- Anergie bezeichnet wird . Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass möglichst wenige T- Zellen gegen körpereigene Antigene reaktiv . Die durch T-Zellen hervorgerufene Immunreaktion wird daher auch als zellvermittelt bezeichnet (Janeway, 2009). Man unterscheidet 2 Klassen von T-Zellen. Die *cluster of differentiation* (CD)  $8^+$  T- Zellen und die  $CD4^+$  T-Zellen (Bernard und Boumsell, 1984a, b; Fiebig et al., 1984).  $CD8^+$  T-Zellen sind zytotoxische Zellen, die in der Lage sind, infizierte Zellen anhand der über den MHC Klasse I Präsentationsweg generierten Epitope an der Membran von APCs oder infizierten Zellen zu identifizieren und zu zerstören. Die  $CD4^+$ -Zellen werden auch T-Helferzellen genannt, da sie regulierende Wirkung durch Sezernierung von Zytokinen, wie beispielsweise die Interferone (IFN), auf die Immunreaktion zeigen (Janeway, 2009(Luckheeram et al., 2012)). Sie dienen darüber hinaus der Aktivierung der B-Lymphozyten. Für deren Aktivierung werden ebenfalls zwei Signale benötigt: einerseits muss ein für das Pathogen spezifisches Antigen an den B-Zell-Rezeptor binden und andererseits muss eine aktivierte T-Helferzelle an den mit dem Pathogen- spezifischen Epitop beladenen MHC Klasse II- Komplex des B-Lymphozyten andocken (Doherty und Zinkernagel, 1975). Nach erfolgter Aktivierung der T-

und B-Zellen kommt es zu einer klonalen Expansion der Zellen (Janeway, 2009(Smith et al., 2000)). Aus den naiven Lymphozyten entsteht der T- bzw. B- Zell-Lymphoblast, welcher sich wiederum in die T- bzw. B- Effektorzelle differenziert. Die Proliferation des jeweiligen Lymphoblasten und der daraus folgenden Entstehung einer Vielzahl Pathogen-spezifisch aktivierter Lymphozyten dauert etwa fünf Tage (Janeway, 2009). Während sich die T-Zellen in dieser Zeit zu  $CD8^+$  oder  $CD4^+$ - T-Zellen differenziert haben, sind die B-Effektorzellen/Plasmazellen in der Lage, antigen- bzw. pathogen- spezifische Antikörper zu sezernieren. Dies ist eine zentrale Funktion der B-Lymphozyten und hat eine große Bedeutung für die Effektivität und Spezifität der adaptiven Immunreaktion (Hombach et al., 1990; Reth, 1992).

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, wurden von den Immunologen Emil-Adolf von Behring, Shibasaburo Kitasato und Paul Ehrlich im Jahre 1890 entdeckt und im Folgenden nutzbar gemacht (Ehrlich, 1891, Ehrlich, 1901). Diese Moleküle wurden zunächst als Antitoxine bezeichnet, da sie im Serum eines Diphtherie- Patienten, nachgewiesen wurden (von Behring und Kitasato, 1991). Es dauerte bis ins Jahr 1948, ehe die Schwedin Astrid Fagraeus zeigen konnte, dass Antikörper durch die B-Zellen bzw. Plasmazellen produziert werden (Fagraeus, 1948). Immunglobuline haben eine über Disulfid-Brücken fixierte Form ähnlich dem Buchstaben Y. Sie werden auch als „sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors“ bezeichnet (Janeway, 2009). Sie sind pathogenspezifisch und haben vielfältige Funktionen: So können sie z.B. durch Anlagerung extrazelluläre Pathogene opsonieren, bakterielle Toxine neutralisieren oder das Komplementsystem aktivieren (Janeway, 2009).

Ist eine Infektion erfolgreich bekämpft, sterben die meisten T- und B- Zellen ab. Lediglich wenige der Zellen verbleiben als pathogenspezifische Gedächtnis- T- oder B- Zellen (*memory cells*) im Körper erhalten (Janeway, 2009). So ist gewährleistet, dass bei einer erneuten Infektion mit einem Krankheitserreger die adaptive Immunantwort ihre Wirkung wesentlich schneller als bei der Erstinfektion entfalten kann und damit eine effektive, zum Teil lebenslange Immunität gegenüber dem Pathogen gewährleistet ist (Janeway, 2009(Goodnow et al., 2010)).

### 1.2.3 T-ZELLEN

Die T-Lymphozyten stellen neben den B- Lymphozyten die wichtigste Gruppe der Immunzellen des adaptiven Immunsystems dar (Janeway, 2009). Nach der Entstehung aus der myeloiden Vorläuferzelle wandern die Vorläuferzellen, aus denen T-Zellen entstehen, in den Thymus ein (Janeway, 2009). In diesem findet die Reifung der Zellen statt. Hierbei bilden die Zellen die unterschiedlichen Ko- Rezeptoren des T- Zell Rezeptors,  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  aus, welche im Folgenden mit MHC- Molekülen interagieren und die spezifischen Signalkaskaden auslösen (Goodnow et al., 2010).

Die  $CD4^+$  T- Lymphozyten werden auch T-Helferzellen genannt. Sämtliche Untergruppen der  $CD4^+$  T- Zellen können den MHC Klasse II Peptidkomplex auf APCs erkennen (Janeway, 2009). Die Epitope, welche auf den MHC Klasse II Komplexen präsentiert werden, stammen von Proteinen, die durch Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose in die APC aufgenommen wurden (Janeway, 2009). Im Zytosol werden die Proteine durch proteolytische Degradation im Proteasom gespalten und im Endoplasmatischen Retikulum schließlich auf den MHC Klasse II- Komplex geladen, welcher dann wiederum zur Zellmembran transportiert und dort präsentiert wird.

Die wichtigsten Subpopulationen sind  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und die regulatorischen  $CD4^+$ - T-Zellen, auch  $T_{RegS}$  genannt (Janeway, 2009)(Sugamura et al., 2004). Die  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  Zellen kann man anhand des Sekretionsmusters der teilweise kreuzhemmend wirkenden Zytokine sowie ihrer jeweiligen Funktion differenzieren.

Aktiviert  $T_H1$ - Effektorzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie  $IFN\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ . Dies führt hauptsächlich zu einer Aktivierung von Makrophagen und auch, wenn gleich in geringerem Maße, von B-Zellen. Sie erkennen Antigene, die auf intrazellulären Vesikeln der Makrophagen über den MHC Klasse II –Signalweg präsentiert werden. Die daraufhin sekretierten Zytokine aktivieren die infizierten Makrophagen, sodass sie die intrazellulären Erreger bekämpfen können. Bekannte Beispiele sind hier das *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* und *Listeria spec.* Des Weiteren führt eine Aktivierung der B-Lymphozyten durch die  $T_H1$ Zellen zur Bildung von Antikörpern der Klasse IgG. Sobald diese stark opsonierenden Antikörper dann an ihr spezifisches Antigen binden, kann das so identifizierte Pathogen von Makrophagen aufgenommen und zerstört werden (Van Eden et al., 2002).

Die Hauptaufgabe der  $T_H2$ - Helferzelle hingegen besteht in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten. Darüber hinaus werden Mastzellen und Granulozyten aktiviert. Sie sekretieren, anders als  $T_H1$  Zellen, beispielsweise IL-4, IL-5, IL-6 und Lymphotoxin  $\alpha$ . Die durch  $T_H2$  Effektorzellen ausgelöste, überwiegend humorale Immunreaktion ist vor allem durch die erhebliche Produktion von IgE sehr wichtig bei der Bekämpfung einer Infektion mit parasitischen Helminthen, wie Band-, Faden- oder Saugwürmer (Abbas et al., 1996).

Die Untergruppe der  $T_H17$  Zellen ist die am Kürzesten bekannte Population. Sie werden relativ früh in der Immunreaktion aktiviert. Sie regen die Chemokinproduktion lokaler Epithel- und Stromazellen an, was dann wiederum zu einer Rekrutierung von Neutrophilen zu der Entzündung führt (Janeway, 2009)(Bettelli et al., 2006).

Die regulatorischen  $CD4^+$  T-Zellen haben die Funktion zu verhindern, dass es zu einer zu intensiven Immunreaktion mit eintretender Autoimmunität kommt. Durch Sezernierung von Zytokinen können sie die Aktivität von DCs und T-Lymphozyten unterdrücken, sodass bei einer überschießenden Immunreaktion eventuell auftretende Gewebeschäden verhindert oder minimiert werden.

Die  $CD8^+$  T- Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-cells*; CTLs) genannt. Sie sind in der Lage infizierte oder entartete Zellen gezielt zu zerstören (Janeway, 2009). Durch die an der Oberfläche von allen kernhaltigen Zellen befindlichen MHC Klasse I Peptidkomplexen können die  $CD8^+$  T-Zellen infizierte Zellen erkennen und von nicht- infizierten Zellen unterscheiden. Auf den MHC Klasse I Peptidkomplexen werden zumeist zellfremde Peptide präsentiert, die zytosolischen Ursprungs sind. Es findet hier zuvor keine aktive Aufnahme von Antigen aus der Zellumgebung statt. Stattdessen werden die Proteine im Zytosol durch das Proteasom gespalten und anschließend in das Endoplasmatische Retikulum verbracht, um dort auf den MHC Klasse I Komplex geladen zu werden (Janeway, 2009). Sobald die beladenen MHC Klasse I Komplexe im Laufe ihrer Prozessierung über den Golgi- Apparat und Vesikel zur Zellmembran der APC gelangt sind, können  $CD8^+$  T- Zellen das spezifische Epitop erkennen. Sobald dies geschieht, bindet die CTL an den MHC Klasse I Peptidkomplex der infizierten Zelle und es kommt zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen durch die T-Zelle. Diese Proteine dringen in die infizierte Zelle ein und lösen den programmierten Zelltod aus (Janeway, 2009). Des Weiteren führt die intensive Sezernierung von  $IFN\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  und  $LT\alpha$  zu einer Attraktion von Makrophagen zum Inflammationsherd, der dortigen Aktivierung sowie zu einer verstärkten Synthese der MHC Klasse I Proteinen in

APCs (Janeway, 2009). Durch die gezielte Zerstörung von infizierten oder entarteten Zellen findet eine effektive Bekämpfung von intrazellulären Erregern statt, da ihnen ihre Wirtszelle, die Grundlage für ihre erfolgreiche Replikation, entzogen wird.

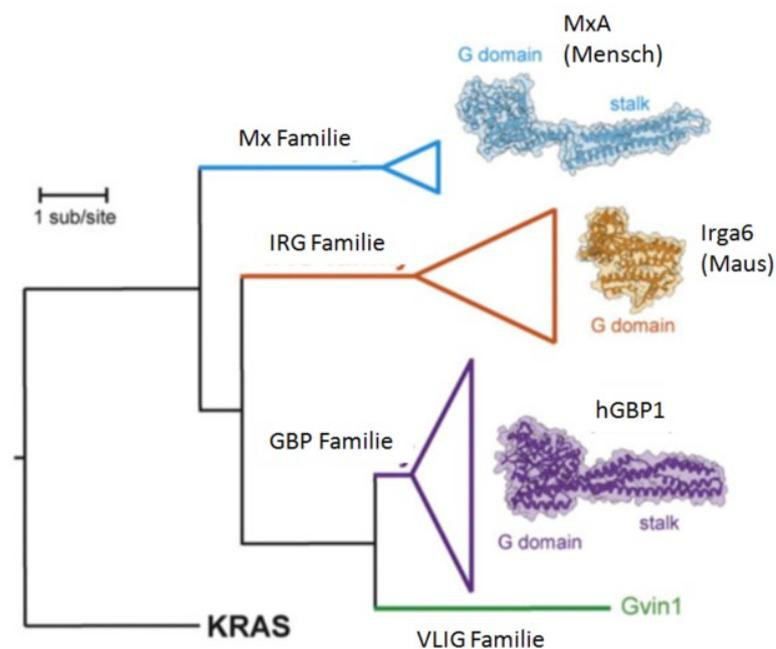
### 1.2.4 INTERFERON INDUZIERTER GTPASEN

Interferone sind zentrale und essentielle Botenstoffe in der Regulierung der Immunantwort (Janeway, 2009) (Isaacs und Lindenmann, 1957). Sie können eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege und die Synthese von Proteinen aktivieren oder deaktivieren und sind darüber hinaus sehr wichtig in der Interaktion und Kommunikation der Immunzellen untereinander. Interferone werden von T- und B- Lymphozyten, von NK- Zellen und vielen APCs exprimiert (Janeway, 2009). Folglich sind sie der Schlüssel zu einer potenten und gut koordinierten Immunantwort. Biochemisch gesehen gehören diese Zytokine zu den Glykoproteinen. Bei den Mammalia wurden bisher 10 unterschiedliche Interferone identifiziert. Sie werden je nach ihrer Rezeptorspezifität in 3 unterschiedliche Klassen unterteilt: Typ I Interferone (hauptsächlich IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ ), Typ II Interferone (IFN $\gamma$ ) und Typ III Interferone (IFN $\lambda$ ) (Janeway, 2009) (Chelbi-Alix und Wietzerbin, 2007).

Insgesamt sind heute bereits über 1500 Gene bekannt, die über Interferone reguliert werden, wovon ca. 1300 Gene über IFN $\gamma$  reguliert werden und lediglich 300-500 Gene über Typ I Interferone (Janeway, 2009). Zu den bekanntesten Vertretern gehören die NADPH- Oxidasen, die Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROSs) und Reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen intermediates*; RNIs) produzieren. Deren Entstehung wird durch Stickoxid (NO)-Synthasen katalysiert (Nathan und Shiloh, 2000). Aufgrund der meist IFN-spezifischen Induzierbarkeit werden diese NO-Synthasen auch als induzierbare NO- Synthasen (*inducible nitric oxide synthases*; iNOS) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass diesen Genen eine große Bedeutung bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger zukommt. Bei einer großen Mehrheit der IFN-induzierten Gene ist die Funktion jedoch noch unbekannt oder nur unzureichend erforscht.

Zu den sehr früh entdeckten IFN-induzierten Genen gehört die Familie der Guanosin 5' Triphosphatasen (GTPasen) (Boehm et al., 1998; Kim et al., 2012; Martens und Howard,

2006). Durch Bindung und Hydrolysieren von GTP können diese Hydrolasen Einfluss auf die Translation und Transkription der Zelle sowie auf die Translokation von Proteinen innerhalb des Zytoplasmas und über Zellmembranen hinweg nehmen. Sie stellen demnach einen wichtigen Regulationsmechanismus innerhalb der Zelle dar. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass den GTPasen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr zukommt (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Dittmann et al., 2008; Fentress et al., 2010; Haller et al., 2009; Kim et al., 2012; Kim et al., 2011; Kravets et al., 2012; Martens et al., 2005; Meunier et al., 2015; Pletneva et al., 2008; Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012). Die GTPasen werden heute in 4 Familien untergliedert: die p47- Familie, die Mx-Familie, die sehr großen induzierbaren GTPasen (*very large inducible GTPases*; VLIG) und die p65 Familie (Abb.1.8) (Degrandi et al., 2007; Dittmann et al., 2008; Haller et al., 2009; Kresse et al., 2008; Pilla-Moffett et al., 2016; Pletneva et al., 2008).

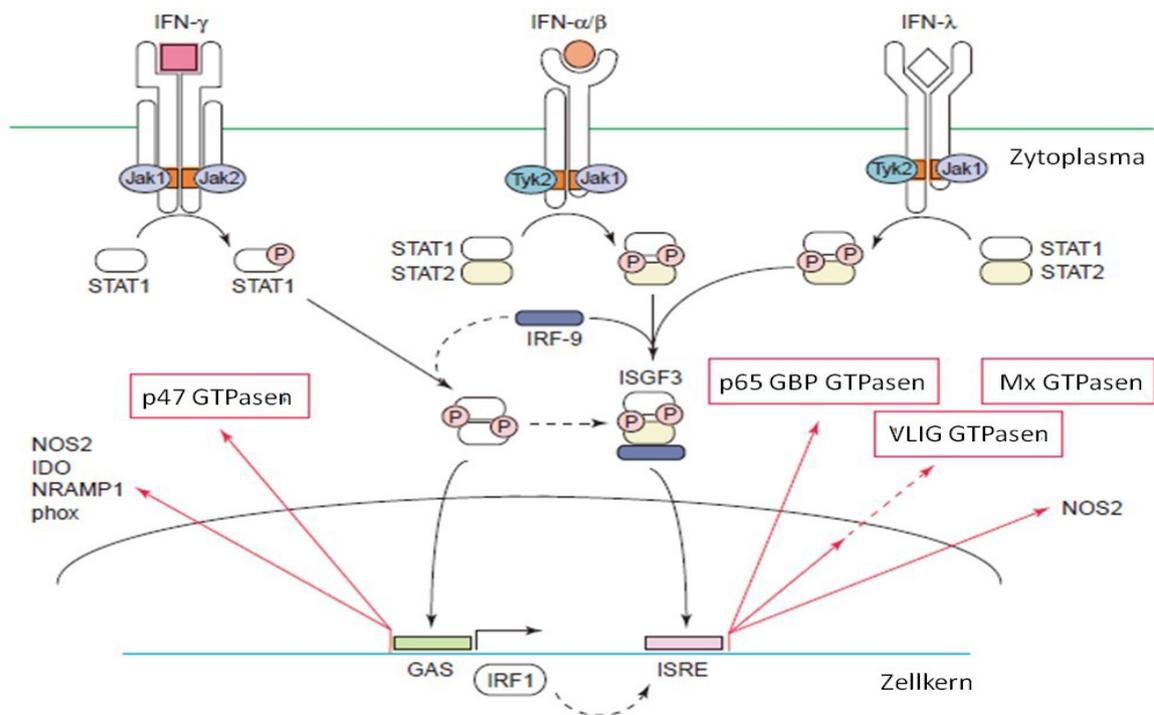


**Abbildung 1.8: Evolutionärer Stammbaum der GTPasen.** Dargestellt sind die wichtigsten Gruppen der GTPasen und deren evolutionsbiologische Beziehung zueinander. Verändert nach Pilla-Moffett, 2016.

Die Familie der p47-GTPasen ist die zahlenmäßig größte Gruppe. Ihr Name rührt von ihrer molekularen Masse, die zwischen 47-48 kD liegt. Unter den Vertebraten sind sie weit verbreitet und kommen zum Beispiel in der Maus, Ratte, Schwein und Hund vor. Im Menschen hingegen ist diese Gruppe jedoch, bis auf IRGM, deletiert. IFN $\gamma$  ist ihr Hauptinduktor, während die Genexpression bei einer Induktion über Typ I IFN oder Lipopolysaccharid (LPS) lediglich minimal ansteigt. Es wird vermutet, dass sie an der intrazellulären Detektion von Pathogenen

und der weiteren Verarbeitung von Pathogenpartikeln beteiligt sind (Kim et al., 2011; MacMicking, 2004, 2005). Die Induktion der Genexpression dieser Proteine wird, wie bei allen interferon-induzierten GTPasen, über den Janus- Kinase / Signaltransduktoren und Aktivator der Transkription (JAK/STAT)- Signalweg gesteuert (Abb. 1.9)(Kim et al., 2011; MacMicking, 2004). Hierbei binden Typ I oder Typ II Interferone an bestimmte, charakteristische Rezeptoren der Signalkaskade. Die Bindung führt im Fall von IFN $\gamma$  zur Aktivierung von JAK1/2 und daraufhin zur Phosphorylierung von STAT1. Phosphorylierte STAT1 Moleküle bilden Dimere und gelangen in den Zellkern. Dort bilden sich Ko- Aktivator- Komplexe mit Histonacetylase- Aktivität auf *IFN $\gamma$  activated site* (GAS)- Elementen innerhalb der Promotoren, der durch IFN $\gamma$  induzierbaren Gene. Hierzu gehört der Großteil der p47 GTPasen.

Die GTPasen der Mx- Familie haben eine molekulare Masse von 70-80 kD(Pavlovic et al., 1993). Sie werden mittels des JAK/STAT Signalwegs durch die Typ I Interferone induziert (Kim et al., 2011). Die Induktion durch Typ I IFN führt zur Aktivierung von JAK1 und TYK2 Kinasen, die nachfolgend STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Die phosphorylierten STAT1/2 Heterodimere und *interferon regulatory factor* (IRF)-9 bilden den *interferon stimulated gene factor* (ISGF)3 bilden (Abb. 1.9). Dieser bindet an das *interferon-stimulated response element* (ISRE), welches dann die Transkription der jeweiligen Gene induziert. Insgesamt zählen 4 Proteine zu dieser Gruppe. Mx1 und 2 konnten bei Nagern im Zellkern bzw. letzteres im Zytosol nachgewiesen werden (Haller et al., 2007). Im Menschen kommen die beiden Formen MxA und MxB vor und wurden vorwiegend im Zytosol nachgewiesen. Sie werden in Monozyten, DCs, Hepatozyten und in Endothelzellen synthetisiert (Haller et al., 2007). In chronischen Hepatitis C Infektionen sind diese Proteine häufig hochreguliert (Leifeld et al., 2001; MacQuillan et al., 2003; Patzwahl et al., 2001). So hat MxA vor allem antivirale Funktionen. Bei weiteren Viren, wie dem Rhabdovirus, dem Ortomyxomavirus oder dem Hepatitis B Virus konnte ebenso eine Bedeutung gezeigt werden (Vassilev et al., 1999).



**Abbildung 1.9: Induktion der Genexpression der IFN induzierbaren GTPasen mittels des JAK/STAT- Signalwegs durch Typ I und II Interferone.** IFN $\gamma$  bindet an den Rezeptor und führt zur Aktivierung von Jak1/2. Die darauffolgende Phosphorylierung und Translokation von STAT1-Dimeren in den Nukleus führt dort zur Bildung von Co-Aktivator- Komplexen mit Histonacetylase-Aktivität. Diese aktivieren GAS- Elemente in den Promotoren der IFN $\gamma$  induzierbaren Genen und es kommt zur Transkription. Für die Aktivierung mancher p65-GTPasen, inklusive mGBP2, wird die Bindung von IRF-1 an ISREs benötigt. GAS= IFN $\gamma$  activation site; GBP= Guanylat- bindendes Protein; GTPase= Guanodin- Triphosphatase; IRF-1= Interferon-regulatory factor 1; ISGF= interferon stimulated gene factor; ISRE= interferon-regulated response element; JAK= Janus Kinase; NOS2= induzierbare NO- Synthase; NRAMP1= natural-resistance associated macrophage protein-1; STAT= Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription, signal transducer and activator of transcription; Tyk= Jak-Protein-Tyrosinkinase; VLIG= very large inducible GTPases. Nach MacMicking 2004.

Die dritte Gruppe der Familie der GTPasen stellen die „sehr großen induzierbaren GTPasen“ (*very large inducible GTPases*; VLIGs) dar (Klamp et al., 2003; MacMicking, 2004). Sie wurden bisher als letzte Gruppe identifiziert und sind die größten Proteine unter den GTPasen: ihre molekulare Masse beträgt ca. 280 kD (Klamp et al., 2003). Auch sie werden über den JAK/STAT Signalweg gesteuert (Kim et al., 2012). Die Induktion verläuft hierbei mittels des Transkriptionsfaktors IRF-1 welcher zur Aktivierung des ISRE führt (Abb. 1.9)(Kim et al., 2012). In Mäusen wurden auf dem Chromosom 7 sechs VLIG Gene identifiziert. Im Menschen konnte bisher ein Gen (VLIG-1) entdeckt werden. In anderen Vertebraten wie z.B. Schweinen, Ratten, Frösche oder Fischen, konnten bisher nur wenig homologe Gene identifiziert werden (Klamp et al., 2003). Über die Funktion der GTPasen und deren intrazelluläre Lokalisation ist bisher sehr wenig bekannt. Es bedarf weiterer Grundlagenforschung, um dies zu ergründen.

Die p65 GTPasen, auch Guanylat- bindende Proteine genannt, sind die vierte und bisher am besten erforschte Gruppe von Interferon induzierten GTPasen. Erstmals wurden sie durch Gupta et al. sowie Knight und Korant et al. im Jahre 1979 beschrieben (Gupta et al., 1979;

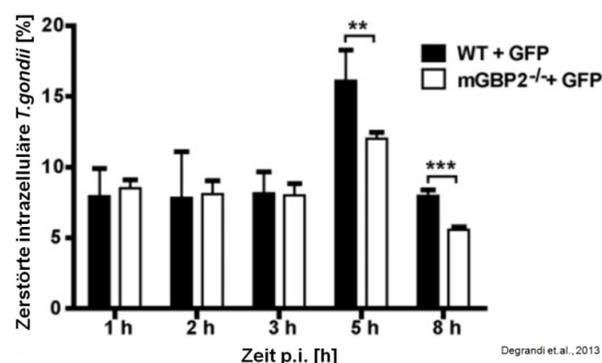
Knight und Korant, 1979). Diese haben mit IFN $\gamma$  stimulierte humane Fibroblasten lysiert und konnten die Proteine im Lysat nachweisen. Bisher konnten im Menschen 7 Gene und 1 Pseudogen identifiziert werden. In der Maus konnten 11 Gene und 2 Pseudogene den GBPs zugeordnet werden (Kresse et al., 2008). Neben IFN $\gamma$  sind weitere Zytokine in der Lage die Expression zu induzieren: die wichtigsten sind die Typ I IFNs sowie IL-1 $\beta$ , Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und bakterielles LPS. Dennoch sind viele ihrer Funktionen bisher unbekannt. Ihre Induktion wird hauptsächlich von IFN $\gamma$  ausgelöst (Shenoy et al., 2007). Zunächst verläuft die Induktion ähnlich der p47 GTPasen mit Aktivierung der STAT1/2 Dimere und deren Translokation in den Zellkern. Der entstehende Ko-Aktivator Komplex aktiviert ebenfalls das GAS- Element. Zur vollständigen Aktivierung der Genexpression der meisten p65 GTPasen, inklusive mGBP2, wird IRF-1 benötigt. Dieses bindet und aktiviert ISRE, woraufhin die p65 GTPasen exprimiert werden (Kim et al., 2011; MacMicking, 2004). Innerhalb der Vertebraten sind die p65 GTPasen in hohem Maße konserviert und kommen neben dem Menschen in der Maus, dem Schwein und vielen weiteren Vertretern vor. Die Bandbreite der Funktionen der GBPs zeigt sich sehr heterogen. Dem humanen GBP1 (hGBP1), dem Ortholog zum murinen GBP2 (mGBP2), konnte eine Rolle in der Zellproliferations- Steuerung zugewiesen werden (Guenzi et al., 2001). In mGBP2 überexprimierenden Fibroblasten der Linie NIH 3T3 wurde eine erhöhte Replikation beobachtet. In humanen Endothelzellen bzw. Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von hGBP1 zu einer Reduktion der Zellproliferation führt (Guenzi et al., 2003). Des Weiteren konnten bei verschiedenen GBPs, wie mGBP 1, 2, 5 und 7 antivirale und antiparasitäre Funktionen nachgewiesen werden (Kim et al., 2012; Kim et al., 2011; Shenoy et al., 2012). Aufgrund ihres hohen Konservierungsgrads und den genannten Erkenntnissen, die zu verschiedenen GBPs gewonnen wurden, erscheint diese Gruppe von GTPasen als diejenige, deren Erforschung hinsichtlich der Bekämpfung von Parasitosen und Infektionen mit Protozoen, wie *Toxoplasma gondii*, aber auch anderen intrazellulären Pathogenen, besonders lohnenswert erscheint.

### 1.2.5 BIOLOGISCHE FUNKTION VON MGBP2

Die p65 GTPasen werden zur Familie der Dynamin- verwandten Proteine gezählt. Vor allem den murinen GBPs konnten bisher Funktionen innerhalb der Immunantwort zugeordnet wer-

den. So konnte gezeigt werden, dass mGBP2 in Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) infizierten Fibroblasten der Linie NIH 3T3 eine antivirale Wirkung entfaltet (Carter et al., 2005). So führten Infektionsversuche mit einer mGBP2<sup>-/-</sup>-Mauslinie zu dem Erkenntnis, dass dieses Protein im murinen Modellorganismus für das Überleben einer Infektion mit *T.gondii* essentiell ist (Degrandi et al., 2013). Die intraperitoneal (i.p.) infizierten Mäuse, denen dieses Gen fehlte, starben verstärkt innerhalb der ersten 30 Tage nach der Infektion, während die Mehrheit der mGBP2<sup>+/+</sup>-Tiere überlebten. Für mGBP5 beispielsweise konnte jedoch eine andere Rolle innerhalb der Immunantwort gezeigt werden. Es zeigte sich, dass das Protein für die korrekte Assemblierung des NLRP-3 Inflammasoms wichtig ist (Abderrazak et al., 2015; Finethy et al., 2015). Dieser zytosolisch vorliegende Proteinkomplex erkennt Pathogene und kann durch Aktivierung des Zytokins Caspase-1 bzw. der daraufhin synthetisierten proinflammatorischen Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , eine Immunreaktion hervorrufen und verstärken (Abderrazak et al., 2015).

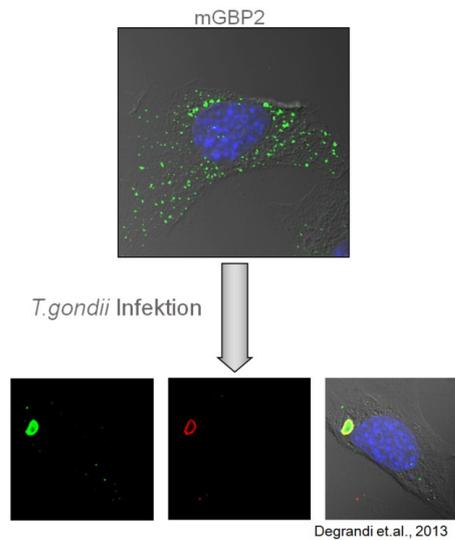
Das murine GBP2 ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Es konnte festgestellt werden, dass der Parasit *T.gondii* in mGBP2<sup>-/-</sup>-embryonalen Mausfibroblasten (*murine embryonic fibroblasts*; MEFs) eine höhere Replikationsrate besitzt (Degrandi et al., 2013). Nach 5h und 8h p.i konnte in den wildtypischen MEFs eine höhere Disruption des Pathogens beobachtet werden (Abb.1.10).



**Abbildung 1.10: Intrazelluläre Disruption der parasitophoren Vakuole von *T.gondii* in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.** mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit GFP transduziert und mit *T.gondii* ME49 für die angegebene Zeit infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-SAG-1 AK und anti-Maus Cy3 gefärbt. Es wurde die Anzahl der zerstörten intrazellulären PVs gegen die Gesamtzahl der PVs mit dem Mikroskop bestimmt und in Prozent angegeben. Ab 5h p.i. erkennt man eine deutliche Reduktion der zerstörten PVs in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs verglichen mit den mGBP2<sup>+/+</sup>-MEFs. mGBP2 hat somit eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der intrazellulären Parasiten. Nach Degrandi et al. 2013

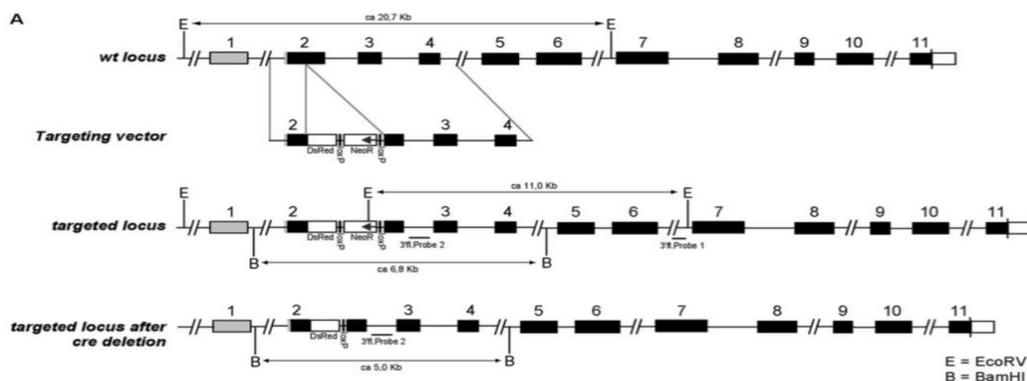
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mGBP2 im Falle einer *T.gondii* Infektion zur PV rekrutiert (Abb. 1.11) (Kravets et al., 2012). Hierzu wurden MEFs 16h mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann mit dem Stamm ME49 von *T.gondii* infiziert. Nach weiteren 2h Inkubationszeit konnte eine deutliche Rekrutierung des zuvor ubiquitär im Zytosol vorliegenden mGBP2 zur

PV im Konfokalmikroskop beobachtet werden. Es zeigte sich ebenso, dass die Rekrutierung und Anlagerung an die PV bei mGBP2 am deutlichsten ausfielen.



**1.11: IFN $\gamma$ - abhängige Rekrutierung von mGBP2 zur PV von *T.gondii* (Degrandi et al. 2013).** Bei nicht infizierten Zellen liegt mGBP2 ubiquitär im Zytosol verteilt vor (oberes Bild, grün). Im Zuge einer Infektion mit *T. gondii* ME49 rekrutiert mGBP2(grün) zur Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM;rot).

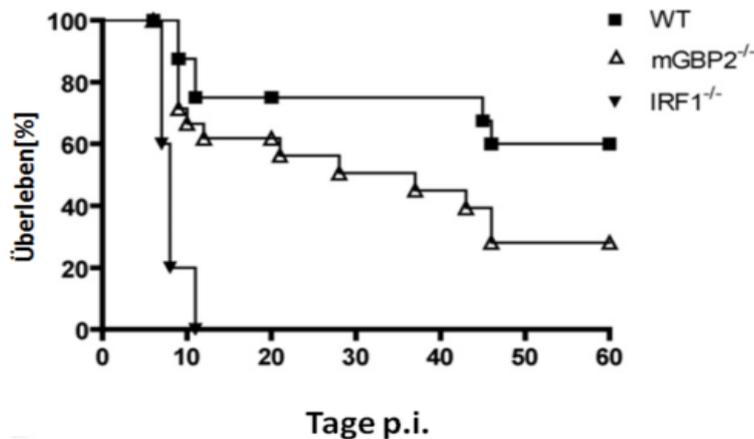
Die Beobachtungen der höheren Replikationsrate des Parasiten in mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen und die Ergebnisse der Koloalisationsstudien wurden durch die Herstellung einer in der vorliegenden Dissertation verwendeten mGBP2- defizienten Mauslinie auf dem C57BL/6- Hintergrund belegt.



**1.12: Klonierungsstrategie zur Erstellung der mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinie.** Durch Einfügen einer Neomycin- Resistenzkassette unter Einfluss eines starken Promotors in das Exon 2 des mGBP2 Lokus kommt es zu einem frühen Abbruch der Transkription des Gens. Somit ist kein funktionsfähiges mGBP2- Protein im Organismus vorhanden (nach Dissertation Konermann, 2008).

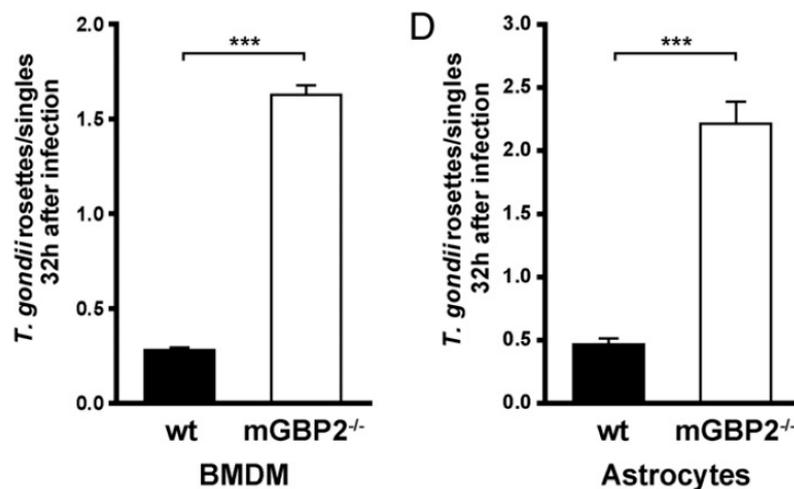
Bei der C57BL/6 Mauslinie handelt es sich um eine Inzucht- Mauslinie, wie sie in vielen Laboratorien für immunologischer Forschung verwendet wird (Jackson Laboratories, USA). Um die Expression von mGBP2 in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie zu eliminieren wurde eine dsRed- und eine geflochte, reverse Neomycin- Resistenz Kassette in das Exon 2 des mGBP2 Gens integriert (Abb.1.12)(Dissertation C.Konermann, 2008). Dies führt zu einem präterminalen,

„künstlichen“ Stop-Codon in der mRNA des Gens. In den darauf folgenden *in vivo* Infektionsversuchen mit *T.gondii* zeigte sich in der mGBP2 defizienten Mauslinie eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zu mGBP2<sup>+/+</sup> Kontrolltieren (Abb.1.13) (Dissertation C. Konermann, 2008,(Degrandi et al., 2013)).



**Abbildung 1.13:** Überlebenskurve von mGBP2<sup>+/+</sup>, mGBP2<sup>-/-</sup> und Interferon regulatory factor (IRF) 1<sup>-/-</sup> Mäusen bei Infektion mit 40 Zysten *T.gondii* ME49 i.p. IRF1<sup>-/-</sup> Mäuse sterben in der akuten Infektionsphase, da eine IFN $\gamma$  basierende Immunreaktion ausbleibt. mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse sterben vermehrt zunächst in der akuten Phase, ähnlich wie die mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie. In der chronischen Phase der Infektion ist die Mortalität bei der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie im Vergleich zu mGBP2<sup>+/+</sup> Tieren signifikant höher (Degrandi et al., 2013).

In  
aus



**Abbildung 1.14:** Rosettenbildung in Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) und Astrozyten nach Infektion mit *T.gondii* ME49: Infektion von BMDMs und Astrozyten mit *T. gondii* ME49. Die Zellen wurden vor Infektion mit IFN $\gamma$  über Nacht stimuliert. 32h p.i. zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Rosettenanzahl bei den mGBP2<sup>-/-</sup> Zelllinien im Vergleich zu mGBP2<sup>+/+</sup> Zelllinien. Die Abwesenheit von mGBP2 führt zu einer erhöhten Rosettenbildung und damit zu einer erhöhten Replikationsrate von *T.gondii*. Nach Degrandi et al., 2013.

den jeweiligen Mäusen isolierten Astrozyten und Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages*; BMDMs) konnte eine erhöhte Replikationsrate der Parasiten in Abwesenheit von mGBP2 beobachtet werden. Dies zeigte sich an der erhöhten *T.gondii* Rosettenzahl 32h p.i. (Abb.1.14)(Degrandi et al., 2013).

Darüber hinaus konnte im Gehirn der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie eine signifikante Erhöhung der Zystenanzahl im Vergleich mit dem Wildtyp gezeigt werden (Dissertation C. Konermann (Degrandi et al., 2013)). Die Erkenntnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Versuchen verdeutlichen, dass mGBP2 in hohem Maße zu der Immunantwort gegenüber *T.gondii* beiträgt. Die genaue Funktion des Proteins und die Regulierung im Zusammenspiel mit den Signalwegen der intrazellulären Immunabwehr sind, mit Ausnahme des JAK/STAT Signalwegs, heute noch unbekannt.

### 1.2.6 IMMUNANTWORT BEI INFEKTION MIT *TOXOPLASMA GONDII*

Bei einer Infektion mit dem Erreger *T.gondii* kommt es zu vielfältigen Interaktionen des Wirtes mit dem Pathogen. Nach Aufnahme des Parasiten dringen die motilen Stadien in die Wirtszelle ein und bilden die PV (Laliberte und Carruthers, 2008; Sweeney et al., 2010). Unmittelbar in der Ausbildung der PV sekretiert der Erreger Proteine, welche die Membranstruktur der PV modellieren können, sodass sie vor der Degradation durch Lysosomen geschützt ist (Hunter und Sibley, 2012). Andere Proteine gelangen in das Zytosol der Wirtszelle und stellen den Metabolismus der Zelle auf die Bedürfnisse des Parasiten um. Dies hat zur Folge, dass die Mitochondrien zur PV rekrutiert werden und dort als Lipidquelle dienen (Laliberte und Carruthers, 2008). Das Zytoskelett wird für den Transport von Proteinen und Lipiden zur PV ebenso umstrukturiert. *T.gondii* beeinflusst insgesamt die Expression von über 1000 Genen innerhalb der Wirtszelle: dies kann durch eigene Transkriptionsfaktoren geschehen, oder auch durch Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege (Weiss, 2011). Durch diese Kompartimentierung in einer PV und der weitreichenden Einflussnahme auf den Wirtsmetabolismus ist der Parasit daher gut vor dem Zugriff des Immunsystems geschützt. Dennoch kommt es im Falle einer Infektion mit *T.gondii* zu einer deutlichen Immunreaktion: wird ein Erreger zerstört und durch APCs phagozytiert, kommt es zur Sezernierung von IL-12 durch Makrophagen, DCs und neutrophilen Granulozyten. Dieses wiederum führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten und von NK-Zellen, die dadurch zur Produktion von IFN $\gamma$  angeregt werden (Hunter und Sibley, 2012). Der Chemokinrezeptor CCR5 sowie die Gruppe der TLRs scheinen für die Regulierung der IL-12 Produktion ausschlaggebend zu sein (Scanga et al., 2002). Die letztendlich folgende Expression von IFN $\gamma$  ist jedoch von zentraler Bedeutung für die Immunreak-

tion (Pfefferkorn et al., 1986; Pfefferkorn und Guyre, 1984). Dies kann gut bei  $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$  - Mäusen beobachtet werden, da sie sehr suszeptibel gegenüber einer *T. gondii* Infektion sind (Deckert-Schluter et al., 1996).  $\text{IFN}\gamma$  induziert wichtige antiparasitäre Signalwege wie z.B. die Induktion der GTPasen. Diese können dazu beitragen, dass nicht nur extrazelluläre Parasiten durch beispielsweise das Komplementsystem und anschließende Phagozytose durch APCs bekämpft werden können, sondern auch intrazellulär vorliegende Parasiten können so durch die Zerstörung der schützenden PV eliminiert werden (Dupont et al., 2012). So konnte, wie in Kapitel 1.2.4. bereits dargestellt, gezeigt werden, dass GBPs bei einer Infektion mit *T. gondii* zur PV rekrutiert werden und dort zur Zerstörung beitragen (Degrandi et al., 2007). Weitere Effektormoleküle, welche durch  $\text{IFN}\gamma$  induziert werden, sind reaktive Oxygen Spezies (ROS) wie die *inducible nitric oxygen species* (iNOS) . Hier wird der Parasit durch chemischen Stress, u.a. Radikalbildung, zerstört (Schluter et al., 1999). Durch die Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) wird der Parasit bekämpft, indem in seiner Umgebung die für ihn essentielle Aminosäure L-Tryptophan in N-Formylkynurenin umgewandelt wird und somit nicht mehr zur Verfügung steht (Dai et al., 1994). Daraus folgt eine geringere Replikationsrate des Erregers. So kann auf verschiedenen Wegen der Parasit durch die Induktion von  $\text{IFN}\gamma$  intrazellulär bekämpft werden.

Der Parasit hat jedoch auch sogenannte Immunevasions- Mechanismen entwickelt, wodurch er sich vor den durch  $\text{IFN}\gamma$  induzierten Signalwegen schützen kann (Hunter und Sibley, 2012). Grundlage dieses Mechanismus ist, dass *T. gondii* mit den Signalwegen der Wirtszelle interferiert. So kann der Parasit zum Beispiel verhindern, dass STAT1 hochreguliert wird, indem sogenannte *supressor of cytokine signalling* (SOCS)- Proteine hochreguliert werden (Zimmermann et al., 2006). STAT1 ist, wie in Kapitel 1.2.3. beschrieben, für die Einleitung der  $\text{IFN}\gamma$  -induzierten Signalwege essentiell, sodass durch die Herunterregulation eine deutliche Minderung der entsprechenden Gene erfolgt. Außerdem können, wie in Kapitel 1.1.2. beschrieben, Typ I- Stämme von *T. gondii* verhindern, dass zelluläre Proteine, wie GBPs, zur PV rekrutiert werden (Degrandi et al., 2007).

Insgesamt sind noch viele Bereiche der Wechselwirkung des Pathogens mit dem Immunsystem des Wirtes unbekannt oder zumindest wenig erforscht. So ist noch nicht endgültig ergründet, welche Signale zum Beispiel die Stadienkonversion des Parasiten einleiten oder welche Faktoren für die Virulenz essentiell sind bzw. wie deren Wirkmechanismus ist.

## 1.3 VIRUSINFEKTIONEN

Um die Bedeutung von mGBP2 bei Infektionen mit weiteren Erregern, zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Dissertation auch Infektionsversuche mit den viralen Erregern der Lymphozytären Choriomeningitis und der Stomatitis vesicularis durchgeführt.

### 1.3.1 LYMPHOZYTÄRER CHORIOMENINGITIS VIRUS (LCMV)

LCMV tritt hauptsächlich bei Nagetieren auf. Das Virus kann Hamster, Meerschweine, verschiedene Affenarten und auch den Menschen befallen. Das größte Reservoir stellt jedoch die Maus dar. Da es auch vom Menschen auf das Tier und andersherum übertragen werden kann stellt dieses Virus eine Zoonose dar (Barton, 1996; Barton und Hyndman, 2000). Es ist ein Negativ- Einzelstrang RNA- Virus aus der Familie der *Arenaviridae* (Barton und Hyndman, 2000; de la Torre, 2009). Der Mensch infiziert sich zumeist über orale Aufnahme, Einatmen von Viruspartikeln oder durch Bisse von Tieren. Befallene Tiere scheiden das Virus mit dem Kot, Urin und Speichel aus (Barton und Hyndman, 2000). Im Menschen verläuft die Infektion mit dem LCMV meist recht unspezifisch. Es kann zu grippalen Symptomen kommen und vor allem bei immunsupprimierten Patienten besteht die Möglichkeit, dass eine Meningitis entsteht (Barton und Hyndman, 2000; Kumar, 2005). Bei immunkompetenten Nagern verläuft die Erkrankung ebenso unspezifisch (Fung-Leung et al., 1991; Seiler et al., 1998). Bekannte Stämme sind LCMV WE high und LCMV DOCILE (Weibel et al., 1993; Zhou et al., 2012). WE high kann von der immunkompetenten Maus durch eine starke Induktion der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort erfolgreich aus dem Organismus entfernt werden (Zhou et al., 2012) (Kotturi et al., 2007). Viren des DOCILE Stammes hingegen sind widerstandsfähiger und können die zytotoxische T-Zell Antwort überstehen und im Organismus persistieren (Zinkernagel et al., 2009). Aufgrund der geringen Sterblichkeit, bei gleichzeitiger deutlich messbarer Immunantwort, vor allem im Bereich der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wird dieses Virus gerne als Modellorganismus verwendet, um die Funktionalität der T-Zellen zu untersuchen (Oldstone und Buchmeier, 1982; Xu et al., 2014; Zinkernagel et al., 1985).

### 1.3.2 VESIKULÄRER STOMATITIS VIRUS (VSV)

Das Vesikuläre Stomatitis Virus gehört zu der Familie der *Rhabdoviridae* und sein Genom besteht aus einer negativen Einzelstrang RNA (Green et al., 2006). Es kann den Menschen infizieren und stellt daher eine Zoonose dar (Fields und Hawkins, 1967; Lichty et al., 2004). Zumeist infiziert das Virus jedoch Huftiere, wie Rinder oder Schweine und führt zu Schwellungen, Bläschen und Blutungen in der Mundschleimhaut und am Euter (Letchworth et al., 1999; Wellenberg et al., 2002). Zudem sind die Tiere lethargisch und magern stark ab. Die Symptome könnten daher mit der wesentlich letaler verlaufenden Maul- und Klauenseuche verwechselt werden. Das Immunsystem eines immunkompetenten Wirtes ist jedoch in der Lage innerhalb von etwa zwei Wochen die Infektion erfolgreich zu bekämpfen (Bi und Reiss, 1995). Beim Menschen treten im Falle einer Infektion nur unspezifische, grippeähnliche Symptome auf und es bedarf in der Regel keiner Therapie. Dennoch können in seltenen Fällen auch Bläschen und Blutungen in der Mundschleimhaut auftreten. In Laboratorien hat sich das Virus als guter Modellorganismus für das Studium des Immunsystems etabliert: Es erzeugt eine geringe Mortalität in Versuchstieren bei gleichzeitigem intensiven Anregen der Immunantwort (Lichty et al., 2004).

## 1.4 MHC - MULTIMERE UND DEREN ANWENDUNG IN DER IMMUNBIOLOGIE

Als MHC- Multimer wird ein aus mehreren MHC- Molekülen bestehendes Konstrukt bezeichnet, welches vor allem in Kombination mit einem fluoreszierenden Farbstoff in der Immunbiologie häufig Anwendung findet (Bakker und Schumacher, 2005; Knabel et al., 2002). Hergestellt werden sie zumeist durch Biotinylierung von MHC-Monomeren, welche dann beispielsweise an das bei Tetrameren oft als Rückgrat dienende Streptavidin binden (Altman et al., 1996). Durch Bindung der MHC-Moleküle an den spezifischen T- Zell- Rezeptor einer T- Zelle können so im Durchflusszytometer verschiedene Epitop- spezifische Zellpopulationen erkannt, differenziert und mittels „Cell Sorter“ sogar sortiert werden. Zu den am häufigsten verwendeten Multimeren gehören die Dimere, Tetramere, Pentamere, Dextramere und auch Dodecamere (Huang et al., 2016). Da sich durch eine Bindung von mehreren MHC- Mo-

lekülen auf einer Zelle die Stärke der Bindung des Multimers zur Zelle erhöht, und damit die Spezifität und Haltbarkeit der Bindung erhöht ist, ist es ratsam mindestens Tetramere oder höherwertige Multimere zu verwenden. Besonders Pentamere tun sich hier durch ihren Aufbau mit einer flexiblen „Coiled- Coil- Domain“ hervor. Hier können im Gegensatz zu den Tetrameren theoretisch alle MHC- Moleküle an die spezifische T- Zelle binden, da diese im Gegensatz zu den Tetrameren in dieselbe Richtung gewandt sind (Davis et al., 2011).

Da die MHC- Moleküle der Multimere MHC- I oder MHC- II Moleküle sein können, kann theoretisch durch diese immer öfter verwendete Technologie die gesamte Bandbreite der T- Zell Immunantwort analysiert werden. Essentiell hierfür ist es jedoch zu wissen, welches Epitop das immungenste für den Erreger oder das jeweilige Pathogen ist. Hier jedoch noch weitere Forschung notwendig. Für die Analyse der T- Zell Antwort gegen *T. gondii* ME49 in der Maus beispielsweise sind lediglich jeweils ein Epitop für die CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort bekannt (Wilson et al., 2010). Ein weiteres Beispiel für ein wichtiges Epitop aus dem Ovalbumin (SIINFEKL). Dies wird häufig verwendet um eine Infektion zu simulieren und die CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort zu analysieren (Garulli et al., 2008; Hulseberg et al., 2010).

Durch die immer weiter fortschreitende Analyse des Genoms, Transkriptoms und Proteoms von Pathogenen und des Menschen werden immer neue potentielle Epitope gefunden bzw. durch *in silico* -Analysen vorhergesagt (Gurung et al., 2012). So ist es denkbar, dass auf diesem Gebiet bald weitere Erkenntnisse gemacht werden, die die derzeitige Vorstellung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort verändern, oder beeinflussen werden.

## 1.5 FRAGESTELLUNG

Dieser Dissertation vorausgegangene Arbeiten zeigten *in vitro* eine deutliche Hochregulation sowohl der Genexpression als auch des Proteinlevels von mGBP2 bei einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* ME49 in MEFs. Weiter konnte gezeigt werden, dass der Parasit in mGBP2 defizienten MEFs eine signifikant höhere Replikationsrate erreicht, als in Wildtyp-Zellen (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2012). Zudem konnte eine IFN $\gamma$ - abhängige Rekrutierung von mGBP2 zur PVM von *T.gondii* nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007; Kravets et al., 2012). Im Rahmen der Dissertation von C. Konermann (2008) wurde schließlich eine mGBP2 defiziente Mauslinie erzeugt, die auf einem C57Bl/6 Hintergrund rückgekreuzt wurde. Hier zeigten Infektionsversuche sowohl eine erhöhte Mortalitätsrate als auch eine erhöhte Anzahl von Zysten im Gehirn im Vergleich zur WT Mauslinie. Somit ist der hohe Stellenwert von mGBP2 innerhalb der Immunantwort gegen *T.gondii* auch *in vivo* nachgewiesen.

In der vorliegenden Dissertation sollten nun die Auswirkungen der Absenz von mGBP2 im Tiermodell auf das Immunsystem bei der Infektion mit intrazellulären Pathogenen im Detail analysiert werden. Aufgrund der vorangegangenen Experimente sollte der Fokus auf der Infektion mit dem obligat intrazellulären Erreger *T.gondii* liegen. Da die intrazelluläre Replikation des Parasiten in mGBP2 defizienten Zellen erhöht war, sollte zunächst überprüft werden, ob in der mGBP2- defizienten Mauslinie eine potente T- lymphozytäre Immunantwort nachweisbar ist. Eine Einschränkung dieser könnte auf eine reduzierte Antigenpräsentation via des MHC I und II Signalwegs durch eine reduzierte intrazelluläre Zerstörung des Parasiten im *in vivo* Infektionsmodell hinweisen. Außerdem sollte der Infektionsverlauf der mGBP2<sup>+/+</sup> - und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie verglichen werden. Hierzu sollte die Infektionslast der Tiere bestimmt werden um die *in vivo* Replikationsrate des Erregers beurteilen und vergleichen zu können. Des Weiteren sollte mit Hilfe eines zu erstellenden Taq-Man qRT- PCR Systems der Status und das Auftreten der Stadienkonversion des Parasiten in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie im Verlauf der Infektion erfasst und mit der wildtypischen Mauslinie verglichen werden. Um den Status der Immunantwort noch näher zu beschreiben, sollten außerdem intensive Betrachtungen der immunrelevanten Zytokine und Effektormoleküle durchgeführt werden.

Da über die Bedeutung von mGBP2 in der Immunantwort gegenüber anderen intrazellulären Pathogenen sehr wenig bekannt ist, sollten in dieser Dissertation zudem Infektionsversuche

## Fragestellung

mit dem Lympozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) und dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie durchgeführt werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERWENDETE MATERIALIEN

#### 2.1.1 COMPUTERSOFTWARE

iQ™5Optical System Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geneious	Biomatter Ltd., Auckland, NZ
FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo	FlowJo Llc., Oregon, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., CA, USA
MS Excel	Microsoft, Redmond, Washington, USA
MS PowerPoint	Microsoft, Redmond, Washington, USA
MS Word	Microsoft, Redmond, Washington, USA

#### 2.1.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Transkriptionspuffer (5x; für cDNA-Synthese)	Roche, Mannheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe

## Material & Methoden

BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Molecular Probes, USA
Desoxyribonukleotide (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	Thermo-Fischer, Massachusetts, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Erythrozyten-Lyse Puffer	
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	BD Biosciences, Heidelberg
FKS (Fötales Kälberserum)	Cambrex Corporation
FKS (Fötales Kälberserum), low endotoxin	East Rutherford, NJ, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Golgi-Stop	Becton Dickinson, EastRutherford, USA
DEPC-H <sub>2</sub> O	Gibco, Karlsruhe
HEPES	Gibco, Karlsruhe
IMDM	Bio Whittaker, Lonza, Belgien
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot

## Material & Methoden

Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MassRuler DNS-Leiter	Thermo-Fischer, Massachusetts, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPage Transfer Puffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Percoll®	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
PhosphoSTOP, Phosphatase Inhibitor-Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNaseOut	NE Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

## Material & Methoden

Reverse Transkriptase (M-MLV)	NE Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
qRT-PCR MasterMix No ROX	Eurogentec, Liege, Belgien
Roti <sup>®</sup> -Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Phenol	Roth, Karlsruhe
RPMI	Biochrom, Berlin
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Linde GmbH,
Transkriptionspuffer (5x)	NE Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCL Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIzol <sup>®</sup> RNA Isolation Reagent	Thermo-Fischer, Massachusetts, USA
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe

### 2.1.3 ENZYME

#### **Produkt**

Phusion *High Fidelity* DNA Polymerase  
Proteinase K  
Reverse Transkriptase

#### **Hersteller**

NE Biolabs GmbH, Frankfurt/Main  
Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe  
Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

## 2.1.4 GERÄTE

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Analysenwaage ABT 120 5 DH	Kern, Buchholz
Brutschrank BBD6220	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Density Meter Ultraspec 10	Amersham Bioscience
Gefrierschrank -80°C Ultra Low	Sanyo, San Diego, CA USA
Kühlzentrifugen:	
Sorvall® RC26 PLUS	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Magnetrührer MR3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mili-Q	Millipore, Consett, UK
Nano Drop	Thermo-Scientific, Rockford, USA
pH-Meter (MP225)	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipettierhilfe (Accu-Jet,Pipet-Boy)	Brand, Wertheim
Realtime-PCR Maschine iCycler IQ5	Bio-Rad, München
Sterilbank	Hera Safe, Thermo Scientific
Sterilbank HLB2472 GS	Heraeus, Hanau

## Material & Methoden

Thermoblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen
Vortexer	VWR International
Waage Precisa 600	Oehmen, Essen
Waage EMB-2200-0	Kern, Buchholz
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach

### 2.1.5 KITS

<b><u>Produkt</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
ELISA IFN- $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA IFN- $\beta$	BioLegend, San Diego, USA
ELISA IFN $\gamma$	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA IL-12p40	R&D Systems, Minneapolis, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFischer, Massachusetts, USA

### 2.1.6 STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER

<b><u>Stammlösung oder Puffer</u></b>	<b><u>Zusammensetzung</u></b>	
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
FACS- Puffer	500 mL	PBS
	2mM	EDTA
	2% (v/v)	FCS

## Material & Methoden

FACS Stop-Puffer	500mL 10mM	PBS EDTA
Fixierungspuffer (2%) (ICS)	50ml 1ml	PBS Formalin
HFF-Zellen Medium	500ml	IMDM
	5ml	Glutamat
	50ml	FCS
	50µl	β-Mercaptoethanol
Organ Lyse Puffer	50 mM 100 mM 1% 100mM	Tris-HCL, pH 8,0 EDTA, pH 8,0 SDS NaCl
PBS	137 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	Eingestellt auf pH 7,4	
Permeabilisierungspuffer (ICS)	50 ml 0,5 ml	FACS Puffer Saponin Stock

## Material & Methoden

Proteinase K	20 mg/ml	
Saponin Stock	10 ml 1g	PBS Saponin
TAE-Puffer	2 M 1 M 0,1 M	Tris/HCl Eisessig EDTA
TE Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH 8,0 EDTA, pH 8,0

### 2.1.7 ANTIKÖRPER UND PENTAMERE

<u>Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Bezugsquelle</u>
CD3e	145-2C11	FITC	BD Biosciences
CD4	RM4-5	PerCP- Cy5.5	BD Biosciences
CD8 $\alpha$	53-6.7	PE-Cy7	BD Biosciences
IFN $\gamma$	4S.B4	PE	BD Biosciences

MHC I Pentamer	Allel	Sequenz	Ursprung des Epitops	Fluorophor	Bezugsquelle
Ovalbumin	H2-K <sup>b</sup>	SIINFEKL	Ovalbumin 257-264	APC	ProImmune Inc.
<i>T.gondii</i> ME49	H2-K <sup>b</sup>	SVLAFRRL	tg057 57-64	APC	ProImmune Inc.

## 2.1.8 PRIMER

Alle Primer wurden bei der Firma Metabion International AG bestellt [25 mM].

<b>Gen</b>		<b>Primersequenz</b>
<b>BAG-1</b>	FW	GAAATGATGGAGGACATCACG
	Rev	CTTTTTGCTGTCGAACTCCA
<b><math>\beta</math>-Aktin (murin)</b>	FW	TGACAGGATGCAGAAGGAGA
	Rev	CGCTCAGGAGGAGCAATG
<b>Caspase 11</b>	FW	TCTGGTTCCTCCATTCCAG
	Rev	CCAGACATTCTTCAGTGTGGAC
<b>ENO-1</b>	FW	CATTTTGGGCGTGTGCGAT
	Rev	AGTGGTAGGCCTTTTGATGC
<b>ENO-2</b>	FW	GCGACCAGAAGGGTATTGAC
	Rev	AGCCCCACTCGTTCTTAGTTC
<b>IDO</b>	FW	GGGCTTTGCTCTACCACATC
	Rev	AAGGACCCAGGGGCTGTAT
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	FW	CCATGAGCATCTTCGGTAGG
	Rev	TTTGGCGTCCAAGTCTGAGTC
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	FW	CAG GCA ACC TTT AAG CAT CAG
	Rev	CCT TTG ACC TTT CAA ATG CAG
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	FW	ATCTGGAGGAACTGGCAAA
	Rev	TTCAAGATCTCAAAGAGTCTGAGG
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	FW	AGTTGACGGACCCCAAAG
	Rev	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
<b>IL-4</b>	FW	CATCGGCATTTTGAACGAG
	Rev	CGAGCTCACTCTCTGTGGTG

<b>IL-6</b>	FW	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
	Rev	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA
<b>IL-12p40</b>	FW	CTACGAGCAACGCACCTTTC
	Rev	ATCCAGCGCAAGAAAGAAAA
<b>iNOS</b>	FW	TCATTGTA CTCTGAGGGCTGAC
	Rev	CTTTGGCACGGACGAGAC
<b>PD-1</b>	FW	TGCAGTTGAGCTGGCAAT
	Rev	GGCTGGGTAGAAGGTGAGG
<b>TLR-4</b>	FW	CTGATCCATGCATTGGTAGGT
	Rev	GGACTCTGATCATGGCACTG
<b>TLR-9</b>	FW	GAGAATCCTCCATCTCCCAAC
	Rev	CCAGAGTCTCAGCCAGCAC
<b>TLR-11</b>	FW	AAACCAGGCTGGCTCTCTC
	Rev	GTAGGTGCCCAGAAGGTTC
<b>TLR-12</b>	FW	TCTGAGGGGTAAGGGAGACA
	Rev	GCAGTGGGACACGAATACATC
<b>mGBP-1</b>	FW	CAGACTCCTGGAAAGGGACTC
	Rev	CTTGGACCTGGAACATTCCTGAC
<b>mGBP5</b>	FW	TCACTGAAGCTGAAGCAAGG
	Rev	GCGTCAAAAACAAAGCATTTC
<b>mGBP7</b>	FW	TTTCCACTAGGCACACAGGA
	Rev	GCAGAGAATCCGGTCCAG
<b>SAG-1</b>	FW	CTTCACTTGCACAGGCAGAA
	Rev	CAACCGTCAGCGTGAAATC
<b>Tg-ACT</b>	FW	TGCATACATCGCCCTCGAC
	Rev	GGACTTCTCGATGTCGCTAGA

<b>Tg-B1</b>	FW	GCTAAAGGCGTCATTGCTGTT
	Rev	GGCGGAACCAACGGAAAT
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FW	TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG
	Rev	GGTCTGGGCCATAGAACTGA

## 2.1.9 LABORVERBRAUCHSMATERIALIEN

### Produkt

### Hersteller

Deckgläschen: Microscope Coverslips	VWR, Darmstadt
Glasflaschen (100,250,500,1000,2000ml)	Schott AG
Handschuhe	Ansell Micro Touch
Kanülen	BD Pharma, Heidelberg
Objektträger	VWR, Darmstadt
Parafilm	American InternationalCan, Chicago,USA
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH
	Star- Lab International GmbH
Plastikware	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	
Spritzen	Omnifix, Melsungen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

### 2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.1 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Zellen oder Pathogenen wurden diese den Reaktionsgefäßen bzw. Zellkulturflaschen entnommen und durch Zentrifugation bei 1500 U/min. für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde dann in Einfriermedium (FCS mit 10%DMSO) resuspendiert, in Einfrierröhrchen mit Schraubverschluss überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach 24h konnten die Proben für eine langfristige Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt werden. Der genaue Ort der Lagerung und die Bezeichnung der Proben wurde zum Schluss im Stickstoff- Ordner, welcher im Labor hinterlegt ist, notiert.

Um Zellen bzw. Parasiten aufzutauen und in Kultur zu nehmen, wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und die Entnahme im Stickstoff-Ordner eingetragen. Anschließend wurden die Proben schnell angetaut und mit bereits vorgewärmtem Medium versetzt. Dann wurden die Zellen oder Pathogene bei 1500 U/min. für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im jeweiligen Medium resuspendiert. Nun konnten die Zellen ausgesät und die Pathogene zur Infektion verwendet werden.

#### 2.2.2 KULTIVIERUNG HUMANER VORHAUT- FIBROBLASTEN (HFF)

Die Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken mit HEPA- Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank, stets bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. HFF Zellen wurden bis Passage 40 passagiert. Bei konfluent bewachsenen T75 Flaschen wurden zweimal wöchentlich das Medium gewechselt. Dicht bewachsene T75 Flaschen wurden gesplittet. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Flasche mit PBS gespült. Anschließend wurde Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und direkt wieder abgesaugt. Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde im Lichtmikroskop die Vereinzelung der Zellen geprüft. Sofern die Vereinzelung ausreichend war, wurden die Zellen mit zuvor vorgewärmtem IMDM- Medium abgespült und in ein 15-ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1200 U/min. für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verwor-

fen. Die Zellen wurden dann mit IMDM- Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:6 auf T75 oder T25 Flaschen aufgeteilt. Zellen in T25 Flaschen wurden, nachdem sich eine konfluente Schicht gebildet hatte, zur Kultivierung von *T.gondii* ME49 verwendet.

### 2.2.3 KULTIVIERUNG VON *TOXOPLASMA GONDII* ME49

Für die Durchführung der *in vitro* Infektionsversuche mit *T.gondii* ME49 wurden die *Toxoplasma* in HFF- Zellen vermehrt. Hierzu wurden die Parasiten in T25 Zellkulturflaschen, welche einschichtig mit HFF-Zellen bewachsen waren, kultiviert. Sobald die Parasiten aus den Wirtszellen ausgestiegen waren und diese weitestgehend lysiert waren, wurde der Überstand abgenommen und in 15ml- Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 50 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Zellreste befanden, wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet im Reaktionsgefäß wurde in IMDM Zellmedium resuspendiert, bevor in einer weiteren Zentrifugation die Parasiten mit 600 x g für 15 Minuten bei RT pelletiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in IMDM- Zellmedium resuspendiert. Für die weitere Passage wurden  $0,5 - 1,5 \times 10^6$  *Toxoplasma* in eine mit HFF-Zellen bewachsene T25 Zellkulturflasche verbracht. Die Inkubation erfolgte anschließend im Brutschrank.

### 2.2.4 INDUKTION DER STADIENKONVERSION VON *TOXOPLASMA GONDII* ME49 *IN VITRO*

Um die Möglichkeit zu erhalten, die Genexpression der Bradyzoiten zu analysieren und hieraus eine Taq-Man qRT-PCR zu etablieren, musste zunächst *in vitro* die Stadienkonversion induziert werden. Hierzu wurde der NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) verwendet. SNP wurde in einer Konzentration von 70µM bzw. 35 µM (Endkonzentration) in eine oder mehrere mit HFF-Zellen bewachsene und mit *T.gondii* ME49 infizierte T25-Zellkulturflasche gegeben. Hierdurch erhöhte sich die Stickstoffoxidkonzentration im Kulturmedium und die Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten wurde eingeleitet. Alle 24h erfolgte eine weitere Zugabe von SNP und alle 48 h wurde das Medium gewechselt. Nach 8 Tagen Inkuba-

tion wurden die Zellen und die wenigen, bereits ausgestiegenen Toxoplasmen geerntet und es konnte die RNA für die Taq-Man qRT-PCR Etablierung isoliert werden.

### 2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.3.1 HERSTELLUNG VON PROTEIN - LYSAT AUS *TOXOPLASMA GONDII* ME49

Zur Herstellung von Toxoplasmen-Lysat, beispielsweise für die Restimulierung von T- Zellen, wurden die Toxoplasmen, wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben, geerntet. Anschließend wurden die Parasiten zweimal in PBS gewaschen und danach für 10 Minuten bei 2.800 U/min. zentrifugiert. Sodann wurde das Pellet in Proteinaseinhibitor- haltigem PBS mit einer Konzentration von  $10^9$  *Toxoplasma*- Stadien pro Milliliter aufgenommen. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann direkt in ein Wasserbad (37°C) überführt. Dieser Vorgang wurde mindestens dreimal wiederholt. Durch diesen Prozess wurden sukzessive alle Wirtszellen und Toxoplasmen zerstört. Um die Zelltrümmer und das Lysat der Toxoplasmen voneinander zu trennen, wurde die Probe bei 2.800 U/min. und bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand abgenommen, welcher das Toxoplasmen-Lysat enthielt. Mittels des Bicinchoninsäure-Assays (BCA) Kits der Fa. ThermoFischer wurde schließlich die Proteinkonzentration bestimmt. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

#### 2.3.2 ISOLATION DER RNA AUS ORGANGEWEBE

Nach schmerzfreier Tötung der Versuchstiere und der sich anschließenden Organentnahme wurden aus Teilen der Organe RNA isoliert, um sie schließlich - nach der cDNA- Synthese (siehe Kapitel 2.3.5.) - in der qRT- PCR einsetzen zu können.

Dazu wurden die Organe zunächst aus dem Gefrierfach (-80°C) entnommen und auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden die Organe halbiert. Die für die RNA- Isolation verwendete Hälfte wurde in ein 15-ml Falcon- Tube überführt. Die andere Hälfte wurde für die DNA- Isolation verwendet. Hierzu siehe Kapitel 2.3.4..

Alle weiteren Arbeiten der RNA- Isolation fanden unter dem Abzug statt. 3 ml Trizol (Fa. Invitrogen) wurde zu den Organen pipettiert. Anschließend wurden die Organe mit Hilfe des UltraTurrax<sup>®</sup> (VWR, Darmstadt) homogenisiert. Um die Kontamination der Proben zu verhindern, wurde das Gerät nach jeder Homogenisierung eines Organs jeweils in 3 Schritten gereinigt: zunächst mit PBS, dann mit 4 M NaOH und dann wieder mit PBS. Nachdem alle Proben auf diese Weise homogenisiert worden sind, wurden sie 5 Minuten bei RT inkubiert und die beweglichen Teile des UltraTurrax in 70% EtOH gereinigt. Anschließend wurden 200µl Chloroform zu jeder Probe gegeben. Nach vorsichtigem Invertieren erfolgte eine weitere Inkubation für 3 Minuten bei RT. Nun wurden die Proben in zuvor beschriftete 2ml- Eppendorf- Reaktionsgefäße umgefüllt und 15 Minuten bei 8.000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene obere, klare Phase mit Hilfe einer abgeschnittenen Spitze abgenommen und in ein weiteres frisches 2ml- Eppendorf- Tube verbracht. Nach Zugabe von 500 µl 2-Propanol wurden die Proben durch Schütteln intensiv vermischt und danach für 10 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 8.000 U/min. für 10 Minuten. Der jetzt entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% EtOH (in DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Nun wurden die Proben für 5 Minuten bei 6.000 U/min. abzentrifugiert und der Überstand mit einer 1000µl- Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde so lange, bis der Alkohol verdampft war (etwa 10 Minuten), trocknen gelassen, um es dann in 100µl DEPC- H<sub>2</sub>O aufzunehmen. Jetzt wurden die Proben bei 56°C auf einem Heizblock inkubiert, wobei sich das Pellet löste. Abschließend wurde der RNA- Gehalt der Proben mittels des NanoDrops (Fa. ThermoFischer) gemessen. Die Lagerung wurde bei -80°C durchgeführt. Für die anschließend folgende cDNA- Synthese wurden 3µg pro Probe eingesetzt.

### 2.3.3 ISOLATION DER RNA AUS DER ZELLKULTUR

Um die RNA aus den Zellkulturen zu isolieren, wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen entnommen und bei 1.800 U/min. bei RT abzentrifugiert. Nun wurde das entstandene Pellet in

2 ml Trizol® resuspendiert. Die weiteren Schritte zur Isolierung der RNA entsprachen der Vorgehensweise der RNA Isolierung aus Organgewebe, welche in Kapitel 2.3.2. beschrieben wurde.

### 2.3.4 ISOLATION DER DNA AUS ORGANGEWEBE

Nach der schmerzfreien Tötung der Versuchstiere und der sich anschließenden Organentnahme wurden aus ca. 50% der Organe Leber, Gehirn und Lunge DNA isoliert, um sie in der PCR einsetzen zu können. Dies wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde ein ausreichend großes Stück des jeweiligen Organs von der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Probe in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht. Anschließend wurden  $750\mu\text{l}$  DNA Lyse- Puffer und  $35\mu\text{l}$  Proteinase K (Fa. NEB) zugegeben und das Reaktionsgefäß über Nacht auf einem Schüttler bei  $56^{\circ}\text{C}$  und  $600\text{ U/Min.}$  inkubiert. Sobald sich das Gewebe am nächsten Tag gelöst hatte, wurden  $700\mu\text{l}$  Phenol hinzugegeben, die Proben gevortext und 10 Minuten bei  $13,000\text{ U/Min.}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches  $1,5\text{ml}$  Reaktionsgefäß pipettiert.  $700\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform wurden dazu gegeben und die Proben intensiv geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit den gleichen Parametern wurde wiederum der Überstand abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß verbracht. Nun wurden  $700\mu\text{l}$  Chloroform zu jeder Probe hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und einer weiteren Zentrifugation wurde erneut der Überstand abgenommen. Im Anschluss wurden  $700\mu\text{l}$  Isopropanol zu jeder Probe zugefügt. Die Proben wurden solange invertiert, bis die DNA sichtbar präzipitiert war. Hiernach wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem Pellet wurden jetzt  $200\mu\text{l}$  70% Ethanol beigefügt und erneut invertiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei  $13,000\text{ U/Min.}$  und das anschließende Verwerfen des Überstands. Nachdem das Pellet wenige Minuten unter dem Abzug an der Luft trocknen konnte, wurde es, je nach Größe der eingesetzten Gewebemenge, in  $30\text{-}200\mu\text{l}$  TE- Puffer resuspendiert. Die so aufgereinigte DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.5 SYNTHESE DER cDNA

Die Herstellung der komplementären DNA (cDNA) war für die Durchführung der quantitativen RT-PCR (2.3.7.) essentiell. Hierzu wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und Oligo dT Primern ein zu der RNA komplementärer Strang DNA hergestellt.

Zunächst wurden die RNA- Proben aus dem Gefrierfach (-80°C) entnommen und auf Eis aufgetaut. Je 3µg RNA wurde aus den Proben entnommen und in frische 1,5ml Eppendorf- Tubes verbracht. Die Proben wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt, so dass ein Endvolumen von 10µl erreicht wurde. Anschließend wurde je 1µl Oligo dT Primer (10µM; Fa. ThermoFischer) zugefügt, um sicher zu stellen, dass ausschließlich mRNA umgeschrieben wird. Es folgte eine Inkubation für 2 Minuten auf einem Heizblock bei 70°C. Im Anschluss wurden die Proben für weitere 2 Minuten auf Eis gekühlt.

Zu jeder Probe wurde dann 9µl des Master- Mix zugegeben. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

1µl dNTP's (10 mmol)

4µl Transkriptionspuffer

2µl DTT (0,1 M)

1µl RNase Out

1µl Reverse Transkriptase (m-MLV; 200 Units/µl)

Aus dem RNA-Ansatz und dem Master-Mix ergab sich somit ein Gesamtvolumen von 20µl pro Probe. Für die Synthese der cDNA erfolgte eine Inkubation auf einem Heizblock bei 37°C für 1h. Es folgte die Enzyminaktivierung bei 95°C für 5 Minuten. Die Proben wurden schließlich auf Eis verbracht und mit 80µl DEPC- H<sub>2</sub>O versetzt (~Endvolumen:100µl). Die Proben konnten bei -20°C gelagert werden. Für die qRT-PCR wurden jeweils 5µl der so hergestellten cDNA eingesetzt.

## 2.3.6 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion wird die Fähigkeit der DNA-Polymerasen, aus einzelsträngiger DNA als Matrize einen Komplementärstrang zu synthetisieren, genutzt. So kann man unter Verwendung von Primern Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz produzieren und diese somit vervielfältigen. Die doppelsträngig vorliegende DNA wird zunächst bei 95°C denaturiert. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich die spezifischen Primer an die 5'- und 3'- flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments. Im dritten Schritt synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C den Komplementärstrang. Die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten Produkts.

Es wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

10x Reaktionspuffer	5µl
Primer 1	1µl
Primer 2	1µl
dNTP Mix (10mM)	1µl
Thermostabile Polymerase	1µl
DNA	100ng
Ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50µl

Durchführung des Reaktionszyklus:

1. Initiale DNA Denaturierung	95°C	7 Minuten
2. DNA Denaturierung	95°C	1 Minuten
3. Annealing	55°C-68°C	30 Sekunden
4. Elongation	72°C	1 min/kb des Produkts
5. Finale Elongation	72°C	10 Minuten
6. Hold	4°C	

Es wurden zumeist 40 bzw. 50 Zyklen der Schritte 2-4 durchgeführt.

### 2.3.7 QUANTITATIVE TAQ-MAN REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION (TAQ-MAN QRT-PCR)

Die quantitative TaqMan qRT-PCR bietet, basierend auf dem Prinzip der PCR, die Möglichkeit zur Quantifizierung des entstehenden PCR Produkts mittels Fluoreszenzmessung während eines jeden Zyklus und erlaubt somit Rückschlüsse auf die mRNA Menge eines bestimmten Gens. Hierbei binden die Primer an die cDNA und die Taq-Polymerase kann mit der Synthese des Komplementärstranges beginnen. Zwischen den Primern bindet noch die spezifische Sonde, welche mit einem Quencher (TAMRA), sowie einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM), markiert wurde. Durch die 5' zu 3'- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde abgebaut und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Diese nimmt in jedem Zyklus exponentiell zu und ist äquivalent zur Ausgangsmenge der cDNA.

Mit Hilfe dieser Methode kann man somit die relative Genexpression des Zielgens analysieren. Die Auswertung wurde unter Verwendung der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Als Standardgen bei der Analyse der Effektor Moleküle wurden das murine  $\beta$ -Aktin verwendet. Bei der Analyse der Stadienkonversion wurde das von *T.gondii* ME49 stammende Tg-Aktin-1 als Standardgen benutzt.

Alle Arbeiten hierzu wurden auf Eis durchgeführt. Sobald die Zugabe der jeweiligen Sonde erfolgte, wurde auf eine möglichst geringe Lichteinstrahlung geachtet. Es wurden immer mindestens Doppelbestimmungen pro Probe durchgeführt.

Der folgende Reaktionsansatz wurde hergestellt:

FastStart MasterMix (Invitrogen), inkl. Polymerase	12,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6,5 $\mu$ l
Primer 1	0,25 $\mu$ l
Primer 2	0,25 $\mu$ l

## Material & Methoden

Sonde	0,5 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>25<math>\mu</math>l</b>

Die Taq-Man qRT-PCR wurde mit den folgenden Konditionen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	95°C	7 Minuten
2. Denaturierung	95°C	20 Sekunden
3. Annealing und Elongation	60°C	1 Minute
4. Hold	4°C	Unendlich

Die Schritte 2 und 3 wurden zyklisch 40 bzw. 50-fach wiederholt. Nach jedem Annealing und Elongationsschritt wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz pro Zyklus der jeweiligen Probe wurde in Ct- Werten dargestellt und gespeichert. Dies erfolgte jeweils automatisch.

Die Taq-Man qRT-PCR wurde an einem iQ5 von BioRad durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurde Excel verwendet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Programm GraphPad Prism umgesetzt.

### 2.3.8 QUANTITATIVE SYBR-GREEN REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION (SYBR-GREEN qRT-PCR)

Die quantitative Sybr Green RT-PCR ermöglicht, wie auch die Taq-Man qRT-PCR, die Quantifizierung des entstehenden PCR-Produkts mittels Fluoreszenzmessung. Im Gegensatz zur Taq-Man Methode befindet sich hier keine spezifisch zwischen den Primern bindende Sonde. SybrGreen interkaliert mit doppelsträngiger DNA und die Fluoreszenz erhöht sich mit steigender Menge an vorhandener DNA an. Somit ist die Zunahme der Menge an Zielgen äquivalent mit der Zunahme der Fluoreszenz pro Zyklus. Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die tatsächliche, spezifische Elongation des gewünschten Gens überprüfen zu können.

## Material & Methoden

Der Reaktionsansatz wurde immer auf Eis hergestellt und es wurde darauf geachtet, die Reagenzien möglichst geringer Lichteinstrahlung auszusetzen, da dieses die Funktion des SybrGreen beeinträchtigt.

Es wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

Mesagreen MasterMix (Eurogentec, Köln)	12,5 µl
Primer 1	0,075 µl (1:4; aus 100µM Stock)
Primer 2	0,075 µl (1:4; aus 100µM Stock)
H <sub>2</sub> O	10 µl

Nach dem Vorlegen des Reaktionsansatzes wurden 2,5µl des Templates hinzugegeben und die 96-well RT-PCR- Platte in die RT-PCR Maschine verbracht.

Die verwendete Maschine war ein CFX96 qRT-PCR System von Bio-Rad. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde neben der systemeigenen Software CFX Manager Microsoft Excel und GraphPad Prism verwendet.

### 2.3.9 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zum Auftrennen von DNA Fragmenten, wie zum Beispiel PCR- Produkten, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurde 1% (w/v) Agarose in TAE Puffer aufgekocht und nach kurzer Abkühlphase mit Ethidiumbromid (1% (v/v) Lösung) versetzt (1µl EtBr/100ml Agaroselösung). Nach Polymerisation des Gels in der Gelkammer konnte es im TAE- Puffersystem mit den Proben beladen werden. Diese wurden dann durch Anlegen eines Spannungsfeldes (120V) nach der Größe aufgetrennt. Die anschließende Analyse des Gels wurde mit Hilfe der GelDok (BIO-RAD) durchgeführt.

### 2.3.10 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Um die *T.gondii* spezifische CD8<sup>+</sup> - Zell- Frequenz zu analysieren, sowie die Produktion von intrazellulärem IFN $\gamma$  mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (*intracellular cytokine staining*; ICS) in Zellen von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP-2<sup>-/-</sup> Mäusen zu messen und auszuwerten, wurde die Methode der Durchflusszytometrie (FACS) ausgewählt. Die Vorgehensweise wird im Folgenden näher erläutert.

#### 2.3.10.1 Ovalbumin-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenz

Um zunächst eine Positivkontrolle über die Funktionsfähigkeit der Pentamere zu erhalten, wurde diese unter Verwendung von Mäusen der OT-1 Mauslinie im Vergleich zu naiven Tieren der wildtypischen Mauslinie getestet. OT-1 Mäuse haben ausschließlich T-Zellen, die spezifisch Ovalbumin (Peptid-Sequenz: SIINFEKL) erkennen. Hierzu wurden MHC I Pentamere erworben, die dieses spezifische Peptid tragen.

Zunächst wurden die Mäuse schmerzfrei getötet, die Milz entnommen und solange in einem 6- Well Schälchen mit 4ml PBS aufbewahrt, bis alle Organe des Versuchstages entnommen waren. Die Milz wurde mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere grob zerkleinert. Anschließend wurde sie durch ein Sieb (70 $\mu$ m) in ein 50ml Falcon- Tube gedrückt und mit 10ml FACS- Puffer gespült, sodass das Zellmaterial vom Sieb ins Röhrchen gespült wurde. Hiernach wurden die Proben für 5 Minuten bei 1200 U/min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit Hilfe von Glaspipetten abgesaugt und 3ml Erythrozyten- Lyse- Puffer (Fa. Sigma- Aldrich) zu den Proben gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 7 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5ml FACS- Puffer gestoppt. Die Proben wurden dann bei 4°C für 5 Minuten bei 1.200 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10ml FACS- Puffer resuspendiert. Nun konnte mittels CellCounter oder unter Verwendung der Neubauer- Zählkammer die Zellzahl bestimmt werden. Pro Probe sollten 1 Million Zellen gefärbt werden. Die entsprechende Menge wurde den Proben entnommen und durch eine Gaze in ein FACS- Röhrchen gegeben. Nun wurden die FACS- Röhrchen bei 1.200 U/min. für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet in 1ml FACS- Puffer resuspendiert. Dann wurde der Fc- Block durchgeführt, um unspezifische Bindungen der anschließend verwendeten Antikörper zu reduzieren. Hierzu wurde in einem frischen Eppendorf- Tube eine

## Material & Methoden

1:50- Verdünnung des Fc- Block mit FACS- Puffer hergestellt. Hiervon wurden je 25µl zu den Zellen gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen zentrifugiert (1.200U/min.; 5min.; 4°C), der Überstand abgenommen und die Zellen wieder in 50µl FACS- Puffer resuspendiert. Nun wurden 10µl des MHC I Pentamers, welches mit dem spezifischen Peptid beladen war (SIINFEKL; APC), unverdünnt hinzugegeben (Fa. ProImmune; siehe Kapitel 2.17). Dies ist laut Hersteller ausreichend um  $1-2 \times 10^6$  Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen anzufärben. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubationszeit bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die so behandelten Zellen zentrifugiert (1.200U/min.; 5min.; 4°C) und in 1ml FACS- Puffer resuspendiert. Dann folgte die Färbung mit den folgenden Antikörpern (siehe Kapitel 2.17):

CD3e (FITC)

CD4 (Per-CP-Cy5.5)

CD8α (PE-Cy7)

Hierzu wurde zunächst eine Verdünnung von 1:100 der Antikörper in FACS- Puffer frisch angesetzt, wovon dann 25µl auf jede Probe gegeben wurde (18 Proben +2 ~ 485µl FACS- Puffer und je 5µl Antikörper). Nach der sich anschließenden Inkubation von 10 Minuten im Dunkeln bei 4°C wurde den Zellen 3ml FACS- Puffer zugegeben und die Proben anschließend zentrifugiert (1.200U/min.; 5min.; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in einer DAPI- Lösung (1:200 im FACS- Puffer; 500µl) resuspendiert. Die Herstellung der Proben für das FACS war nun abgeschlossen. Um allerdings eine korrekte Messung des Gerätes zu gewährleisten, wurden für jeden der zu messenden Antikörper Kompensationskontrollen hergestellt. Hierzu wurden Kompensations- Beads verwendet. Zu 70µl FACS- Puffer wurden je 1 Tropfen aus dem Gefäß mit dem grünen Deckel und ein Tropfen aus dem Gefäß mit dem weißen Deckel gegeben. Abschließend wurde zu diesen Kontrollen jeweils 1µl des jeweiligen Antikörpers (1:100 in FACS- Puffer) hinzu pipettiert und 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Eine Ausnahme stellte hier die Färbung mit DAPI für die Kompensationskontrolle dar. Hierbei wurden 1 Mio. Zellen verwendet. Die entsprechende Zellmenge wurde abzentrifugiert (1.200U/min.; 5min.; 4°C) und in 100 µl einer 1:200 DAPI- Lösung in FACS- Puffer resuspendiert.

Die so hergestellten Proben konnten im Durchflusszytometer FACS- Canto gemessen werden. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit den Programmen FACS Diva, FlowJo und GraphPad Prism durchgeführt.

### 2.3.10.2 *T.gondii*-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenz

Die Analyse der *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell Frequenz erfolgte analog zur Untersuchung der Ovalbumin-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenz.

Hier wurden die Tiere der mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben mit 20 bzw. 40 Zysten *T.gondii* ME49 intraperitoneal infiziert. Im 20 Zysten Infektionsmodell wurden die Tiere an den Tagen 7,14,21 und 28 aus dem Versuch genommen, die Milzen entnommen und die CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenz analysiert. Im 40 Zysten Infektionsmodell wurden die Versuchstiere am Tag 7 aus dem Versuch genommen, die Milzen entnommen und CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenz analysiert. Es wurden zusätzlich pro Versuchstag und Mauslinie 3 naive Tiere analysiert. Das hier verwendete MHC I Pentamer trug das Peptid SVLAFRRL (APC als Konjugat), welches kürzlich als *T.gondii*- spezifisch klassifiziert werden konnte. Auch dieses wurde exakt nach Herstellerangaben appliziert (10µl unverdünnt).

Die weiteren verwendeten Antikörper waren (siehe Kapitel 2.17):

CD3e (FITC)

CD4 (Per-CP-Cy5.5)

CD8α (PE-Cy7)

Die Auswertung der Ergebnisse fand ebenso analog zu dem in Kapitel 2.3.10.1. beschriebenen Experiment statt.

### 2.3.10.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)

Um die Funktion der CD4<sup>+</sup> T- Zellen zu überprüfen, wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Hierbei werden T-Zellen mit einem spezifischen Antigen restimuliert. Anschließend wird durch Zugabe eines Sekretionshemmers die Menge des jeweiligen Zytokins intrazellulär erhöht, sodass sich die Zytokine schließlich mittels Durchflusszytometer nachweisen lassen. Hierbei zeigt sich, in welchem Maße die jeweils gemessenen Zellen Zytokine produzieren. Dies lässt einen Rückschluss auf die Aktivität des jeweiligen Immunsystems zu.

Zunächst wurden die Tiere infiziert, am Versuchstag euthanasiert und die Milz entnommen. Nachdem die Zellen vereinzelt worden sind, wurden pro Well einer 96-well Platte 1 Million Zellen vorgelegt. Nun wurde das spezifische Peptid in einer Konzentration von 10µg/ml in RPMI (10%FCS; Pen/Strep) hinzugegeben und die Probe für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je 10 µg/ml Brefeldin A, zur intrazellulären Anreicherung des Zytokins, hinzu pipettiert. Dann wurde die Probe weitere 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit folgte eine Zentrifugation (5 Minuten/1200 U/Min./RT) und der Überstand wurde verworfen. Die Antikörper für die Durchflusszytometrie (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>) wurden in einer Verdünnung von 1:200 in FACS Puffer hinzugegeben und die Probe 20 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert (siehe Kapitel 2.17). Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von FACS Puffer gewaschen und bei 1200U/Min für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 200µl Fixierungspuffer pro Probe zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Im Folgenden wurde dann der IFN $\gamma$  Antikörper (siehe Kapitel 2.17) zur intrazellulären Färbung in der Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank wurde die Probe ein weiteres Mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde FACS Diva, FlowJo und GraphPad Prism verwendet.

### **2.3.11 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zur Analyse der Proteinkonzentration im Serum. Hierbei bindet zunächst ein spezifischer Antikörper an ein Antigen des zu bestimmenden Proteins. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, an welchem ein Reporterenzym gebunden ist, hinzugegeben. Nach Zugabe des passenden Substrates kann dann ein Farbumschlag, welcher proportional zur Proteinkonzentration ist, mittels ELISA-Reader bestimmt werden.

Zur Durchführung des ELISA Tests wurde, wie in Kapitel 2.4.8. beschrieben, Serum von Versuchstieren gewonnen. Das Verfahren der ELISA wurde nach den Vorgaben des jeweiligen Kits durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz wurde am ELISA- Reader vorgenommen. Zur Auswertung und graphischen Darstellung wurden die Programme MS Excel bzw. GraphPad Prism verwendet.

### 2.3.12 BESTIMMUNG DES TITERS VON LCMV

Die Bestimmung des Virus Titer wurde mit Hilfe des Plaque Assays durchgeführt. Dieser Assay ist eine Methode bei der sich der zytopathische Effekt von Viren zu Nutzen gemacht wird.

Die jeweiligen Organe der Versuchstiere wurden entnommen und zweimal mit kaltem PBS gespült, um Erythrozyten zu entfernen. Nun wurden die Zellen des Gewebes unter Verwendung eines Siebs vereinzelt und auf Eis gelagert, bis alle Organe entsprechend behandelt wurden. Anschließend wurden 3 Zyklen von Einfrieren und Auftauen (Freeze and Thaw) durchgeführt. Nun wurden die Reaktionsröhrchen bei 3000 U/min. für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und für den weiteren Ablauf aufbewahrt. Das Pellet, welches die Überreste der Zellen enthielt, wurde verworfen. Nun wurden mit den Überständen serielle Verdünnungen von  $10^0$ - $10^{-8}$  mit DMEM hergestellt. Anschließend wurde von zuvor in 12-well Platten angezogenen und bereitgestellten Vero-Zellen das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurde von den jeweiligen Verdünnungen je 200µl zu jeweils 3 Wells pipettiert. Nun wurden die 12 Well Platten 1h bei 37°C inkubiert und alle 15 Minuten vorsichtig bewegt um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Viruspartikel zu erhalten. Anschließend wurden die Virus- Verdünnungen aus den Wells wieder abgenommen und verworfen. Zu den Wells wurde nun eine dünne Schicht Agar zugegeben und die Platten für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Hiernach hatten sich die sogenannten Plaques gebildet und der Agar konnte entfernt werden. Nun wurden die Wells für 1h bei 37°C mit einer 1:10.000 Verdünnung von Neutralrot gefärbt und im Anschluss die nun gut sichtbaren Plaques gezählt. Um den Titer rechnerisch zu bestimmen wurde folgende Formel verwendet:  $\text{Titer [pfu/ml]} = [\text{Anzahl Plaques/Well}] / [\text{Volumen des Inoculums/Well}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

### 2.4 TIERVERSUCHE

#### 2.4.1 VERSUCHSTIERE

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß §8 Tierschutzgesetz (TierSchG) und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Die Pflege und Durchführung der Zucht der Mauslinien oblag den Mitarbeitern der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT).

Bei den Käfigen der Tiere im ZETT handelte es sich um Individually Ventilated Cages (IVC). Für den Transport der Tiere wurden Käfige mit Luftfilter verwendet. Diese Käfige wurden dann ausnahmslos in fest verschließbaren, unzerbrechlichen Gefäßen zwischen ZETT und Institut bewegt.

#### 2.4.2 PRÄPARATION DER GEWEBEZYSTEN AUS CD-1 MÄUSEN

Um Infektionsversuche mit *T. gondii* durchführen zu können, wurden zunächst Zysten aus Trägartieren präpariert. Hierzu wurden CD-1- Mäuse verwendet, welche bereits mindestens seit 4 Wochen infiziert waren. Diese Tiere wurden dann durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und insgesamt drei Mal in PBS in einem Well einer 6-Well- Platte gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Danach wurde das Gehirn mit der Schere grob zerkleinert. Nun wurden weitere 4 ml PBS hinzugegeben. Anschließend wurde das Gewebe mittels Auf- und Abpipettieren durch sukzessive kleiner werdende Kanülen fein zerkleinert. Die verwendeten Gauge- Größen der Kanülen waren 23 (rosa), 22 (gelb), 20 (schwarz) und 18 (blau) und wurden in dieser Reihenfolge genutzt. Die entstandene Suspension wurde in ein 50ml- Falcon- Tube überführt und die Schale der 6-well- Platte anschließend zwei Mal mit 5ml PBS nachgespült. Im nächsten Schritt wurde die Gehirnsuspension zentrifugiert (5 Min.; 800 U/min.; RT), wonach der Überstand vorsichtig abgesaugt werden konnte. Das so entstandene Pellet wurde dann in 1ml PBS resuspendiert. Zu diesem 1ml wurden dann weitere 14 ml zugegeben um anschließend mit 10 ml Percoll unterschichtet zu werden. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (25 Min.; 2.500 U/min.; RT). Hierbei war es wichtig,

## Material & Methoden

die Beschleunigung der Zentrifuge auf den niedrigsten Wert einzustellen und die Bremse auszuschalten, um ein möglichst sanftes Auslaufen der Zentrifuge zu gewährleisten.

Bei diesem Vorgang bildete sich ein Gradient. Die Zysten waren im kaum sichtbaren Pellet enthalten, während sich die Zellreste in der Interphase befanden. Die Interphase wurde abgenommen und in einem frischen Gefäß aufbewahrt, um gegebenenfalls weitere Zysten aus ihr zu gewinnen. Der restliche Überstand wurde ebenso vorsichtig abgenommen, dann aber verworfen. Lediglich ca. 1ml Lösung verblieb im Falcon- Tube, worin das Pellet resuspendiert wurde. Nach der folgenden Zugabe von 50ml PBS und der vorsichtigen Inversion, wurde die Probe bei 2.000 U/min. für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder mit Ausnahme von ca. 500 µl abgenommen, worin das Pellet resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Zysten mittels Dreifachbestimmung ausgezählt:

- 10µl Suspension auf Objektträger geben, 18x18 Deckglas
- 15µl Suspension bei 22x22 Deckglas
- 50µl Suspension in 1 Well einer 96-well- Platte.

Sobald die Zysten ausgezählt waren, wurde die entsprechende Zystenanzahl in 0,5ml PBS in eine 24- Well- Platte gegeben. Hierzu wurden 150µl Trypsin/ EDTA- Lösung (Biochrom) zugeführt und die Suspension durchmischt. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Lyse der Zysten und damit die Freisetzung der Bradyzoiten beobachtet werden. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 0,5ml FCS gestoppt, sobald nahezu alle Zysten lysiert waren. Hier-nach wurden die freigesetzten Bradyzoiten in ein frisches 15ml Reaktionsgefäß pipettiert und das benutzte Well mit 2ml PBS nachgespült.

Für die Infektion von Mäusen wurden pro Individuum je 20 Zysten in 200µl PBS aufgenommen und intraperitoneal appliziert.

### 2.4.3 INFEKTION DER VERSUCHSTIERE MIT *TOXOPLASMA GONDII* ME49

Für die Infektion der Versuchstiere wurden zunächst Tiere über Tick@Lab aus dem Zucht-  
raum der ZETT in den Infektionsraum bestellt. Die Tiere wurden zur optimalen Akklimatisie-  
rung zunächst für 7 Tage in diesem Raum gehalten. Anschließend wurde die Infektion durch-  
geführt. Hierzu wurden zunächst Tiere der CD-1 Mauslinie aus dem ZETT in das S2-Labor  
transportiert. Nun wurden, wie in Kapitel 2.4.2. dargestellt, die Bradyzoiten aus den Zysten  
der Mäuse der CD-1-Mauslinie isoliert. Nachdem die Zystenanzahl auf die jeweils geplante  
Infektion abgestimmt worden war, wurde den zu infizierenden Tieren im Infektionsraum der  
ZETT unter einer S2-Sterilbank intraperitoneal (i.p.) 200 µl der Infektionslösung (PBS) appli-  
ziert. Anschließend wurde die Infektionsdosis und das Datum der Infektion auf den Karten  
der Käfige notiert. Es wurde bis zum Tag des Endes des Experiments täglich eine Sichtkon-  
trolle der Tiere durchgeführt und Tiere mit Belastungsanzeichen wurden gegebenenfalls  
schmerzlos euthanasiert.

### 2.4.4 INFEKTION VON MÄUSEN MIT LCMV

Für die Infektion der Versuchstiere mit LCMV wurden sie 7 Tage vor dem Infektionstermin  
über Tick@Lab aus dem Zucht-  
raum des ZETT in den Infektionsraum bestellt. Nach dieser  
Akklimatisierungsphase wurden die Tiere dann mit 1000, 3000 bzw. 9000 Plaques bildende  
Einheiten (PFU; *plaque forming units*) LCMV DOCILE infiziert. Die Applikation erfolgte in  
200µl PBS intravenös (i.v.) an der Schwanzwurzel. Anschließend wurde die Infektionsdosis  
und das Datum der Infektion auf den Käfigkarten notiert. Es wurde bis zum Tag des Ende des  
Experiments täglich eine Sichtkontrolle der Tiere durchgeführt.

### 2.4.5 INFEKTION VON MÄUSEN MIT VSV

Für die Infektion mit VSV wurden die Tiere 7 Tage vor dem Infektionstermin in den Infektionsraum der ZETT bestellt. Den Tieren wurden 10.000 pfu i.v. in 200µl PBS appliziert. Es wurde das Datum der Infektion und die Dosis auf den Käfigkarten notiert. Bis zum Ende des Experiments wurde eine tägliche Sichtkontrolle der Tiere durchgeführt.

### 2.4.6 BESTIMMUNG DER MORTALITÄTSRATE

Zur Bestimmung der Mortalitätsrate der Versuchstiere wurden Mäuse des mGBP2<sup>+/+</sup>, mGBP2<sup>-/-</sup> sowie der IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Linie mit Pathogenen infiziert. Zusätzlich wurde jeweils eine Kontrollgruppe mit uninfizierten Tieren der jeweiligen Mauslinie gehalten. Nun wurde täglich der Zustand der Mäuse kontrolliert. Sofern eine Maus einen kritischen Zustand erreichte, wurde sie euthanasiert und so aus dem Versuch genommen. Die getöteten Tiere wurden zum Verbleib in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) in Autoklavierbeutel verbracht. Der Todestag der jeweiligen Tiere wurde notiert. Die Daten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism zu einem Graphen zusammengefasst.

### 2.4.7 EUTHANASIE DER VERSUCHSTIERE

Die Euthanasie der Versuchstiere wurde je nach weiterer Verwendung auf zwei unterschiedlichen Weisen durchgeführt. Bei einer ausschließlichen Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Sofern eine Entnahme des Blutes, zur Gewinnung von Serum (siehe Kapitel 2.4.8.), erforderlich war, wurde den Tieren eine standardisierte Überdosis Narkotikum intraperitoneal appliziert. Das Narkosemittel hatte folgende Zusammensetzung:

#### Ausgangslösung

Ketamin (Narketan)	100mg/ml
--------------------	----------

Xylazin (Xylapan) 10 mg/ml

### Benötigte Dosis

Ketamin (Narketan) 100mg/kg (= 100µg/g)

Xylazin (Xylapan) 10 mg/kg (= 10µg/g)

### Verabreichungsvolumen

10µl/g

### Benötigte Verdünnung

Ketamin (Narketan) ~ 1:10

Xylazin (Xylapan) ~ 1:20

### Ansatz

500µl Ketamin

250µl Xylazin

Ad 5ml mit NaCl

Die sterilen Inhaltsstoffe des Narkosemittels wurden aus den Behältern mithilfe von ebenfalls sterilen Einmalspritzen mit Einmal- Kanülen entnommen und in einem 50ml Reaktionsgefäß vermischt. Das zusammengefügte Narkosemittel wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Injektion in die Versuchstiere wurde das Narkosemittel in der Hand erwärmt. Die jeweiligen Inhaltsstoffe des Narkosemittels wurden bei 4°C gelagert.

Es wurden pro Versuchstier 600µl der Narkoselösung verwendet. Nach einer ausreichenden Wartezeit von mindestens 4 Minuten wurde die Wirkung der Narkose durch Stimulation des Fußreflexes getestet. Sofern dieser nicht mehr ausgelöst werden konnte, wurde mit der Blutentnahme begonnen. Nach erfolgter Präparation der Versuchstiere wurden diese in einem Autoklavierbeutel zur laborinternen Sammelstelle gebracht und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.4.8 HERSTELLUNG VON BLUTSERUM

Für die Gewinnung von Blutserum aus den Versuchstieren wurden die Tiere zunächst, wie in Kapitel 2.4.7. beschrieben, euthanasiert. Nachdem die Tiere keinerlei Reflexe mehr zeigten, wurde mit Hilfe einer Kanüle das Herzblut entnommen. Dieses wurde anschließend in verschlossenen 2ml Reaktionsgefäßen für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zur Hämagglutination. Im Anschluss an die Inkubation wurde eine Zentrifugation durchgeführt (13.000 U/min./ 30 Minuten/ RT). Nun konnte das Serum als Überstand abgenommen werden und in ein frisches 2-ml Reaktionsgefäß pipettiert werden. Das Pellet wurde verworfen und das Serum konnte bis zur Verwendung im Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA; siehe Kapitel 2.3.11.) bei -80°C aufbewahrt werden.

### 3 ERGEBNISSE

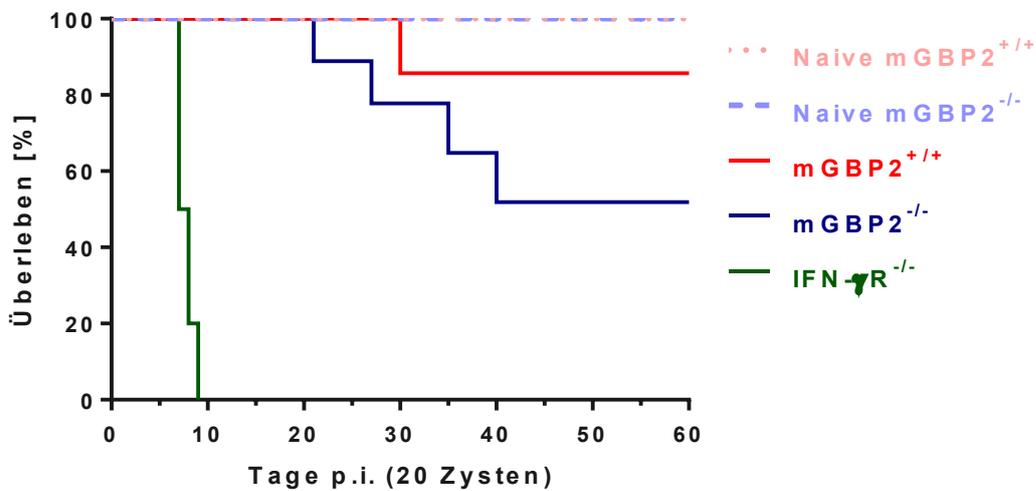
#### 3.1 LETALITÄTSRATE DER MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIE BEI INFEKTION MIT *TOXOPLASMA GONDII* ME49

Nachdem in dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten die Bedeutung von mGBP2 in der Immunantwort gegenüber *Toxoplasma gondii in vitro* (Degrandi et al., 2013) sowie *in vivo* (Dissertation Konermann, 2008) nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden die Immunantwort der mGBP2- defizienten Mauslinie im Tiermodell detaillierter analysiert werden.

##### 3.1.1 DIE MGBP2<sup>-/-</sup> MAUSLINIE ZEIGTE EINE ERHÖHTE STERBLICHKEIT BEI EINER INFEKTION MIT 20 ZYSTEN *T.GONDII* ME49

In diesem Experiment wurden Versuchstiere der Mauslinien mGBP2<sup>+/+</sup>, mGBP2<sup>-/-</sup> und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mit 20 Zysten i.p. infiziert. Die IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Mauslinie ist hochgradig immundefizient und dient zum Abschätzen des Schweregrades der Immundefizite der mGBP2<sup>-/-</sup> Linie (Scharton-Kersten et al., 1996; Suzuki et al., 1988). Hier ist die Signalübertragung über IFN $\gamma$  und damit das Auslösen einer Immunreaktion auf die Infektion mit *T.gondii* ME49 weitgehend blockiert (Scharton-Kersten et al., 1996). Dies hat zur Folge, dass die Versuchstiere bereits 7 bis 8 Tage nach der Infektion sterben. Die Versuchstiere der mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie wiesen eine andere Letalitätssrate auf. In der akuten Phase der Infektion zwischen den Versuchstagen 7 und 14 p.i., zeigte sich keinerlei Sterblichkeit. In der chronischen Phase, also zwischen Tag 21 und 28 nach Infektion, war eine leicht erhöhte Mortalität der mGBP2 defizienten Mauslinie zu verzeichnen. 40 Tage p.i. haben etwa 50% der mGBP2<sup>-/-</sup> und etwa 90% der mGBP2<sup>+/+</sup> Versuchstiere überlebt (Abb. 3.1). Es konnte bereits bei einer *T. gondii* Infektion mit 20 Zysten ein Unterschied in der Sterblichkeit zwischen solchen Versuchstieren, die mGBP2 noch exprimieren und solchen denen das Protein fehlt, beobachtet werden. Es kann-

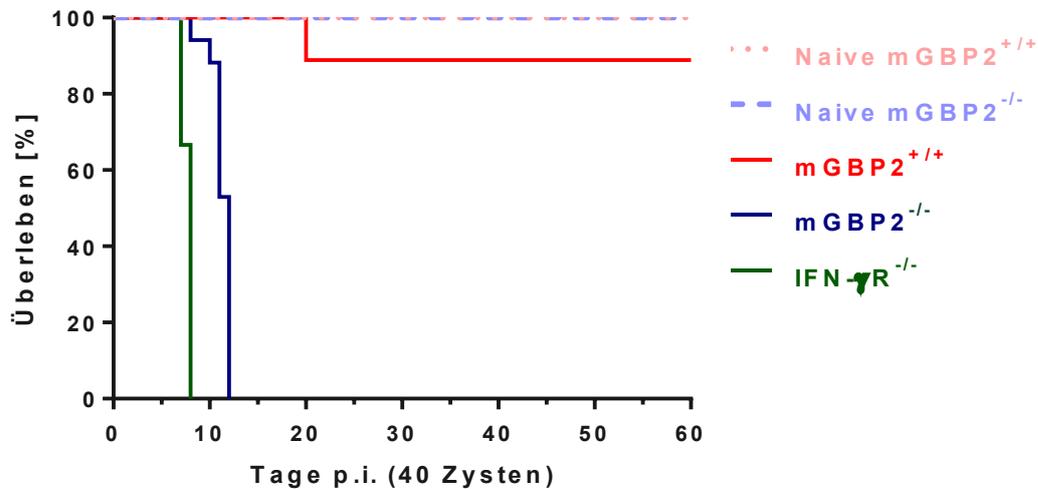
ten somit die durch C. Konermann (Dissertation, 2008) gemachten Beobachtungen bezüglich der Mortalitätsrate bestätigt und erfolgreich repliziert werden.



**Abbildung 3.1:** Überlebenskurve einer *T.gondii* ME49 Infektion mit 20 Zysten i.p. Die Versuchstiere wurden 1 Woche vor Versuchsbeginn in den Infektionsraum der ZETT bestellt. Die Tiere wurden mit am selben Tag aus infizierten CD1- Mäusen isolierten *T.gondii* ME49 Zysten intraperitoneal infiziert oder unbehandelt gelassen (naiv). Es wurden täglich Sichtkontrollen durchgeführt. An Tag 60 wurden die überlebenden Tiere aus dem Versuch genommen. Pro Mauslinie wurden 6 Mäuse verwendet. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 3 Wiederholungen.

### 3.1.2 DIE *mGBP2*<sup>-/-</sup> MAUSLINIE ZEIGTE EINE SIGNIFIKANT ERHÖHTE STERBLICHKEIT BEI EINER INFESTION MIT 40 ZYSTEN *T.GONDII* ME49

Nachdem die erhöhte Letalitätsrate der *mGBP2*<sup>-/-</sup> Mauslinie im 20 Zysten Infektionsmodell bestätigt werden konnte, wurde die Mortalitätsrate derselben Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell analysiert. Die zuvor durch Degrandi et al., 2013 publizierte Letalitätsrate zeigte eine signifikante Erhöhung in der *mGBP2*<sup>-/-</sup> Mauslinie ab dem Versuchstag 30 p.i.. Es zeigte sich, dass die *IFN*γ<sup>R</sup><sup>-/-</sup> Tiere, wie bereits bei der 20 Zysten Infektion, nach 7 bis 8 Tagen verstarben. Die *mGBP2*<sup>-/-</sup> Tiere hingegen überlebten bis Tag 10 p.i. An Tag 12 p.i. waren bereits alle Versuchstiere dieser Mauslinie verstorben. Die *mGBP2*<sup>+/+</sup> Mäuse hingegen zeigten eine sehr geringe Mortalität und waren in der Lage auch diese erhöhte Infektionslast erfolgreich zu kontrollieren. Die Dosis des Erregers hat hier - im Fall der Abwesenheit von *mGBP2* – einen noch deutlicheren Einfluss auf die Fähigkeit, die Infektion zu bekämpfen, zu haben, als zuvor beobachtet.

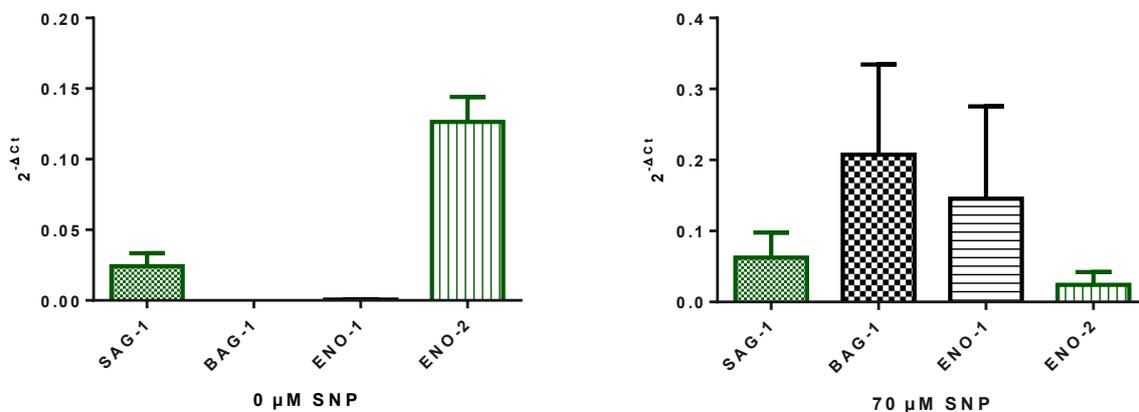


**Abbildung 3.2:** Überlebenskurve einer *T.gondii* ME49 Infektion mit 40 Zysten i.p. Die Versuchstiere wurden 1 Woche vor Versuchsbeginn in den Infektionsraum der ZETT bestellt. Die Tiere wurden mit am selben Tag aus infizierten CD1- Mäusen isolierten Zysten intraperitoneal infiziert oder nicht behandelt (naiv). Es wurden täglich Sichtkontrollen durchgeführt. An Tag 60 wurden die überlebenden Tiere aus dem Versuch genommen. Pro Mauslinie wurden 6 Mäuse verwendet. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

### 3.2 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DES *T.GONDII* ME49 INFEKTIONSVERLAUFS *IN VIVO*

Nachdem zuvor bestätigt werden konnte, dass die Abwesenheit von mGBP2 im Versuchstier zu einer erhöhten Letalität führte, sollte mit einer im Zuge dieser Dissertation etablierten Taq-Man qRT-PCR untersucht werden, ob in der mGBP2 defizienten Mauslinie eine Stadienkonversion vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten messbar ist und ob Unterschiede in der Induktion der selbigen nach zu weisen sind. Im Verlaufe einer Infektion im immunkompetenten Wirt findet bei *T. gondii* jene Konversion vom sich schnell teilenden, metabolisch sehr aktiven Stadium der akuten Infektionsphase, dem Tachyzoiten, in das sich langsam teilende Stadium der chronischen Phase, dem Bradyzoiten, statt. Hierbei ändert der Parasit sein Genexpressionsprofil deutlich (Radke et al., 2001). Für die Analyse des Infektionsverlaufs wurde nun versucht, sich diese Tatsache zu Nutze zu machen.

Um den Verlauf der Infektion darstellen zu können, wurden in der Literatur solche Gene gesucht, die in dem jeweiligen Stadium möglichst exklusiv exprimiert werden. Als Tachyzoiten-spezifische Gene wurden das Surface Antigen 1 (SAG-1) und die Enolase 2 (ENO-2) ausgewählt. Wie Radke et al. (2001) und Skariah et al. (2010) publizierten, sind diese Gene in Tachyzoiten deutlich nachweisbar. SAG-1 ist ein Oberflächenprotein, welches nur auf Tachyzoiten und nicht auf Bradyzoiten zu finden ist. Somit eignet es sich sehr gut für die Identifikation des Stadiums. Die Bandbreite der Funktionen von ENO-2 im Metabolismus von *T.gondii* ist noch nicht abschließend ergründet, es konnten jedoch einige regulatorische Mechanismen in Tachyzoiten erkannt werden.



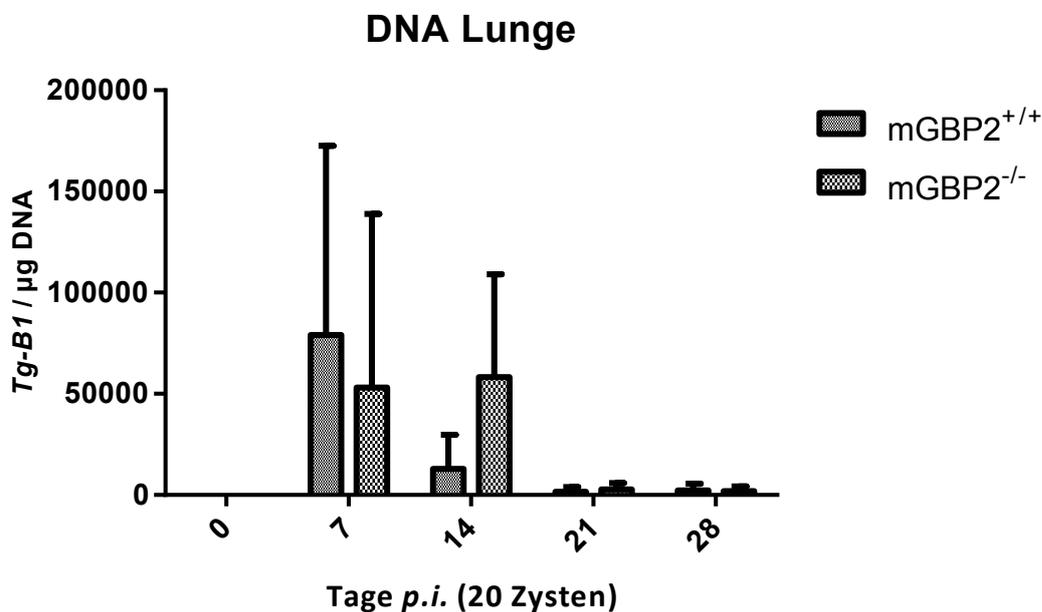
**Abbildung 3.3: Expression der Stadienspezifischen Gene *in vitro* bei Zugabe von 0 $\mu\text{M}$  SNP oder täglicher Zugabe von 70 $\mu\text{M}$  SNP.** In den *in vitro* Kulturen ohne SNP- Zugabe konnten hauptsächlich die Tachyzoiten spezifischen Gene SAG-1 und ENO-2 gemessen werden. Die Stadienkonversion wurde durch Zugabe des NO-Donors SNP eingeleitet. Es wurde eine deutliche Induktion der Bradyzoiten- spezifischen Gene sichtbar. Die Tachyzoiten- spezifischen Gene SAG-1 und ENO-2 wurden hier nur minimal exprimiert. Da keine 100%ige Stadienkonversion angenommen werden kann, sind die Messwerte erklärbar. Für diese Versuche wurden Tachyzoiten 8 Tage bei 37°C inkubiert. Es erfolgte täglich eine Applikation von 70 $\mu\text{M}$  SNP in das für die Stadienkonversion vorgesehene Kulturgefäß. Nach 8 Tagen wurden die Parasiten jeweils aus den Kulturgefäßen entfernt und ihre RNA mittels Trizol wie in Kapitel 2.3.3., beschrieben, isoliert. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern und Reverser Transkriptase durchgeführt. Es wurden jeweils 3 $\mu\text{g}$  RNA / Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 $\mu\text{l}$  in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 3 Wells für eine SNP Konzentration angesetzt und ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Standardgens Tg- Akt normalisiert. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und Graph Pad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die ausgewählten Bradyzoiten- spezifischen Gene waren das Bradyzoite Antigen 1 (BAG-1) und die Enolase 1 (ENO-1). BAG-1 konnte in mehreren Arbeiten, beispielsweise von Zhang et al. (1999) und Radke et al. (2001) als Bradyzoiten- spezifisches Oberflächenprotein beschrieben werden und eignet sich sehr gut für die Identifikation dieses Stadiums. Der Enolase 1 konnten Funktionen in der Regulation der Genexpression im Bradyzoiten- Stadium zugeordnet werden (Jiapeng et. al. 2015).

Um die gemessenen Werte der stadienspezifischen Gene auf die Gesamtzahl der Toxoplasmenlast in den Organen beziehen zu können, wurde ein Standardgen verwendet. Hierbei wur-

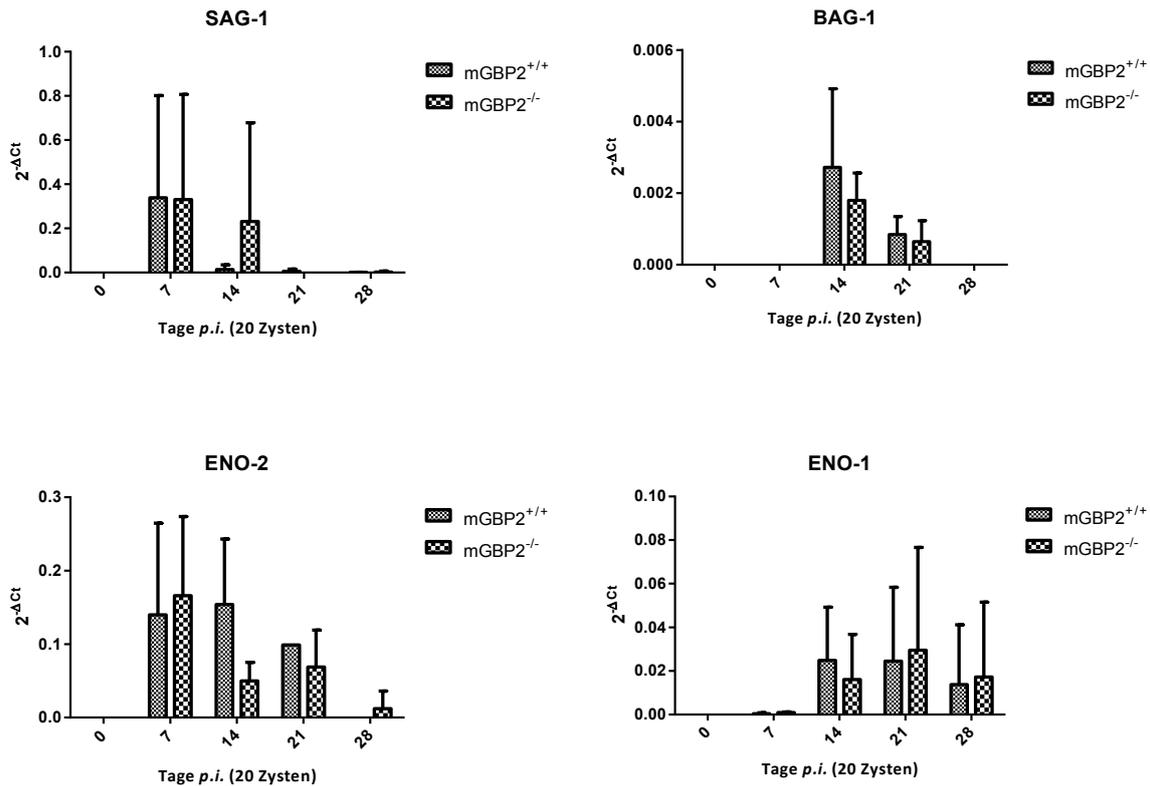
de das Gen Tg-Akt-1 ausgewählt. Es ist als *Toxoplasma* spezifisches Standardgen bekannt und wurde durch Dobrowolski et al. (1997) aus der Arbeitsgruppe Sibley beschrieben. Da es, ähnlich dem murinen  $\beta$ - Aktin, gleichbleibend exprimiert wird, ist es als Standard in der qPCR gut geeignet.

Zur Etablierung der qRT-PCR sollte zunächst *in vitro* nachgewiesen werden, dass es möglich ist, die Stadienkonversion anhand der Expression der genannten Gene mittels der qPCR zu beobachten. Hierzu wurden Tachyzoiten und Bradyzoiten in der Zellkultur angereichert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt ist, konnte gezeigt werden, dass die Stadienkonversion *in vitro* mit dem in dieser Arbeit etablierten qRT-PCR Primern gemessen werden kann. In Abwesenheit von SNP waren die für Bradyzoiten spezifischen Gene BAG-1 und ENO-1 kaum messbar. Die Tachyzoiten-spezifischen Gene SAG-1 und ENO-2 hingegen wurden in hohem Maße exprimiert. Durch eine Addition von 70 $\mu$ M SNP in das Zellkultur-Medium waren die Bradyzoiten- spezifischen Gene induziert. Da durch die Zugabe von SNP keine vollständige Stadienkonversion aller Parasiten zu erwarten war, wurde auch hier noch eine geringe Expression der Tachyzoiten-spezifischen Gene gemessen.



**Abbildung 3.4: Messung der Infektionslast in der Lunge von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren.** Versuchstieren nach einer Infektion mit 20 Zysten i.p. an Tag 7, 12, 21 und 28 p.i.. Die Anzahl der Kopien von Tg-B1 in 1 $\mu$ g DNA der Lungen der Versuchstiere lässt einen Rückschluss auf die Anzahl der vorhandenen Parasiten zu. Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus Tieren der CD1 Mauslinie isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform. Es wurden 1000 $\mu$ g DNA in 5 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O in der qRT-PCR pro Well eingesetzt. Es wurden jeweils 3 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

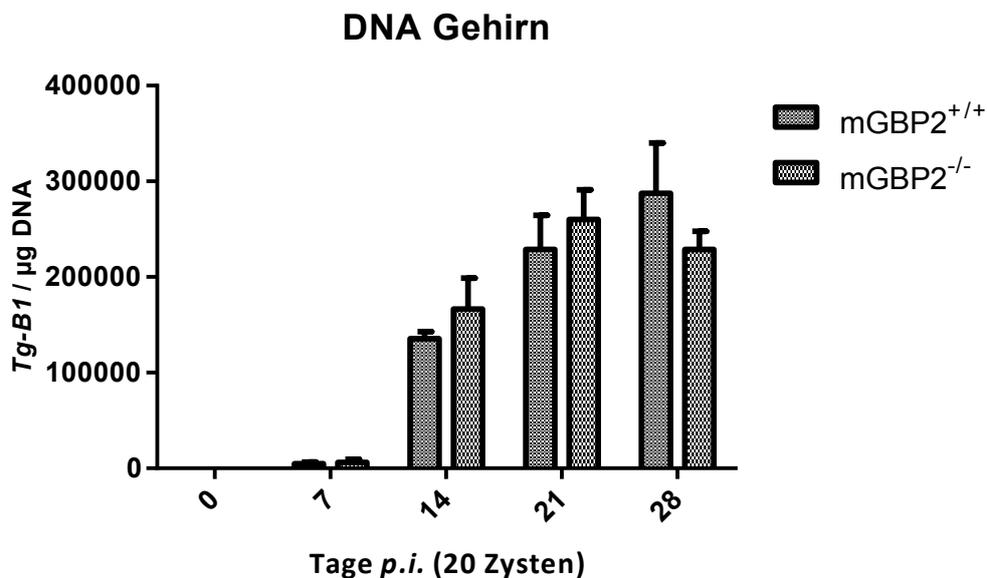
Da somit bestätigt wurde, dass die Stadienkonversion mit den ausgewählten stadienspezifischen Genen nachgewiesen werden kann, wurde dieses Verfahren in den *in vivo* Versuchen angewendet. Hierzu wurden, wie bei jeder neuen Infektion, Versuchstiere der Mauslinie CD-1, welche bereits mindestens 6 Wochen mit dem Parasiten infiziert waren, euthanasiert und die Gehirne frei präpariert. Nun wurden die Zysten, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, aus den Gehirnen isoliert und für die Infektion der Mauslinien C57BL/6, mGBP2<sup>+/+</sup>, mGBP2<sup>-/-</sup> und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mit jeweils 20 Zysten *T.gondii* ME49 i.p. vorbereitet. An den Tagen 7, 14, 21 und 28 p.i. wurden jeweils 3 Tiere aus der jeweiligen Mauslinie aus dem Versuch genommen und deren Organe präpariert. Es wurde hier lediglich das 20 Zysten Infektionsmodell betrachtet, da im 40 Zysten Infektionsmodell aufgrund der früh auftretenden Letalität keine Stadienkonversion zu erwarten ist. Zunächst wurde die Parasitenlast in der Lunge der Versuchstiere gemessen (Abb.3.4). Hierzu wurde die DNA isoliert und ein qPCR System verwendet, welches auch in der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Uniklinikum Düsseldorf genutzt wird. Bei dieser qPCR wird das Standardgen Tg-B1 von *T.gondii* ME49 gegen einen Plasmidstandard gemessen. Die Infektion der Lunge ist zu Beginn der systemischen Infektion am höchsten (7dpi.). Am Tag 14 p.i. fällt die Toxoplasmenlast bereits deutlich und ist am Tag 21 und 28 p.i. bereits auf ein Minimum gesunken. Um schließlich die Stadienkonversion zu ermitteln, wurde die RNA aus der Lunge und dem Gehirn isoliert und in cDNA umgeschrieben. Da die beiden Organe als die kritischsten in der akuten und chronischen Phase betrachtet wurden, wurden die Experimente hiermit durchgeführt.



**Abbildung 3.5: Messung der Stadienkonversion *in vivo* in der Lunge der Mauslinien mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren an den Versuchstagen 7, 14, 21 und 28 p.i.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus zuvor infizierten Tieren der CD1-Mauslinie isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern und Reverser Transkriptase durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Stadienkonversion der Parasiten in den Lungen der Versuchstiere ist in Abb. 3.5 dargestellt. An den Tagen 7 und 14, welche der akuten Phase der Infektion zugerechnet werden, zeigte sich ein deutlicher Nachweis der Tachyzoiten-spezifischen Gene. Im weiteren Verlauf der Infektion war die langsam beginnende Stadienkonversion zu beobachten. Am Tag 21 und vor allem am Tag 28 ist die Infektionslast, gemessen durch Bestimmung der Anzahl von *Toxoplasma* auf DNA-Ebene, in der Lunge auf ein Minimum gesunken. Von denjenigen Parasiten, die in der Lunge zu messen waren, konnten bereits hauptsächlich Bradyzoiten-spezifische Transkripte identifiziert werden. Vergleicht man nun den Status der Stadienkonversion so lässt sich erkennen, dass es in der mGBP2-defizienten Mauslinie eine deutliche Induktion der Stadienkonversion gibt. Das Immunsystem der Mauslinie scheint demnach potent genug zu sein, um diese beim Parasiten einzuleiten. Es ist ebenso erkennbar, dass die Stadienkonversion in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie in gleichem Maße induziert wird. Die Absenz von mGBP2 scheint demzufolge die Stadienkonversion nicht signifikant zu verändern.

Die Toxoplasmenlast im Gehirn zeigte sich am Tag 7 deutlich niedriger als die der Lunge (vgl. Abb. 3.4 und Abb.3.6). An Tag 14 p.i. wurde im Gehirn jedoch bereits eine höhere Infektionslast gemessen als in der Lunge. An den Tagen 21 und 28 p.i. stieg die Anzahl der im Gehirn befindlichen Parasiten weiterhin deutlich an, während in der Lunge die Toxoplasmenlast weiter sank.



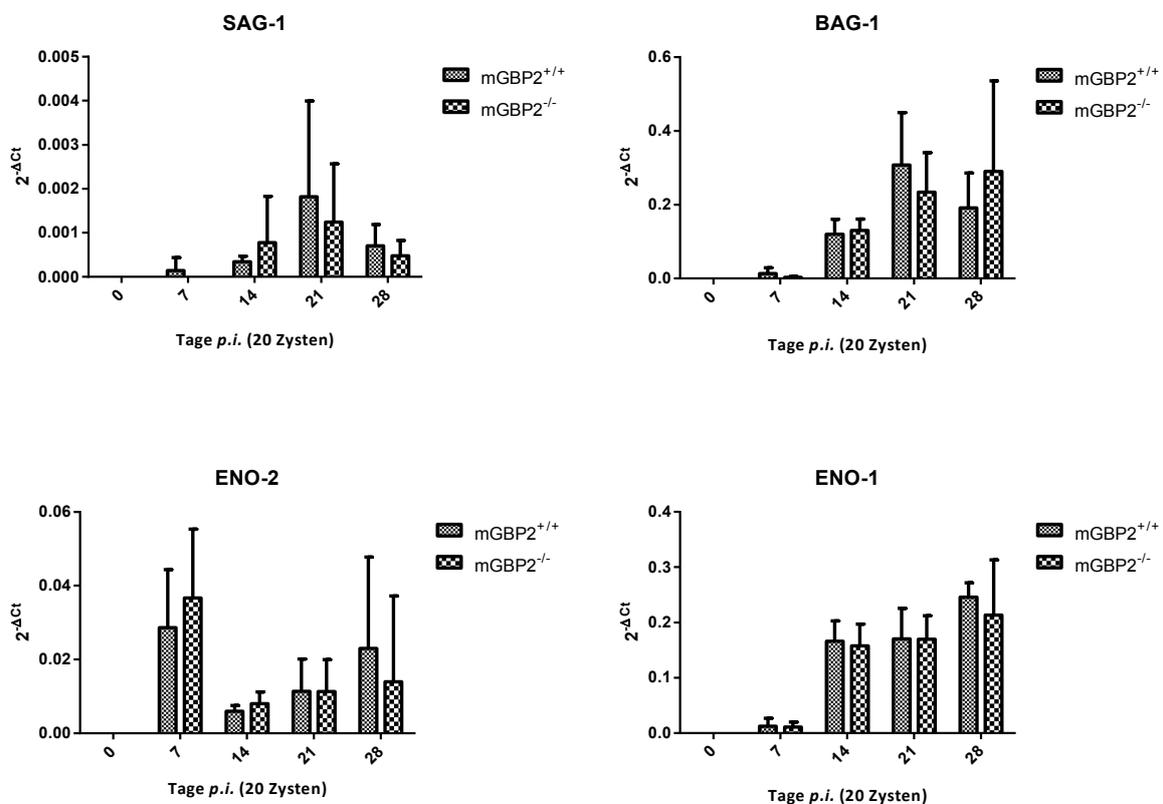
**Abbildung 3.6: Messung der Infektionslast im Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 20 Zysten i.p. an Tag 7, 12, 21 und 28 p.i.** Die Anzahl der Kopien von Tg-B1 in 1 µg DNA der Gehirne der Versuchstiere lässt einen Rückschluss auf die Anzahl der vorhandenen Parasiten zu. Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus zuvor infizierten Tieren der CD1- Mauslinie isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform. Es wurden 1000 µg DNA in 5 µl ddH<sub>2</sub>O in der qRT-PCR pro Well eingesetzt. Es wurden jeweils 3 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die RNA aus den Gehirnen wurde ebenfalls isoliert und mittels des qRT-PCR Systems gemessen. Auch im Gehirn wurden zu Beginn der Infektion hauptsächlich das Tachyzoiten-spezifische Gen ENO2 exprimiert, während das andere Tachyzoit-spezifische Gen SAG-1 und die Bradyzoiten-spezifischen Gene BAG-1 und ENO-1 deutlich geringer exprimiert wurden (Abb.3.7). Allerdings war der Level der Bradyzoiten-spezifischen Genexpression bereits höher als in der Lunge. An den Tagen 21 und 28 nach der Infektion zeigte sich dann ein deutlicher Anstieg der Bradyzoiten- Gene und eine deutliche Reduktion der Tachyzoiten-Gene. BAG-1 zeigte einen konstanten Anstieg, bis am Tag 28 p.i. das Maximum erreicht wurde. ENO-1 hingegen stieg am Tag 14 p.i. deutlich an und steigerte sich weiter, um dann zu stagnieren. SAG-1 zeigte zu Beginn der Infektion (7 Tage p.i.) nur marginale Werte und erreichte sein Maximum am Tag 21 der Infektion. Am Tag 28 p.i. ist der Wert wieder deutlich gesunken. Das andere Tachyzoiten-spezifische Gen, ENO-2, zeigte am Tag 7 p.i. eine sehr deutli-

che Induktion. Dieser Wert fiel dann allerdings am Tag 14 p.i. auf einen sehr geringen Wert ab und zeigte anschließend nur noch eine leicht steigende Tendenz.

Die Messergebnisse der Infektionslast und der Stadienkonversion deuten darauf hin, dass bei einer intraperitonealen Infektion zunächst die Lunge mit Toxoplasmen, die hauptsächlich eine für Tachyzoiten spezifische Genexpression aufwiesen, befallen wird. Im Verlauf der Infektion und der einsetzenden chronischen Phase wandern die Parasiten aus der Lunge ins Gehirn der Versuchstiere. Bei den das Gehirn befallenden Parasiten ist die Stadienkonversion bereits eingeleitet worden und die Bradyzoiten-spezifische Genexpression deutlich messbar (Abb. 3.7.)

Insgesamt zeigte sich hier, ähnlich wie in der Lunge, eine deutliche Induktion der Stadienkonversion. Das Immunsystem der mGBP2- defizienten Mauslinie scheint demnach auch im Gehirn in der Lage zu sein, den Parasiten effektiv zu bekämpfen. Eine vermehrte Invasion des Gehirns von mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren mit Toxoplasmen, die Tachyzoiten- spezifische Genexpression zeigen, war nicht zu beobachten.



**Abbildung 3.7: Messung der Stadienkonversion *in vivo* im Gehirn der Mauslinien mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> an den Versuchstagen 7, 14, 21 und 28 p.i.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus zuvor infizierten Tieren der CD1- Mauslinie isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in

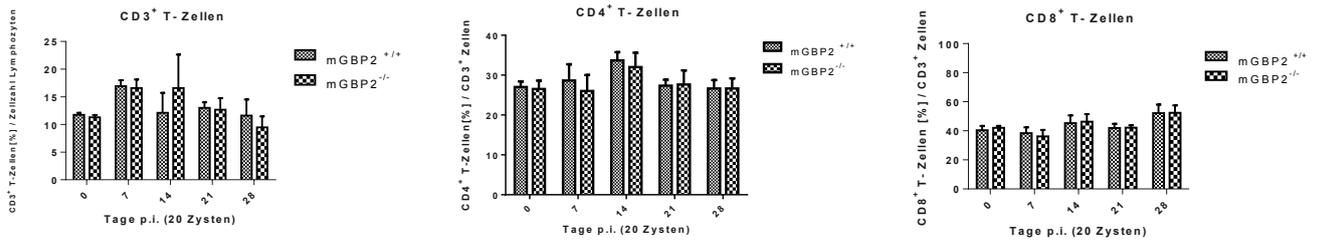
cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

### **3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE STUDIEN DER T-LYMPHOZYTÄREN IMMUNANTWORT BEI INFEKTION MIT *TOXOPLASMA GONDII* ME49**

Um neben den Untersuchungen des Infektionsverlaufs und der Infektionslast den Einfluss von mGBP2 auf die zelluläre Immunantwort zu analysieren, wurde die Frequenz der zytotoxischen T- Zellen der Mauslinien mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> mittels Durchflusszytometrie miteinander verglichen.

#### **3.3.1 BESTIMMUNG DER GESAMTZELLZAHL DER T- ZELL IMMUNANTWORT**

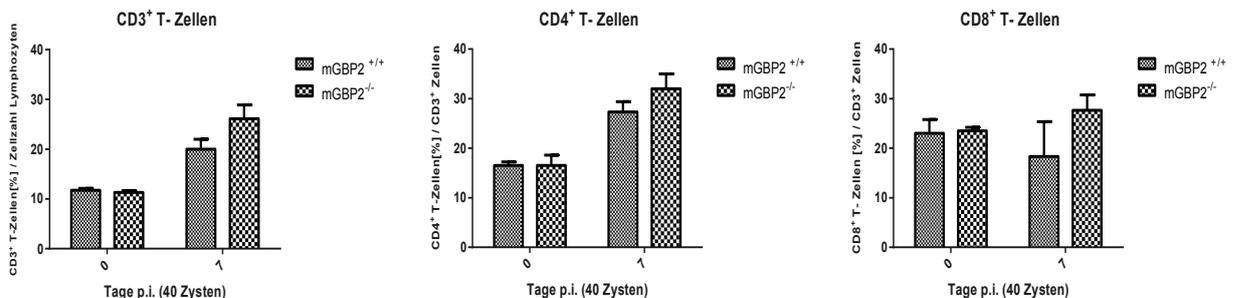
Um zunächst einen Überblick über die Gesamtzellzahl der T- Lymphozyten bei den Mauslinien mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> zu erhalten, wurde diese bei einer *T.gondii* ME49 Infektion mit 20 und 40 Zysten analysiert. Hierzu wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie gewählt. Die Tiere wurden mit 20 bzw. 40 Zysten i.p. infiziert und an den Versuchstagen 7, 14, 21 und 28 euthanasiert. Nach Entnahme der Milz wurden die Zellen vereinzelt und mit anti CD3-, CD4- und CD8 - Antikörpern gefärbt, um die Zellpopulationen im Anschluss im Durchflusszytometer separieren zu können. Zusätzlich wurde - um tote Zellen differenzieren zu können - mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 3.8: Zellzahlen der lebenden T-Zellen in der naiven Maus und in der mit 20 Zysten *T.gondii* ME49 infizierten Maus [%].** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden 3 Mäuse jeweils verwendet.

Es zeigte sich, dass in den Milzen der naiven Mäuse nur sehr geringe Mengen CD3<sup>+</sup> T-Zellen messbar waren (Abb.3.8). Am Tag 7 und 14 nach der Infektion mit 20 Zysten waren die Zahlen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich angestiegen. Die prozentuale Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschied sich jedoch innerhalb des Versuchszeitraums kaum zwischen den beiden Mauslinien. Geht die Infektion in die chronische Phase über, welches im Zeitraum um den Tag 14 geschieht, so reduzierten sich gleichzeitig der prozentuale Anteil der T-Zellen an der Anzahl Lymphozyten. Die Abwesenheit von mGBP2 zeigte hier somit keinen Einfluss auf die T-Zell Antwort, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien beobachtet werden konnten.

Im 40 Zysten Infektionsmodell konnte nur der 7. Tag p.i. ausgewertet werden, da die Versuchstiere der mGBP2<sup>-/-</sup>Mauslinie ab Tag 8 eine sehr hohe Mortalitätsrate aufwiesen. Am Tag 7 p.i. zeigten die Mauslinien vergleichbare Werte der T-Lymphozyten zu der 20 Zysten Infektion (Abb. 3.9). Dies deutet darauf hin, dass die Induktion der CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie nicht wesentlich beeinträchtigt ist und somit nicht der Grund für die hohe Mortalität der Tiere sein kann.



**Abbildung 3.9: Zellzahl der lebenden T-Zellen in den naiven und mit 40 Zysten *T.gondii* ME49 infizierten mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup>Mäuse [%].** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus zuvor infizierten Tieren der CD1- Mauslinie isolierten 20

Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden jeweils 3 Mäuse verwendet.

## 3.3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR *TOXOPLASMA GONDII* ME49 SPEZIFISCHEN T- ZELL ANTWORT

Nach der Analyse der reinen Anzahl der T- Lymphozyten wurde die *T.gondii*- spezifische T- Zell- Frequenz und Funktionalität, wie Zytokininduktion, in mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen bei einer Infektion mit 20 bzw. 40 Zysten von *T.gondii* ME49 untersucht.

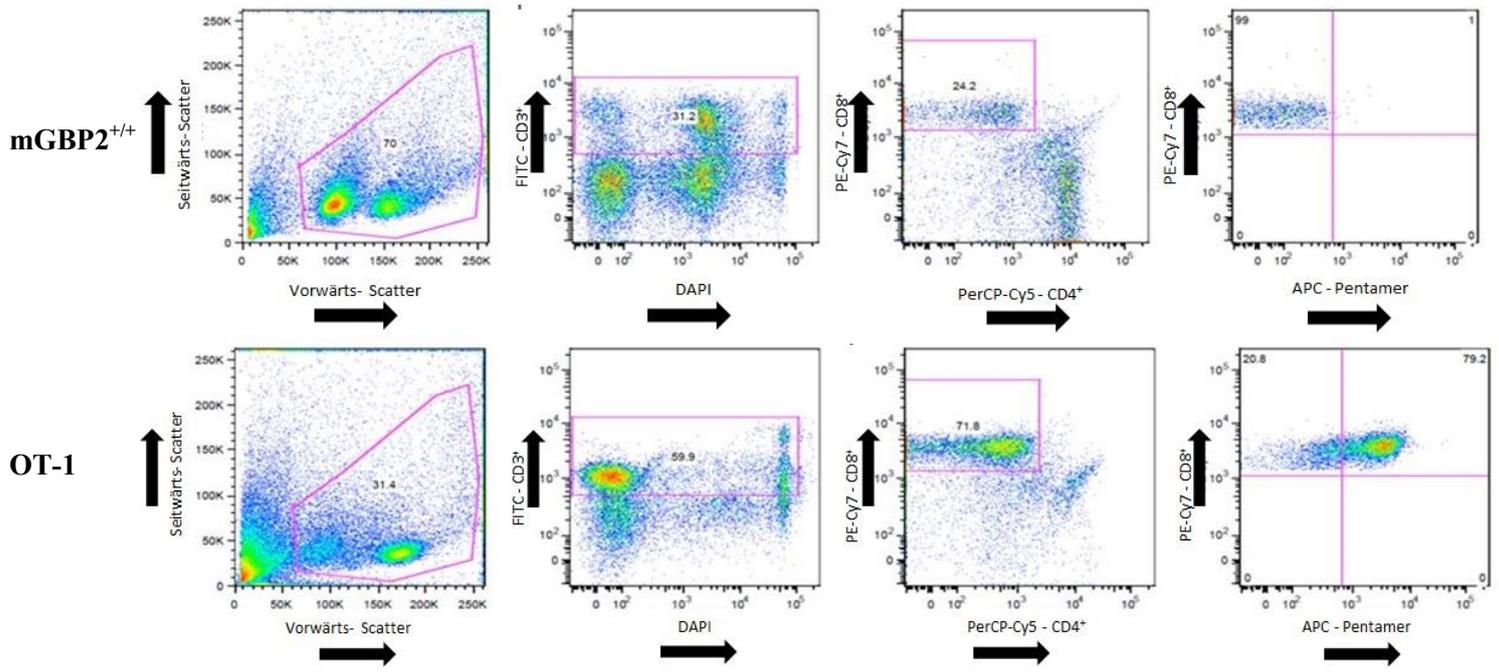
### 3.3.2.1 Nachweis der *T.gondii* ME49 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort in den Mauslinien C57BL/6, mGBP2<sup>-/-</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> im 20 Zysten Infektionsmodell

Um die *T.gondii*- spezifische CD8<sup>+</sup> T- Zell- Frequenz zu analysieren, wurden Tiere mit 20 Zysten i.p. infiziert und an den Tagen 7, 14, 21 und 28 euthanasiert. Auch hier wurde die Milz entnommen, die Zellen vereinzelt und schließlich mit den Antikörpern für anti CD3, CD4, CD8 und DAPI gefärbt, zur späteren Differenzierung im Durchflusszytometer.

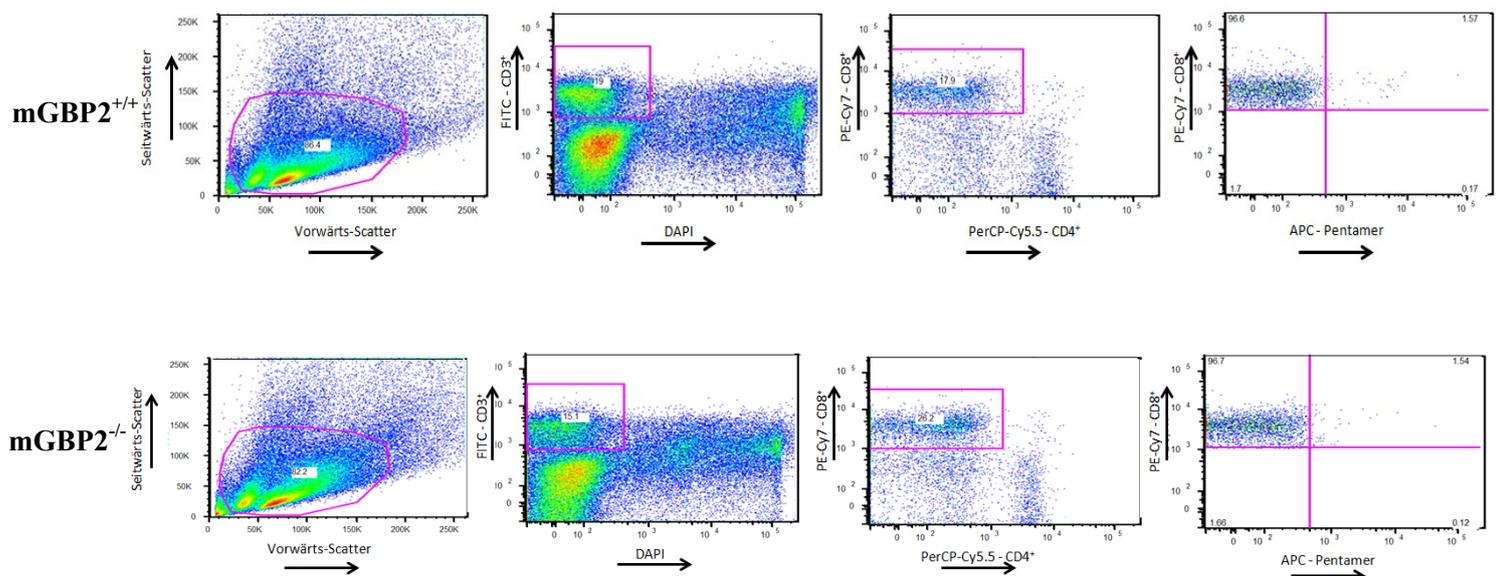
Zusätzlich wurden die Zellen mit einem MHC-I-Pentamer gefärbt. Dieses Pentamer erlaubt es mit Hilfe des Zytometers die *T.gondii*- spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von anderen CD8<sup>+</sup> T- Zellen zu unterscheiden. Dies wird durch das *T.gondii* spezifische Epitop/Antigen SVLAFRRLL ermöglicht. Der CD8<sup>+</sup> T- Zell Rezeptor von *T. gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen erkennt den passenden MHC I Komplex (hier:H-2Kb) und das präsentierte Antigen und bindet nach dem Schlüssel- Schloss- Prinzip an diesen. Da ein Pentamer durch eine „Coiled coil“ Domäne räumlich angeordnet ist, können bis zu 5 dieser MHC I- Epitop Strukturen an eine Zelle bzw. 5 T- Zell Rezeptoren binden. So entsteht eine Bindung zwischen Zelle und Pentamer, die dann im Durchflusszytometer zur Differenzierung der CD8<sup>+</sup>- T- Zellpopulation genutzt wurde. Um die spätere Gating Strategie zu testen und herauszufinden, welche Fluoreszenzen am besten zu der geplanten Messung passen, wurde in einem Vorversuch und als Positivkontrolle eine mGBP2<sup>+/+</sup> und eine OT-1 Maus euthanasiert. Die OT-1 Maus aus Sicht des Immunologen den Vorteil, dass sie ausschließlich CD8<sup>+</sup> T Zellen besitzt, welche ein Peptid des

Ovalbumins (Epitop: SIINFEKL), einem großen Bestandteil des Hühnereis, erkennen. Daher ließ sich an diesem Modell gut die später verwendete Gating Strategie etablieren (Abb. 3.10).

## A.



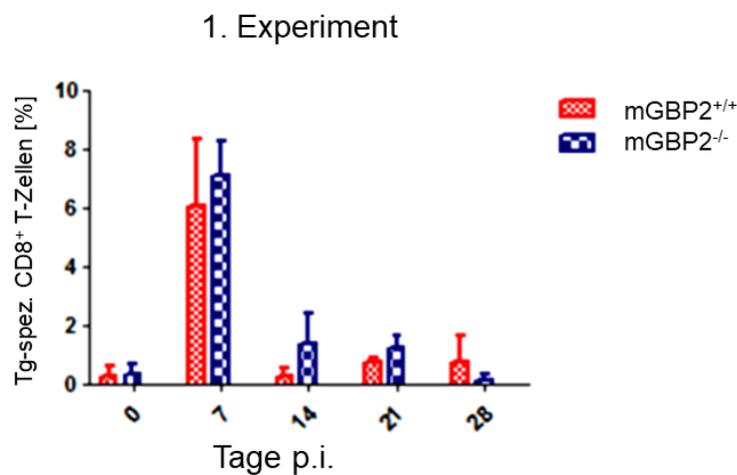
## B.

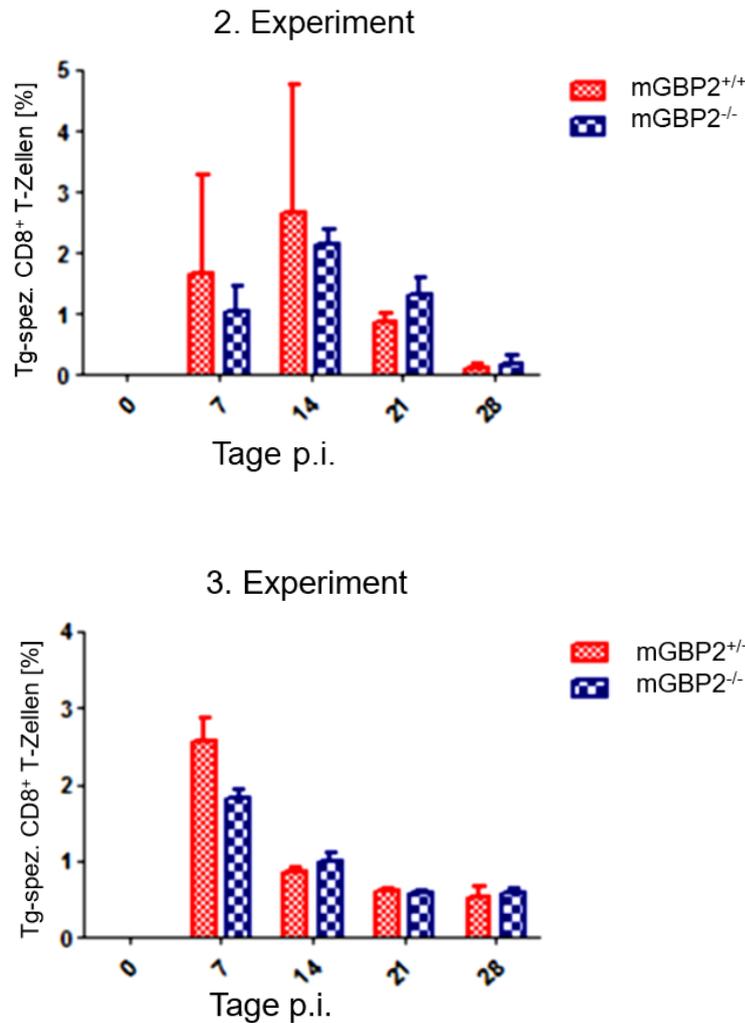


**Abbildung 3.10: Gatingstrategie der Durchflusszytometrischen Analysen [A.;B.].** Zunächst wurden der Vorwärts (FSC-A)- und Seitwärts (SSC-A)- Scatter gegeneinander aufgestellt und die Lymphozyten markiert. Nun wurden die mit FITC markierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen gegen die DAPI positiven (Pacific- Blue), toten Zellen aufgetragen und die CD3<sup>+</sup> T-Zellen gated. Die CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden dann in CD4<sup>+</sup> positive (PerCp-Cy5) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (PE-Cy7) aufgesplittet. Nun wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen markiert und im letzten Schritt aufgeteilt in Pentamer- positive (PE-Cy7<sup>-</sup>- APC<sup>+</sup>) und Pentamer- negative (PE-Cy7<sup>+</sup>- APC<sup>-</sup>). Hierzu wurden in Abbildung A ein MHC I Pentamer verwendet, welches mit SIINFEKL als Peptid beladen ist und APC als Fluorophor verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die

Färbung mit diesem Pentamer sehr effektiv ist und nur sehr wenige falsch positive Zellen gemessen werden. In Abbildung B ist beispielhaft die Gatingstrategie der Analyse der *T.gondii*-spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell-Frequenz dargestellt. Hier wurde ein MHC I Pentamer verwendet, welches SVLAFRRL als Peptid trägt und mit APC als Fluorophor konjugiert ist.

Es zeigte sich, dass in der OT-1 Maus durch Anfärben mit einem Pentamer mit SIINFEKL als Peptid und APC als Fluorophor 79% der T-Zellen markiert waren (Abb.3.10). Wie hier beispielhaft dargestellt, wurde dann das Gating des eigentlichen Versuchs mit den Versuchstieren wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde DAPI gegen CD3 aufgetragen. Die CD3<sup>+</sup> Population wurde dann in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen gesplittet. Nach Auswahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die SVLAFRRL-bindenden und damit *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von den restlichen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aussortiert und vom Durchflusszytometer gezählt (siehe Kapitel 2.3.10). An Tag 7 und 14 p.i. konnten die höchsten Zahlen *T.gondii*- positiver CD8<sup>+</sup> T- Zellen gemessen werden (Abb. 3.11). An den weiteren Versuchstagen fiel diese Zahl sukzessive ab. Es konnte eine *Toxoplasma*- spezifische CD8<sup>+</sup> -T Zell Antwort in der mGBP2 defizienten Mauslinie nachgewiesen werden, die keine signifikanten Unterschiede zu der Mauslinie, die mGBP2 exprimiert, aufweist. Die Präsentation der Antigene über den MHC-I- Signalweg ist demnach im Infektionsversuch mit 20 Zysten von *T.gondii* ME49 nicht durch mGBP2 beeinflusst.



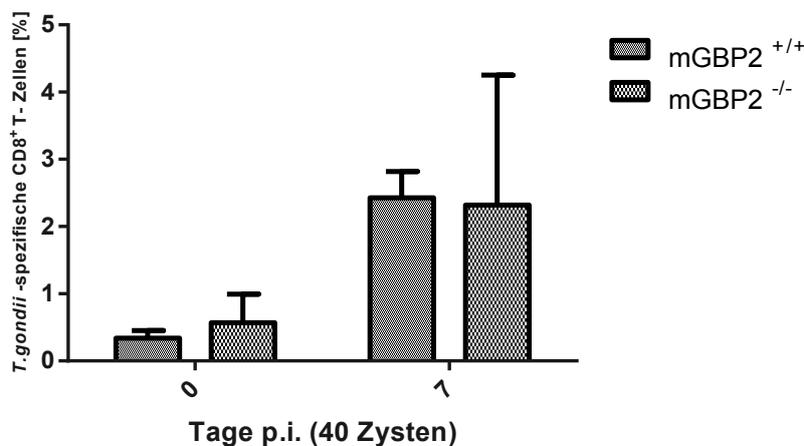


**Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Analyse der *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen in % der Gesamt- CD8<sup>+</sup> T- Zellen in mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2 defizienter Mauslinie im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag, aus zuvor infizierten Tieren der CD1-Mauslinie, isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Es wurden Antikörper für CD3, CD4, CD8 T- Zellen und das *T.gondii* spezifische Pentamer mit dem Epitop SVLAFRRRL verwendet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden jeweils 3 Mäuse verwendet.

### 3.3.2.2 Nachweis der *T.gondii* ME49 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort in den Mauslinien C57BL/6 und mGBP2<sup>-/-</sup> im 40 Zysten Infektionsmodell

Da die Untersuchungen des 20 Zysten Infektionsmodells keine signifikanten Unterschiede in der T-Zell Antwort zwischen den mGBP2<sup>+/+</sup> und den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen erkennen ließen, es jedoch einen Unterschied in der Letalitätskurve zwischen dem 20 und dem 40 Zysten Infektionsmodell gab, wurde untersucht, ob sich die Zahlen der *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell-Frequenz hier unterscheiden. Aufgrund der erhöhten Letalität ab Tag 8 der mGBP2<sup>-/-</sup> Mausli-

nie konnte hier lediglich die Situation am Tag 7 p.i. analysiert werden. Die mGBP2- defizienten Versuchstiere zeigten eine leicht höhere Anzahl der spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Somit scheint auch bei der Infektion mit 40 Zysten die Antigenpräsentation über den MHC-I- Signalweg und die T- Zelldifferenzierung, sowie deren Aktivierung nicht durch mGBP2 beeinflusst zu werden. Die erhöhte Mortalitätsrate muss demnach eine andere Ursache haben. Darüber hinaus lässt dies den Schluss zu, dass die Immunantwort mittels der CD8<sup>+</sup> T- Zellen nicht abhängig von der Infektionsdosis ist.

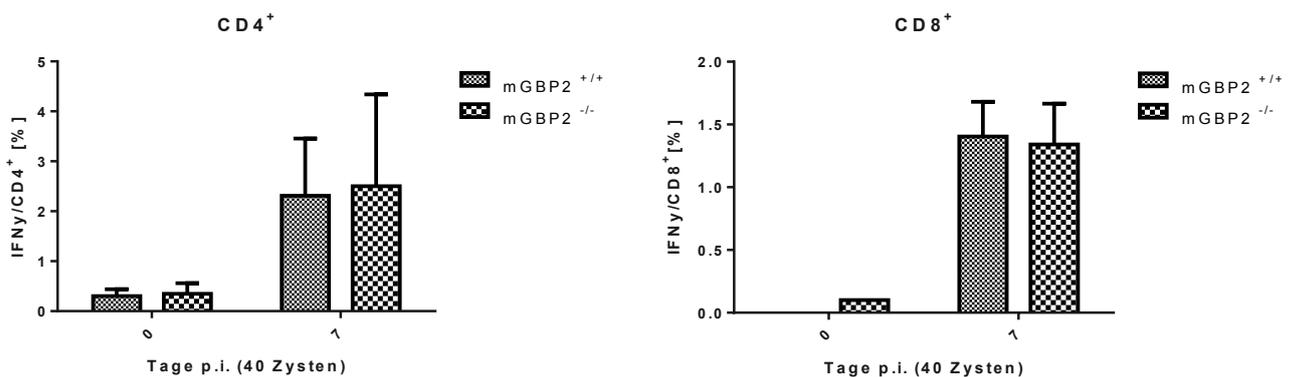


**Abbildung 3.12: Durchflusszytometrische Analyse der *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen in % der gesamten CD8<sup>+</sup> T- Zellen in der mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2- defizienten Mauslinie im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag, aus zuvor infizierten Tieren der CD1-Mauslinie, isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Es wurden Antikörper für CD3, CD4, CD8 T- Zellen und das *Toxoplasma* spezifische Pentamer mit dem Epitop SVLAFRRL verwendet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden jeweils 3 Mäuse verwendet.

### 3.3.2.3 Nachweis der Funktionalität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinien durch intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)

In den bisher gezeigten Versuchen wurde die Anzahl der der *T.gondii*- spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen und der CD4<sup>+</sup> T- Zellen gemessen und eine deutliche Induktion der Immunantwort ohne signifikante Unterschiede zwischen der mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie festgestellt. Im folgenden Schritt sollte schließlich die Funktionalität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen durch die Messung der IFN $\gamma$  Produktion bestimmt werden. Hierzu wurden T- Zellen infizierter Tiere (40 Zysten, 7 d.p.i.) mit *Toxoplasma* -Lysat restimuliert und anschließend mit einem

Sekretionshemmer (Brefeldin A; Kapitel 2.3.12.) für 5h inkubiert. Hierdurch sollte das von den Zellen produzierte IFN $\gamma$  angereichert werden, sodass es im Durchflusszytometer messbar wird. Beide Mauslinien zeigten eine deutliche und vergleichbare Anzahl an IFN $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen am Tag 7 nach der Infektion (Abb. 3.13). Dies deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von mGBP2 im Organismus zu keiner signifikanten Veränderung der Funktionalität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen bei einer Infektion mit 40 Zysten von *T.gondii* ME49 führt.



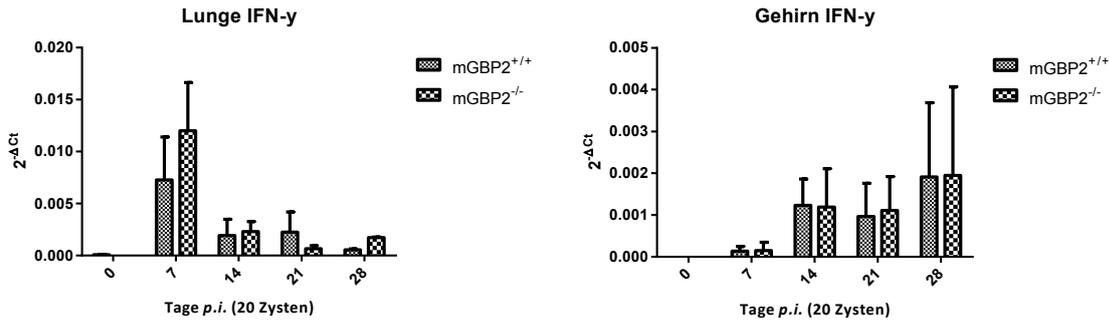
**Abbildung 3.13: Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) auf IFN $\gamma$  in CD4<sup>+</sup>-und CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten [%].** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag, aus zuvor infizierten Tieren der CD1-Mauslinie, isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt, mit *Toxoplasma*- Lysat restimuliert und anschließend für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Es wurden Antikörper gegen CD3, CD4, CD8 T- Zellen sowie für IFN $\gamma$  verwendet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden jeweils 3 Mäuse verwendet.

### 3.4 EXTENSIVE ANALYSE DER PRO- SOWIE ANTI-INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINE UND EFFEKTOR-MOLEKÜLE

Die Analyse der Immunantwort gegen den intrazellulären Parasiten *T. gondii* in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie wurde, neben den Untersuchungen zur zellulären Immunantwort, durch Untersuchungen der Aktivierung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Effektormolekülen im Verlaufe der Infektion, ergänzt.

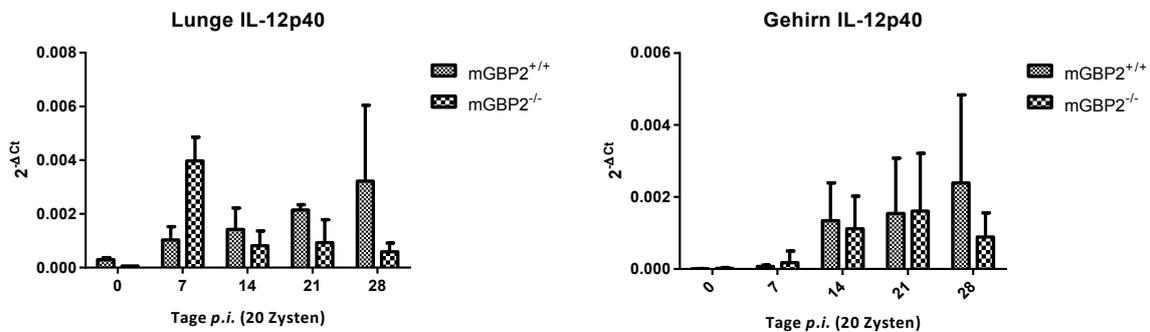
### 3.4.1 UNTERSUCHUNGEN DER GENEXPRESSION UND PROTEINBIOCHEMISCHE ANALYSE DER INFektion MIT 20 Zysten *T.GONDII* ME49

Die Genexpression der verschiedenen Zytokine, die bei der Infektion mit intrazellulären Parasiten am stärksten exprimiert werden, wurde mit RNA aus dem Gehirn und der Lunge ermittelt. Dazu wurde die RNA aus den jeweiligen Organen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer und Sonden in einer Taq-Man RT-PCR die Genexpression gemessen. Naive Mäuse beider Mauslinien zeigten eine sehr geringe Expression von IFN $\gamma$  in Gehirn und Lunge (Abb.3.14; Tag 0). Am Tag 7 nach einer Infektion mit 20 Zysten kam es in den Lungen der Versuchstiere beider Mausstämme zu einem deutlichen Anstieg von IFN $\gamma$ , wobei bei den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen ein stärkerer Anstieg zu verzeichnen war. An den Versuchstagen 14 und 21 war wiederum ein deutlicher Abfall der IFN $\gamma$  Genexpression mit nur marginalen Unterschieden zwischen den beiden Mauslinien zu beobachten. Am Tag 28 sank dieser Wert auf ein Minimum, welches jedoch noch höher als das bei nicht infizierten Mäusen ausfiel. Im Gehirn der Versuchstiere ist der Verlauf anders als in der Lunge. Hier war die Genexpression von IFN $\gamma$  am Tag 0 unterhalb des Detektionslimits, während am Tag 7 nach der Infektion nur ein sehr geringer Anstieg in beiden Mauslinien zu beobachten war (Abb.3.14). An den Versuchstagen 14 und 21 stieg dieser Wert weiter an, am Tag 28 wurde schließlich das Maximum erreicht. Ein Unterschied zwischen der mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie konnte nicht gemessen werden. Die IFN $\gamma$  Genexpression nach einer Infektion mit 20 Zysten *T.gondii* ME49 war also in Abwesenheit von mGBP2 in der Lunge nur leicht und im Gehirn nicht verändert. Die Ergebnisse der Messung der IFN $\gamma$  Expression folgen darüber hinaus dem organ-spezifischen Infektionsverlauf. Es bestätigte sich, dass die Lunge zuerst akut infiziert war. Im weiteren Verlauf fällt dann die IFN $\gamma$  Expression in der Lunge ab. Im Gehirn hingegen stieg die Expression des Zytokins erst deutlich am Tag 14. Zudem war zu beobachten, dass die IFN $\gamma$  Expression im Gehirn beider Mauslinien im Vergleich zur Lunge insgesamt geringer ausfiel.



**Abbildung 3.14: Genexpression von  $IFN\gamma$  in Lunge und Gehirn von  $mGBP2^{+/+}$  und  $mGBP2^{-/-}$  defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei  $-80^{\circ}C$  gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils  $3\mu g$  RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden  $5\mu l$  in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Bei dem im Anschluss gemessenen Zytokin IL-12 (Abb. 3.15) handelt es sich, wie auch bei  $IFN\gamma$ , um eines der zentralen Zytokine in der Immunreaktion (Scharton-Kersten et al., 1996). Es verstärkt die Bildung von  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$ , und fördert die Aktivität von NK und  $CD8^{+}$  T-Zellen (Combe et al., 2005; Wilson et al., 2008). Ein Defekt in der Bildung bzw. in der Verfügbarkeit von IL-12 hätte für den Organismus zur Folge, dass die Immunantwort insgesamt wesentlich reduziert ist (Lieberman et al., 2004; Scharton-Kersten et al., 1996).

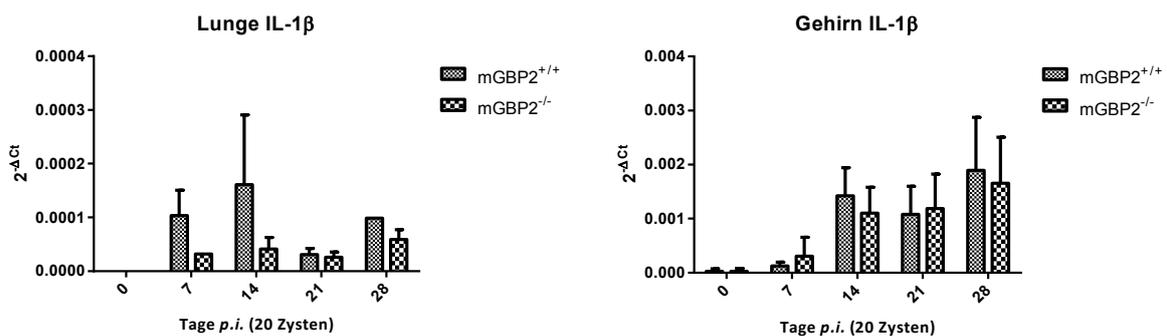


**Abbildung 3.15: Genexpression von IL-12p40 in Lunge und Gehirn von  $mGBP2^{+/+}$  und  $mGBP2^{-/-}$  defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei  $-80^{\circ}C$  gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils  $3\mu g$  RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden  $5\mu l$  in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Untereinheit IL-12p40 des aktiven IL-12 lässt Rückschlüsse auf die Gesamtmenge von IL-12 zu, da das Zytokin lediglich als Heterodimer, bestehend aus IL-12p40 und IL-12p35, oder als Homodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten IL-12p40, wirksam ist (Jalah et al., 2013; Jana und Pahan, 2009). Die Genexpression von IL-12p40 zeigte in den  $mGBP2^{+/+}$  Mäu-

sen einen konstanten Anstieg im Verlauf der Infektion, während sie in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 7 nach der Infektion ein deutliches Maximum erreichte um dann wieder abzufallen (Abb. 3.15). Die Expression zwischen den beiden Mauslinien war also gegenläufig: während in den mGBP2- defizienten Mäusen ein sehr früher Anstieg bereits nach 7 Tagen zu verzeichnen war, wurde ein solches Maximum bei den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen erst nach 28 Tagen erzielt. Die Genexpression im Gehirn zeigte dagegen mit einem stetigen Anstieg bis zu Tag 21 einen vergleichbaren Verlauf (Abb.3.15). An Tag 28 kam es jedoch bei den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen zu einem Abfall der Zytokinexpression, während diese in den mGBP2- defizienten Mäusen weiter anstieg. Insgesamt war auch in diesem Organ eine deutliche Induktion von IL-12p40 nachweisbar, es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Genexpression von IL-12p40 durch die Abwesenheit von mGBP2 in der Lunge leicht und im Gehirn der Versuchstiere kaum verändert war.

Ein weiteres wichtiges entzündungsförderndes Zytokin ist IL-1 $\beta$ . Es wird unter anderem von aktivierten Makrophagen sezerniert (Beuscher et al., 1990; Lopez-Castejon und Brough, 2011) und besitzt vielfältige Aufgaben, wie die Induktion von IL-6, welches wiederum zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und zur Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Apoptose führen kann (Janeway, 2009)(Hunter et al., 1995). Die Analyse der Genexpression dieses Gens in der Lunge und im Gehirn der Versuchstiere hilft, den Status der Entzündungsreaktion zu veranschaulichen (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16: Genexpression von IL-1 $\beta$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2 defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 $\mu$ g RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

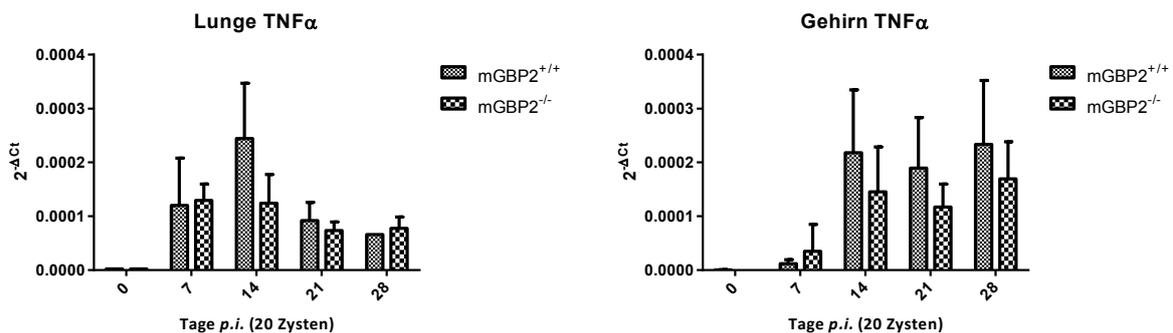
In der Lunge zeigt sich an den Versuchstagen 7 und 14 p.i. ein erhöhter Wert als an Tag 0 für IL-1 $\beta$  in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie. Aber auch die mGBP2- defiziente Mauslinie zeigt eine

deutliche, wenn auch geringere Induktion von IL-1 $\beta$ , sodass kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. An den Tagen 21 und 28 p.i. waren die Werte in beiden Mauslinien nahezu identisch. Die mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie zeigte eine IL-1 $\beta$  Induktion in der Lunge auf, diese fiel aber etwas geringer als im mGBP2<sup>+/+</sup> aus.

Im Gehirn der Versuchstiere war die Expression am Tag 7 p.i. sehr gering. Am Tag 14 stieg der Wert deutlich an und stagnierte bis Tag 28. Hier war der höchste Wert nachweisbar. Beide Mauslinien wiesen hierbei einen nahezu gleichen Verlauf auf. Somit konnte nachgewiesen werden, dass es im Gehirn der mGBP2 defizienten Mauslinie zu einer effektiven und mit mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbaren Induktion von IL-1 $\beta$  kommt.

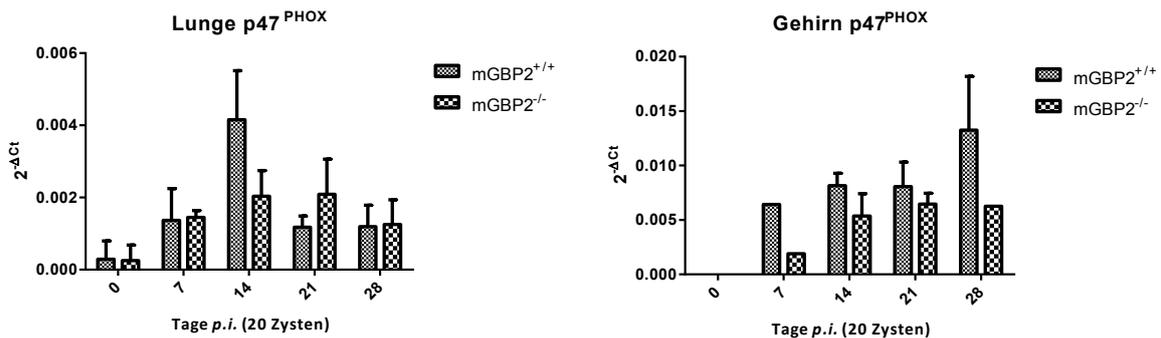
Ein weiterer von Makrophagen sezernierter Botenstoff ist der Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  (Gazzinelli et al., 1996)(Janeway, 2009). Die Analyse der Genexpression dieses Entzündungsmarkers zeigte eine deutliche Induktion des Gens an den Tagen 7 und 14 in der Lunge beider Mauslinien (Abb.3.17). An den Tagen 21 und 28 p.i. fiel der Wert ab und stagnierte.

Im Gehirn der Versuchstiere war hingegen die Induktion von TNF- $\alpha$  am Tag 7 nur minimal zu beobachten. Am Tag 14 stieg die Expression jedoch deutlich an und blieb, bis einschließlich Tag 28 p.i, konstant hoch. Insgesamt war die Genexpression von TNF- $\alpha$  in den Gehirnen der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse etwas geringer als in denen der mGBP2<sup>+/+</sup> Mäuse. In beiden Organen der mGBP2 defizienten Mauslinie konnte also eine normale TNF- $\alpha$  Induktion nachgewiesen werden. Die Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Die mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie hat demnach kein Defizit in der Genexpression von TNF- $\alpha$ .



**Abbildung 3.17: Genexpression von TNF- $\alpha$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 $\mu$ g RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Um zu untersuchen, ob es im Verlaufe der Signalkaskade von TNF- $\alpha$  zu Veränderungen in der Genexpression kommt und darüber hinaus zu analysieren ob es im Signalweg der NADPH- Oxidase, wodurch ROS entstehen können, wurde die Transkription der NADPH- Oxidase- Untereinheit p47<sup>phox</sup>, betrachtet (Abb. 3.18). Es zeigte sich, dass das Transkript dieses Proteins in der Lunge der mGBP2- defizienten Mauslinie deutlich exprimiert wurde. Die höchste Expression wurde an den Tagen 14 und 21 p.i. gemessen. Die Werte im Gehirn verzeichneten einen kontinuierlichen Anstieg bis Tag 21 und stagnierten dann am Tag 28.



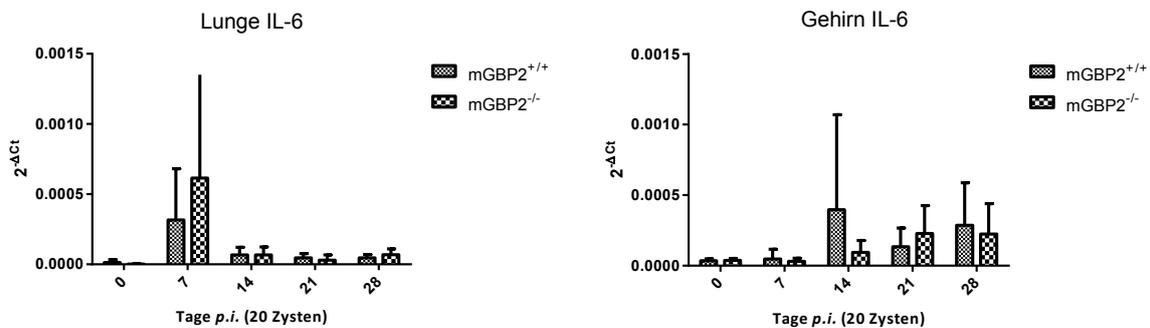
**Abbildung 3.18: Genexpression von p47<sup>phox</sup> in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die mGBP2<sup>+/+</sup> Mäuse zeigten eine ähnliche p47<sup>phox</sup> Genexpression (Abb.3.18). An allen Versuchstagen war die Expression im Gehirn leicht höher. In der Lunge war am Tag 14 ein merklich höherer Wert messbar. Diese Unterschiede stellten sich jedoch als statistisch insignifikant heraus. Es kann also resümiert werden, dass die Genexpression von p47<sup>phox</sup>, dessen Genprodukt die Aktivität der NADPH- Oxidase reguliert durch die Abwesenheit von mGBP2 nicht verändert war.

Das im Folgenden analysierte Zytokin IL-6 wird hauptsächlich von Makrophagen und DCs produziert (Nagineni et al., 2000). Es fördert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und führt unter anderem zur Rekrutierung von Granulozyten (Janeway, 2009). Es wird zu den entzündungsfördernden Interleukinen gezählt. Die Genexpression von IL-6 ist am Tag 7 p.i. in der Lunge beider Mauslinien sehr hoch (Abb.3.19). An den Versuchstagen 14 bis 28 hingegen fallen die Werte auf ein sehr niedriges Niveau.

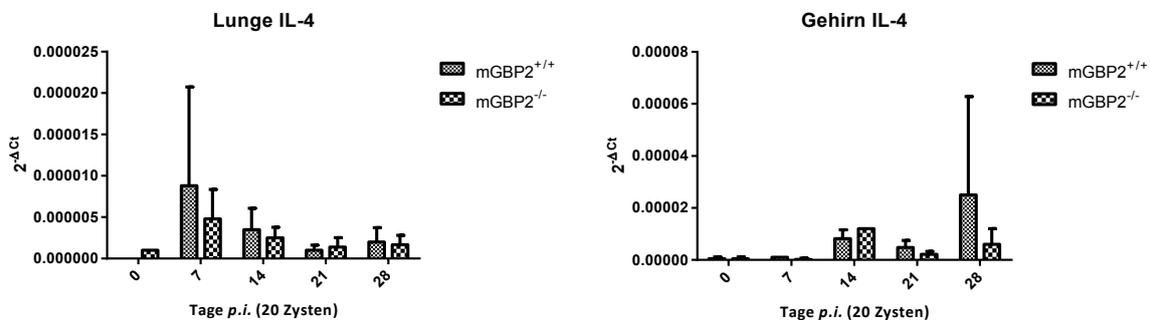
Im Gehirn beider Mauslinien ist die Induktion von IL-6 am Tag 7 p.i., im Vergleich zur Situation in den naiven Mäusen, nur geringfügig angestiegen. Von Tag 14 bis 28 p.i. war die Ex-

pression von IL-6 in beiden Mauslinien erhöht. Folglich war in der Lunge und dem Gehirn der mGBP2- defizienten Mauslinie eine mit mGBP2<sup>+/+</sup> vergleichbare Induktion von IL-6 messbar. Des Weiteren kann man schließen, dass die Produktion von IL-6 weitestgehend auf die unmittelbar akute Phase der Infektion fällt, da am Tag 14, wenn die chronische Phase bereits beginnt, die Induktion nur noch in sehr geringem Maße nachweisbar war.



**Abbildung 3.19: Genexpression von IL-6 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Analyse der Genexpression von IL- 4 erlaubte einen weiteren Einblick in den Status der Immunantwort der mGBP2 defizienten Mauslinie. Die Sezernierung des Zytokins führt unter anderem zur Differenzierung von naiven T-Zellen in T<sub>H</sub>2-Zellen, eine Untergruppe der T<sub>H</sub>-Zellen und zur Differenzierung von B- Zellen in Plasmazellen (Kopf et al., 1993; Nelms et al., 1999). Außerdem führt IL- 4 in B- Zellen zu einem Isotypenwechsel von IgM zu IgG und IgE (Kuhn et al., 1991; Morawetz et al., 1996; Muller et al., 1991).



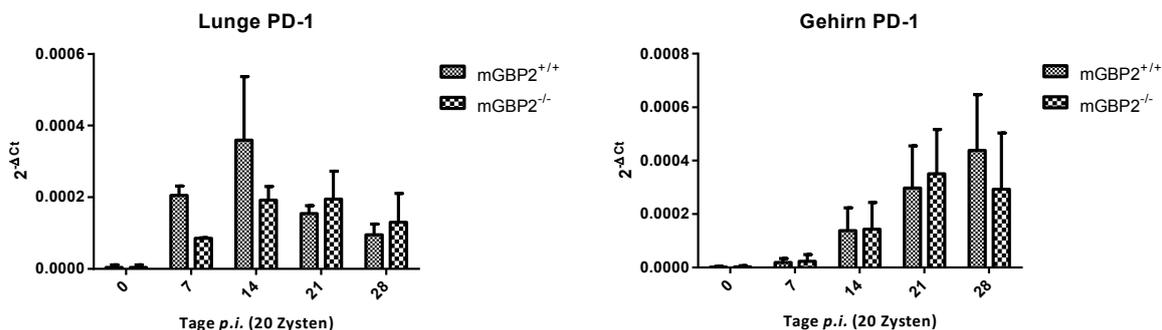
**Abbildung 3.20: Genexpression von IL- 4 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von

Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Zu Beginn der Infektion (7 dpi.) wurde IL-4 in den Lungen der Versuchstiere hochreguliert (Abb.3.20). An den Tagen 14 bis 28 stagnierte die Expression dann auf einem geringeren Niveau.

Im Gehirn der Versuchstiere war am Tag 7 p.i. kaum eine IL-4 Genexpression messbar. Am Tag 14 zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression, welche bis Tag 28 p.i. etwa auf dem gleichen Niveau blieb. Auch bei diesem Zytokin ließ sich in der mGBP2- defizienten Mauslinie eine Genexpression ähnlich zu der im mGBP2<sup>+/+</sup> in beiden Organen nachweisen.

Im weiteren Verlauf wurde die Genexpression des *programmed cell death protein- 1* (PD-1) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor, der auf T- und B- Zellen exprimiert werden kann. Er hemmt die Aktivierung von Zellen oder kann zu ihrer Apoptose führen. Daher wird dieser Rezeptor eher zu den immun-inhibitorischen bzw. regulatorischen Proteinen gezählt (Bhadra et al., 2012; Bhadra et al., 2011b).

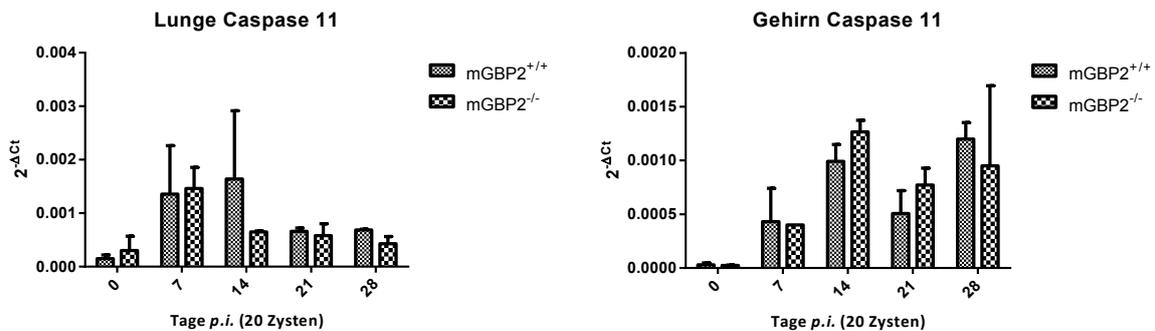


**Abbildung 3.21: Genexpression von PD-1 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

In der Lunge beider untersuchten Mauslinien konnte am Tag 7 eine Induktion der Genexpression von PD-1 nachgewiesen werden, welche aber in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich geringer ausfiel (Abb.3.21) Am Tag 14 p.i. war in beiden Mauslinien ein weiterer Anstieg zu beobachten, wobei die Genexpression in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie deutlich hinter der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie zurückblieb. Ab Tag 21 p.i. sank die Induktion der Genexpression in beiden Mauslinien auf ein geringeres, vergleichbares Niveau. Von da an blieb die Expression bis zum Versuchstag 28 auf einem etwas geringeren Level.

Im Gehirn der Versuchstiere konnte eine kontinuierliche Zunahme der Genexpression von PD-1 beobachtet werden. Zwischen den beiden Mauslinien konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. PD-1, mit seinem immunmodulatorischen Aufgabenspektrum, scheint also erst im späteren Verlauf der Infektion eine wichtige und lang anhaltende Aufgabe zu übernehmen. Die Abwesenheit von mGBP2 scheint darauf keine Auswirkung zu haben.

Um einen Einblick in den Status der TLR- abhängigen Signalwege zu erlangen, wurde schließlich die Genexpression von Caspase 11 analysiert. Die Transkription des Effektormoleküls wird in Folge der Erkennung von intrazellulärem LPS induziert. Gleichzeitig führt die Produktion vermehrt zu Pyroptose und der Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen, wie IL-1 $\beta$  (Hagar et al., 2013; Shi et al., 2014). Caspase 11 ist daher ein wichtiger Indikator für eine starke Immunreaktion.

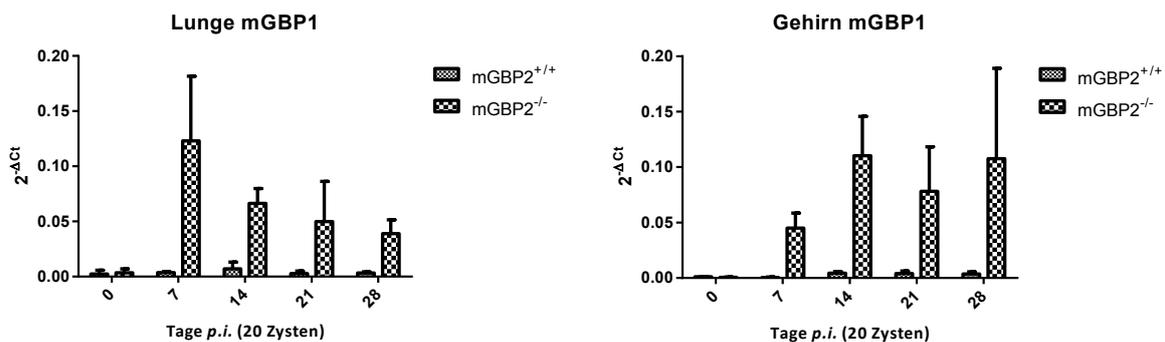


**Abbildung 3.22: Genexpression von Caspase in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 $\mu$ g RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

In den Lungen der Versuchstiere zeigte sich am Tag 7 p.i. eine deutliche Induktion der Genexpression (Abb.3.22). Von Tag 14 an sank dieser Wert in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen und stagnierte dann bis einschließlich Tag 28 p.i., während dieser Abfall in den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen verzögert erst am Tag 21 zu beobachten war. Im Gehirn konnte an den Tagen 7 und 14 nach Infektion ein starker Anstieg der Transkriptmenge in beiden Mauslinien festgestellt werden. Am Tag 21 p.i. sanken diese Werte wieder leicht, um am Tag 28 wieder auf einem dem Tag 14- ähnlichen Level zu sein. Insgesamt konnte für die mGBP2- defiziente Mauslinie eine mit mGBP2<sup>+/+</sup> vergleichbare Caspase 11 Genexpression gemessen werden. Es scheint daher, dass die Abwesenheit von mGBP2 keinen Einfluss auf die Genexpression von Caspase 11 ausübt.

Um das Zusammenspiel der GTPasen auf der Genexpressionsebene zu analysieren und herauszufinden, ob bei Abwesenheit eines GBPs, andere Mitglieder dieser Familie unterschiedlich exprimiert werden, wurde die relative Transkriptmenge der GBPs 1,5 und 7 untersucht.

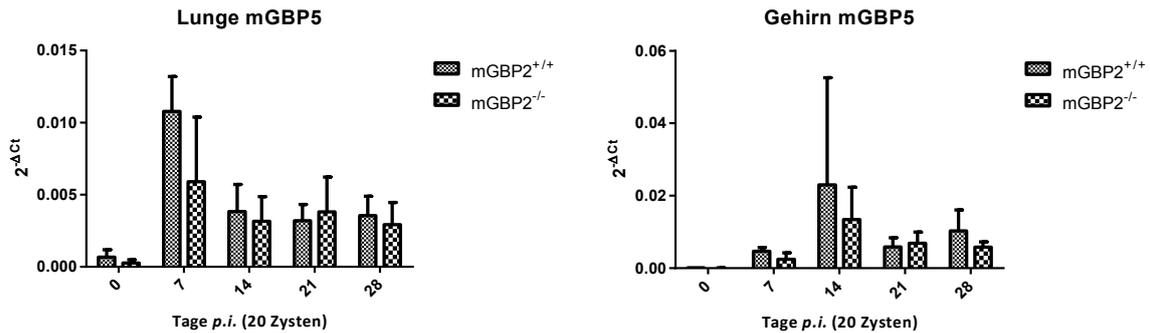
Bei der Analyse der Genexpression von mGBP1 zeigte sich eine signifikante Hochregulation in der mGBP2-defizienten Mauslinie bereits zu Beginn der Infektion in beiden Organen (Abb. 3.23). In der Lunge war das Maximum am Tag 7 erreicht und sank dann kontinuierlich. Im Gehirn war am Tag 14 die höchste Expression messbar, während sie an den anderen Tagen etwas darunter schwankte. In den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen kam es hingegen in beiden Organen zu einer nur äußerst geringen Genexpression. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass obwohl mGBP1 in Abwesenheit von mGBP2 deutlich hochreguliert wird, es keine kompensatorische Wirkung für mGBP2 übernehmen kann, da die defizienten Tiere trotz Hochregulation von mGBP1 eine erhöhte Mortalität gegenüber mGBP2<sup>+/+</sup> Tieren aufwiesen.



**Abbildung 3.23: Genexpression von in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2-defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1-Reservoir-Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT-Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µg RNA/Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5 µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Für mGBP5 konnte in der Lunge am Tag 7 die höchste Genexpression ermittelt werden, wobei die mGBP2-defizienten Mäuse eine etwas geringere Expression zeigten (Abb. 3.24). Am Tag 14 sanken die Werte und hielten sich etwa konstant bis Tag 28 p.i.

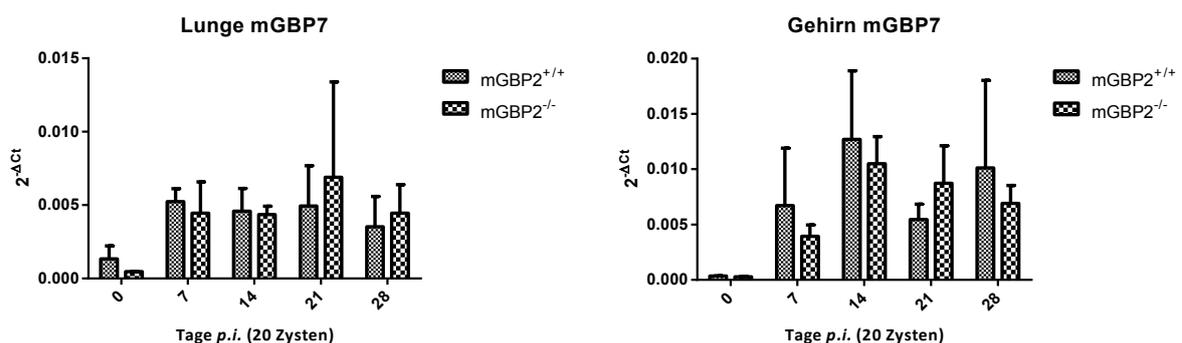
Im Gehirn zeigte sich am Tag 7 p.i. eine geringe Induktion der Genexpression in beiden Mauslinien. Für Tag 14 p.i. konnte dann ein deutlicher Anstieg der Transkriptlevel gemessen werden. Am Tag 21 reduzierte sich der Level und blieb bis zum Tag 28 p.i. konstant. Es konnte also eine deutliche Induktion von mGBP5 in der An- und der Abwesenheit von mGBP2 bei einer *Toxoplasma* Infektion nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.24: Genexpression von mGBP5 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Genexpression von mGBP7 zeigt in der Lunge beider Mauslinien ab Tag 7 einen deutlichen Anstieg. Dieser blieb bis einschließlich Tag 28 p.i. nahezu auf dem gleichen Niveau (Abb.3.25).

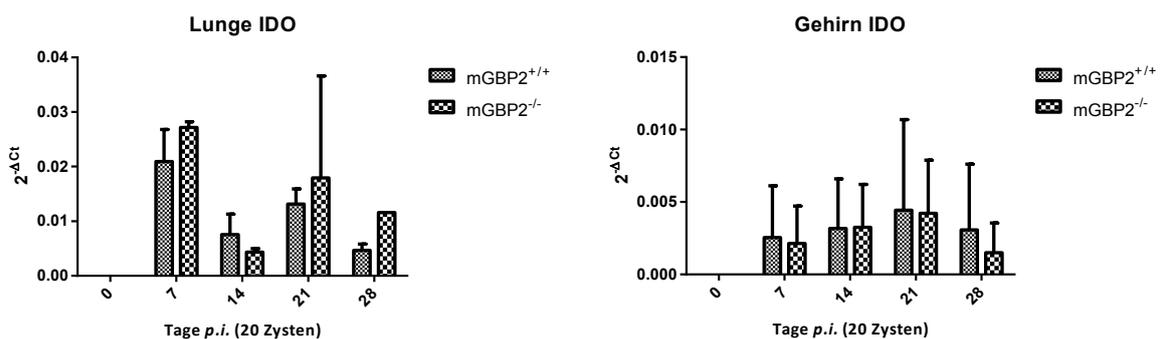
Im Gehirn zeigte sich ebenfalls in beiden Mauslinien ab Tag 7 eine Induktion. Die Menge des Transkriptes stieg dann am Tag 14 noch ein wenig an, sank am Tag 21, um sich am Tag 28 etwa auf mittlerem Niveau einzupendeln. Somit konnte auch für mGBP7 ein deutlicher Anstieg der Transkription nach der Infektion mit *Toxoplasma* beobachtet werden. Aber auch hier schien mGBP2 keinen Einfluss auf die Genexpression auszuüben.



**Abbildung 3.25: Genexpression von in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Im weiteren Verlauf der Analysen von immunregulatorisch wirksamen Effektormolekülen wurde die Genexpression der Indolamin-2,3- Dioxygenase (IDO) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) analysiert. IDO ist ein Enzym, welches Tryptophan zu N-Formylkynurenin umwandelt. Hierdurch ist es für den Tryptophan- auxotrophen Parasiten nicht mehr verfügbar, was die Sterblichkeit des Parasiten potenziell erhöht. Induziert wird die Transkription des Gens durch proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise  $\text{IFN}\gamma$  (Daubener et al., 2001; MacKenzie et al., 1999; MacKenzie et al., 2003)(Dissertation Sabine Pudelko, 2015, Dissertation Julia Nau, 2015).

iNOS wird durch Makrophagen synthetisiert und wirkt durch die hohe oxidative Kraft zytotoxisch auf andere Zellen. Da diese Zytotoxizität kaum spezifisch ist, kann eine überschießende Transkription des Gens auch zu Schäden von gesundem Gewebe im Wirt bis hin zur Sepsis, im extremen Fall, führen (Cobb et al., 1999; Scharton-Kersten et al., 1997). Daher lässt auch hier die Analyse wichtige Rückschlüsse auf den Immunstatus der infizierten Maus zu.



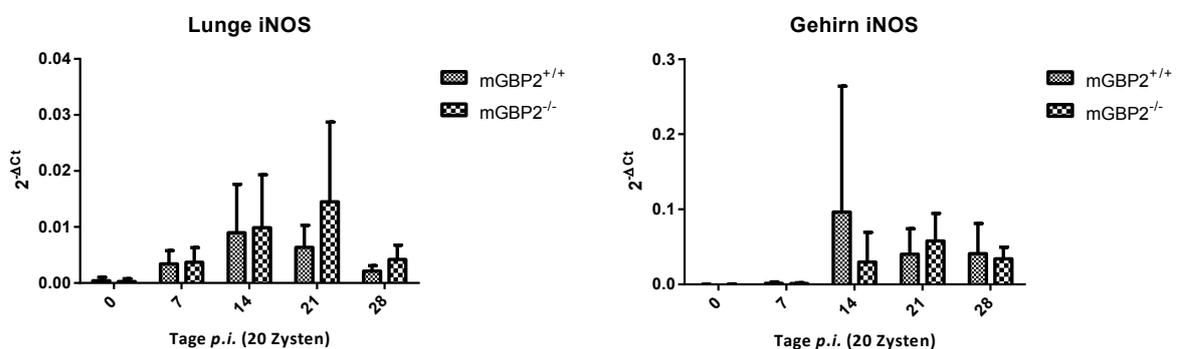
**Abbildung 3.26: Genexpression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Genexpression von IDO verlief in der Lunge beider Mauslinien wellenförmig, mit höheren Werten an den Versuchstagen 7 und 21 und niedrigeren Werten an den Tagen 14 und 28 p.i. (Abb.3.26).

Im Gehirn zeigte das Gen ab Tag 7 eine nahezu identisch hohe Expression. Insgesamt zeigte sich im Zuge der *Toxoplasma* Infektion ein deutlicher Anstieg der IDO- Genexpression - unabhängig von mGBP2. Dies lässt darauf schließen, dass die Absenz von mGBP2 keinen Ein-

fluss auf die IDO Expression hat bzw. die beiden Gene regulatorisch nicht erkennbar in Zusammenhang stehen.

Auch die Genexpression von iNOS war nach der *Toxoplasma* Infektion in beiden Mauslinien erhöht (Abb.3.27). In der Lunge war die Induktion des Gens an den Tagen 14 und 21 auf dem höchsten Niveau. In der akuten Phase, am Tag 7, sowie am Ende der Versuchsreihe, am Tag 28 waren die Transkriptmengen geringer. Im Gehirn war die Expression von iNOS in der akuten Phase, am Tag 7, sehr gering. Am Tag 14 stiegen die Werte deutlich an und stagnierten dann von Tag 14 bis 28 auf einem vergleichbaren Niveau.

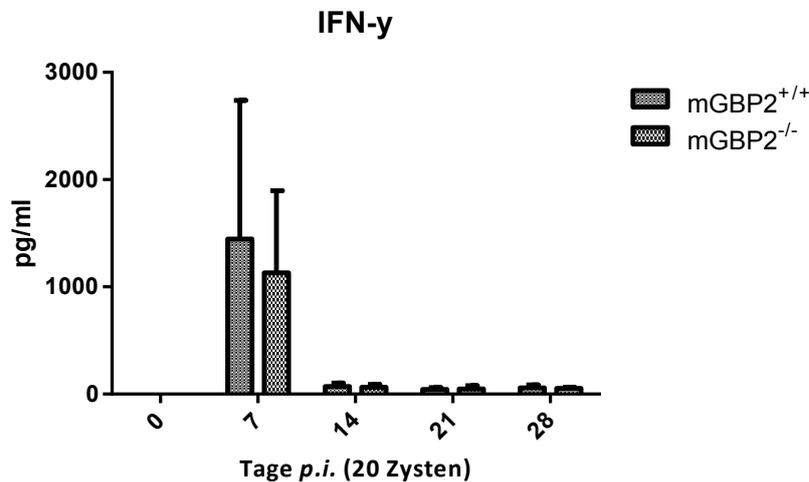


**Abbildung 3.27: Genexpression von iNOS in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 20 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Primern durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg RNA/ Ansatz cDNA verwendet. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Genexpression von iNOS scheint also ebenfalls nicht durch mGBP2 beeinflusst zu werden: in beiden Mauslinien konnte eine vergleichbare Induktion nachgewiesen werden.

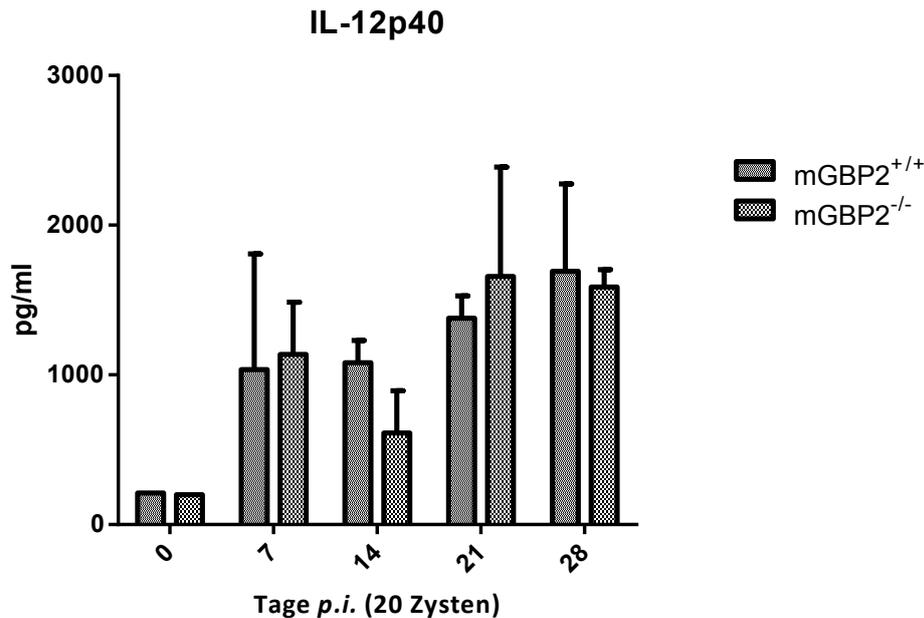
Anhand der gezeigten Experimente konnte ein Einblick in die Transkriptionskontrolle der für die Immunantwort wichtigen regulatorischen Zytokine gewonnen werden. Um nun einen Einblick in das systemische Auftreten der zentralen Botenstoffe zu erlangen, wurden Analysen des Blutserums der Versuchstiere mittels ELISA durchgeführt. Hierzu wurden Versuchstiere der mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie mit 20 Zysten *T.gondii* ME49 infiziert und 7, 14, 21 und 28 Tage nach Versuchsbeginn euthanasiert. Dabei wurde das Blut entnommen und das Serum isoliert. Bis Ablauf des gesamten Versuchs wurden die Proben gesammelt und bei -80°C gelagert. Anschließend wurde der ELISA nach Herstellerangaben der kommerziellen Kits durchgeführt. So sollte untersucht werden, ob es in der mGBP2 defizienten Mauslinie Unterschiede in der Konzentration der Proteine IFN $\gamma$  und IL-12p40 gibt. Zunächst wurde die

IFN $\gamma$  Konzentration bestimmt. In beiden Mauslinien konnte am Tag 7 nach der Infektion ein deutlicher Anstieg auf etwa 1200 pg/ml beobachtet werden (Abb.3.28), der dann im weiteren Verlauf aber wieder deutlich sank. Ein Einfluss von mGBP2 auf die IFN $\gamma$  Konzentration auf Proteinebene konnte somit nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.28:** Analyse der IFN $\gamma$  Konzentration im Serum von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren, infiziert mit 20 Zysten *T.gondii* ME49 (i.p.) mittels ELISA. Die Versuchstiere wurden am selben Tag aus CD1-Reservoir-Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel euthanasiert und das Blut entnommen. Das Blut wurde anschließend mindestens 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 13.000 U/min. zentrifugiert und das Serum entnommen. Der Versuch wurde der Versuchsanleitung des ELISA-Kits entsprechend durchgeführt. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde die Konzentration des ebenso zentralen Zytokins IL-12 im Serum analysiert. Da IL-12, wie bereits erklärt ein Dimer ist, wurde sich auch hier für die Analyse der IL12p40 Untereinheit entschieden (Abb. 3.29). Zu Beginn der Infektion (7 Tage p.i.) zeigte sich eine deutliche Induktion der IL-12p40 Produktion von etwa 100 auf etwa 1100 pg/ml in beiden Mauslinien. Dieser Wert sank am Tag 14 leicht in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. An allen weiteren Tagen gab es in beiden Mauslinien einen vergleichbaren Anstieg. Vergleicht man die Ergebnisse des mGBP2<sup>+/+</sup> und der mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinie zeigt sich, dass in beiden Mauslinien die Induktion des Zytokins ähnlich von statten geht. mGBP2 scheint demnach keinen gravierenden Einfluss auf die Konzentration von IL-12p40 im Serum zu haben.

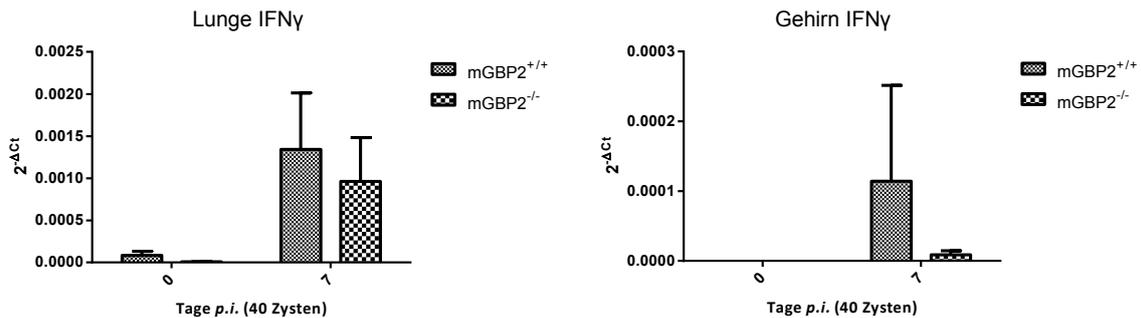


**Abbildung 3.29: Analyse der IL12p40 Konzentration im Serum von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren, infiziert mit 20 Zysten *T.gondii* ME49 (i.p.) mittels ELISA.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 20 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel euthanasiert und das Blut entnommen. Das Blut wurde anschließend mindestens 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 13.000 U/min. zentrifugiert und das Serum entnommen. Der Versuch wurde der Versuchsanleitung des Kits entsprechend durchgeführt. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

### 3.4.2 UNTERSUCHUNGEN DER GENEXPRESSION UND PROTEINBIOCHEMISCHE ANALYSE DER INFEKTION MIT 40 ZYSTEN *T.GONDII* ME49

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Tiere der mGBP2 defizienten Mauslinie bei einer 40 Zysten *T.gondii* ME49 Infektion im Vergleich zu der Infektion mit 20 Zysten bereits nach 7 Tagen eine signifikant erhöhte Sterblichkeitsrate aufwiesen (Abb.3.1, 3.2), sollte auch hier die Immunantwort näher charakterisiert werden. So wurden auch hier wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine und immunregulatorische Effektormoleküle ausgewählt und auf ihre Genexpression untersucht.

Zunächst wurde auch in diesem Infektionsmodell die Expression von IFN $\gamma$  analysiert (Abb. 3.30).

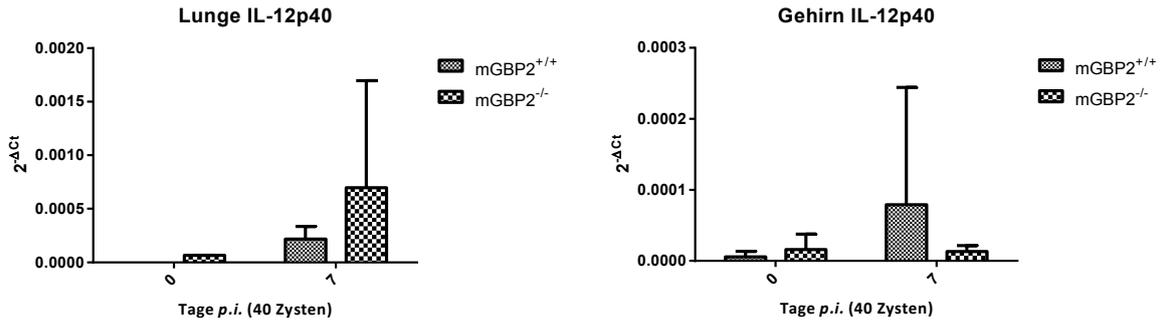


**Abbildung 3.30: Genexpression von IFN $\gamma$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1-Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro Well wurden 5  $\mu\text{l}$  in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

In der Lunge zeigt sich eine deutliche Induktion der IFN $\gamma$  Genexpression nach 7 Tagen nach Infektion in beiden Mauslinien (Abb.3.30). Es zeigte sich also auch bei einer erhöhten Dosis eine starke, direkte Immunantwort auf den Erreger.

Im Gehirn war in naiven Tieren beider Linien kein IFN $\gamma$  nachzuweisen, da der Wert offenbar unterhalb des Detektionslimits des Systems lag. Am Tag 7 p.i. war eine deutliche Induktion von IFN $\gamma$  in den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen zu erkennen. Aufgrund der hohen Standardabweichung einer einzelnen Infektionsrunde bei diesen Mäusen, scheint es zunächst nach einem deutlichen Unterschied zwischen den Mauslinien auszusehen. Statistisch konnte hier allerdings keine Signifikanz ermittelt werden. Des Weiteren war zu erkennen, dass die relative Transkriptmenge im Gehirn insgesamt um das ca. 10-fache geringer als in der Lunge war.

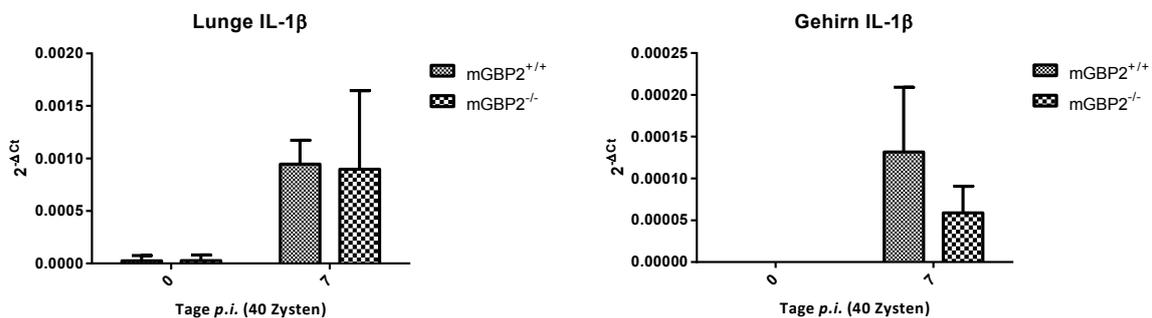
Die Analyse der relativen Transkriptionsmenge von IL-12p40 zeigte ein ähnliches Ergebnis (Abb. 3.31).



**Abbildung 3.31: Genexpression von IL-12p40 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

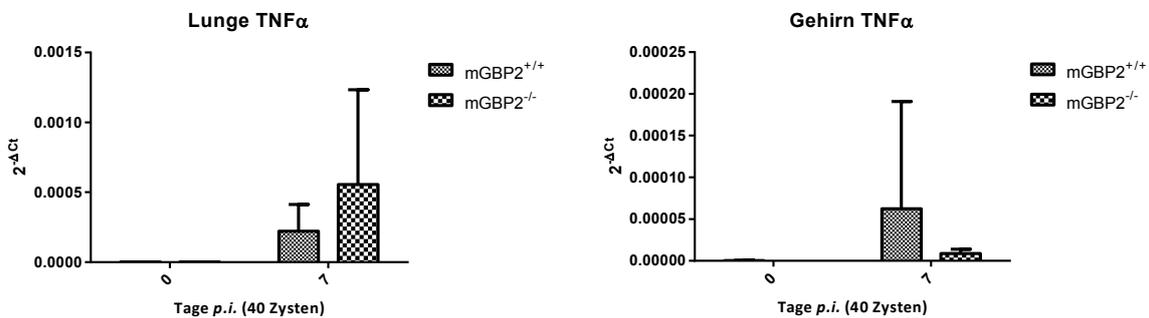
Es ist eine deutliche Induktion der Genexpression des Zytokins in Gehirn und Lunge beider Mauslinien zu erkennen. Der Vergleich zwischen mGBP2<sup>-/-</sup> und mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Es konnte demnach nachgewiesen werden, dass auch im 40 Zysten Infektionsmodell eine mit mGBP2<sup>+/+</sup> vergleichbare IL-12 Expression vorhanden war und es hier keine dosisabhängigen Unterschiede gibt.

Die Untersuchung der Transkription von IL-1β (Abb. 3.32) zeigte ebenfalls eine deutliche Induktion in der Lunge beider Mauslinien am Tag 7. Im Gehirn der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse konnte eine geringfügig geringere IL-1β Induktion als in mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen gezeigt werden. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht festgestellt werden.



**Abbildung 3.32: Genexpression von IL-1β in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

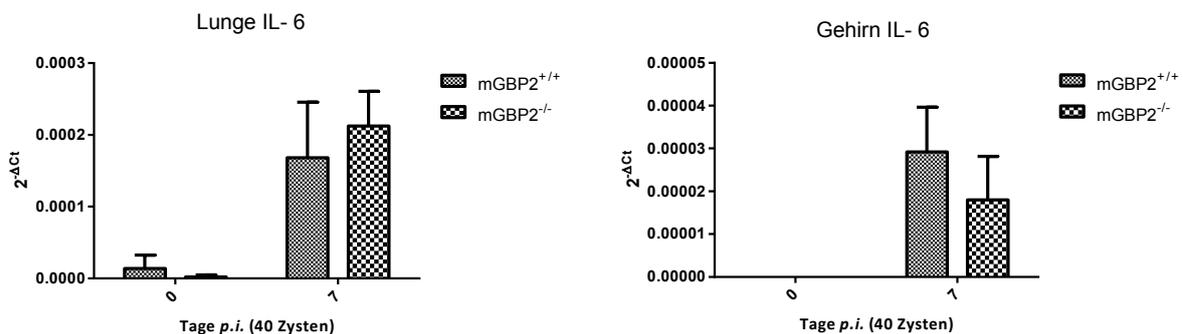
Um einen Einblick in die Entzündungsreaktion im Körper der Versuchstiere zu erhalten, wurde ebenfalls die Expression von TNF- $\alpha$  untersucht.



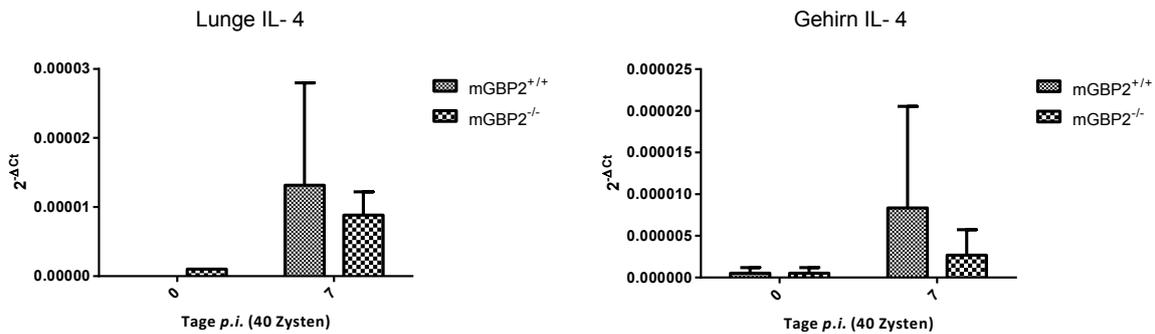
**Abbildung 3.33: Genexpression von TNF- $\alpha$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3 $\mu$ g/ $\mu$ l. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

In den Mauslinien war in beiden analysierten Organen eine vergleichbare Induktion von TNF- $\alpha$  zu beobachten (Abb.3.33).

Des Weiteren wurde auch in diesem Infektionsmodell die Genexpression von IL-6 analysiert, um zu untersuchen, ob es durch die Abwesenheit von mGBP2 zu Unterschieden in der Regulation kommt. Es zeigte sich, dass am Tag 7 p.i. in beiden Mauslinien in Lunge und Gehirn eine starke Induktion des Gens vorhanden war (Abb.3.34). mGBP2 scheint also auch hier keinen Einfluss auf die Genexpression auszuüben.



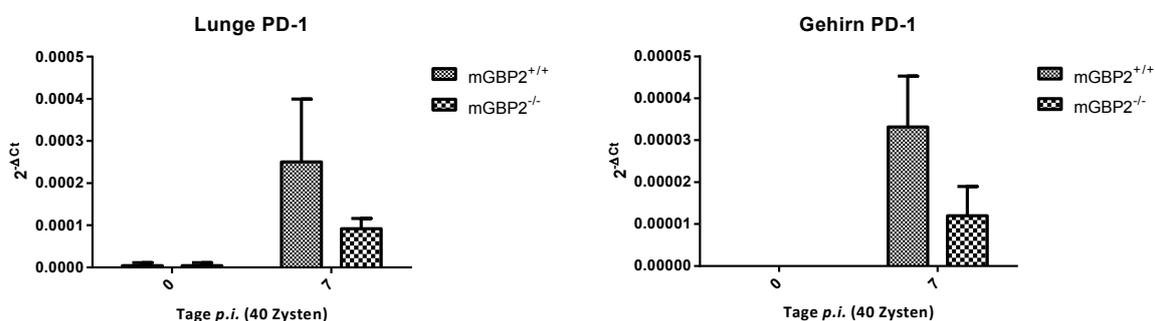
**Abbildung 3.34: Genexpression von IL-6 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3 $\mu$ g/ $\mu$ l. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.



**Abbildung 3.35: Genexpression von IL-4 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

In der Analyse der Transkription von IL-4 konnte in beiden Mauslinien eine deutliche Induktion der Genexpression nach einer Infektion mit *T.gondii* ME49 aufgezeigt werden (Abb.3.35). In den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen kam es zu einer geringfügig höheren Expression. Die Standardabweichung war hier jedoch sehr hoch, sodass kein statistisch signifikanter Wert festzustellen ist.

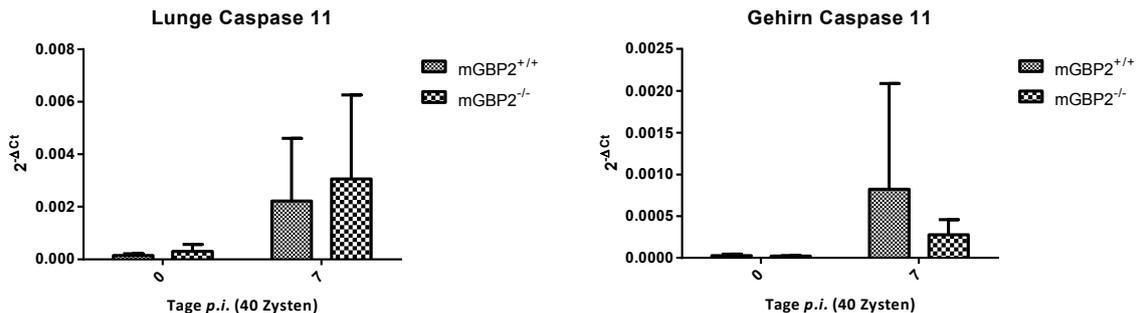
Um zu untersuchen, ob es am Tag 7 p.i. eventuell erhöhten Vorkommen deaktivierter T- und B- Zellen kommt, wurde auch in diesem Infektionsmodell die Genexpression von PD-1 untersucht (Abb. 3.36). In Gehirn und Lunge beider Mauslinien konnte eine erhöhte PD-1 Expression nach der Infektion beobachtet werden. Auch wenn die Werte in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen geringer waren, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 3.36: Genexpression von PD-1 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

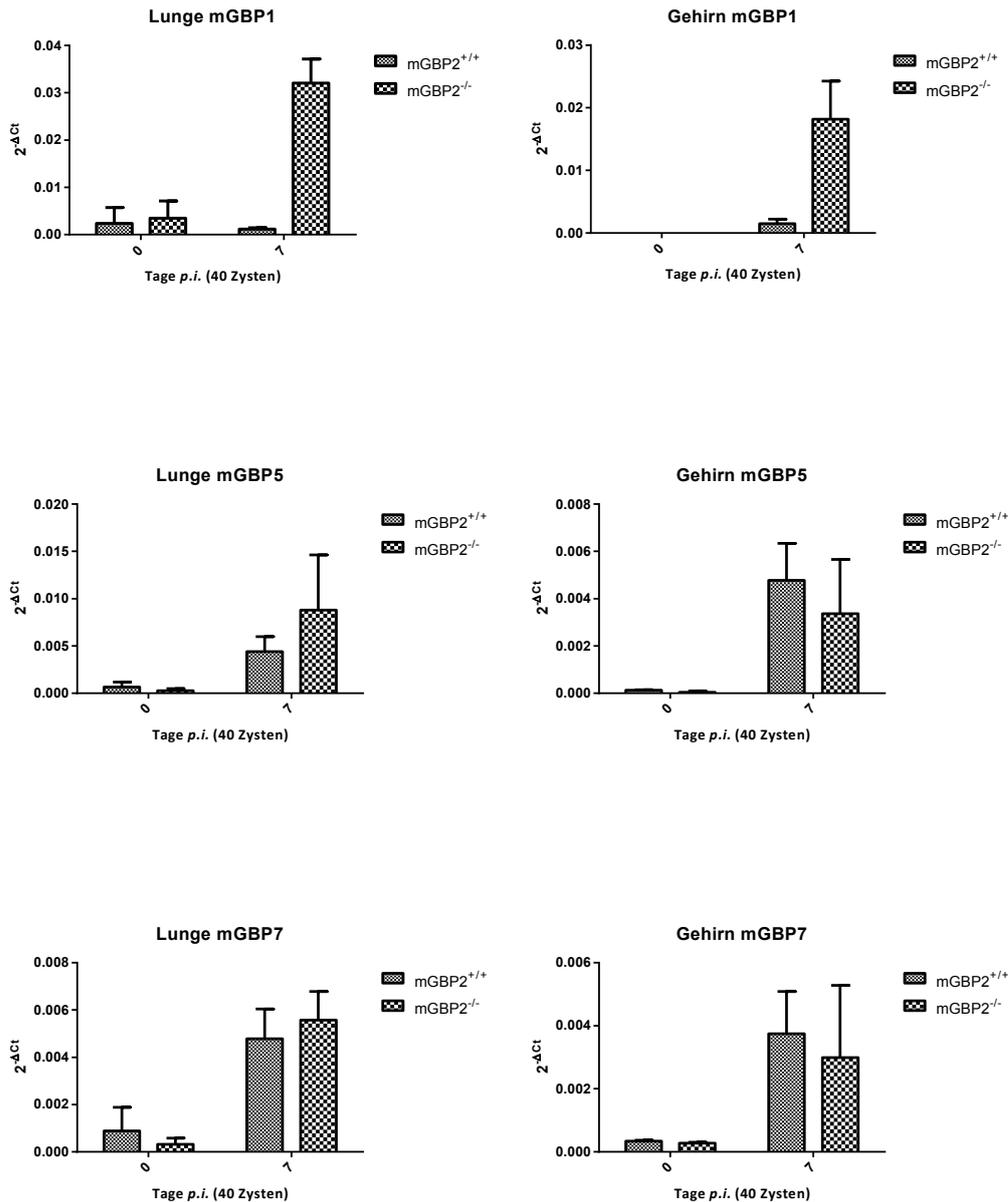
In der Lunge der mGBP2- defizienten Mauslinie konnte eine deutliche Induktion von Caspase 11 nachgewiesen werden (Abb. 3.37).

Im Gehirn konnte die Genexpression ebenfalls, wenngleich auf wesentlich niedrigerem Niveau, festgestellt werden. In der Lunge sind die Werte des mGBP2<sup>+/+</sup> sehr ähnlich, während der mGBP2<sup>+/+</sup> im Gehirn eher mehr Caspase 11 aufweist. Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen mGBP2<sup>+/+</sup> und den mGBP2 defizienten Versuchstieren.



**Abbildung 3.37: Genexpression von Caspase 11 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

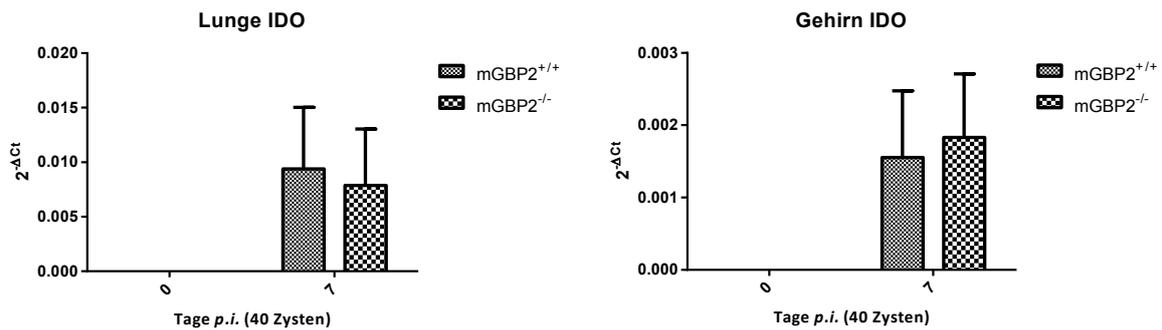
In den nächsten Schritten sollte nun untersucht werden, ob weitere GBPs in der mGBP2 defizienten Mauslinie bei der 40 Zysten- Infektion unterschiedlich exprimiert werden (Abb. 3.38). Die erhöhte Genexpression von mGBP1 konnte auch hier in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie, sowohl in der Lunge als auch im Gehirn festgestellt werden. Für mGBP5 und mGBP7 konnten dem in mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen ähnliche Translationsmengen nachgewiesen werden. Es lässt sich daher festhalten, dass die Regulation dieser GBPs in der defizienten Maus nicht Infektionsdosis-abhängig ist.



**Abbildung 3.38: Genexpression der GBPs mGBP1, 5 und 7 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

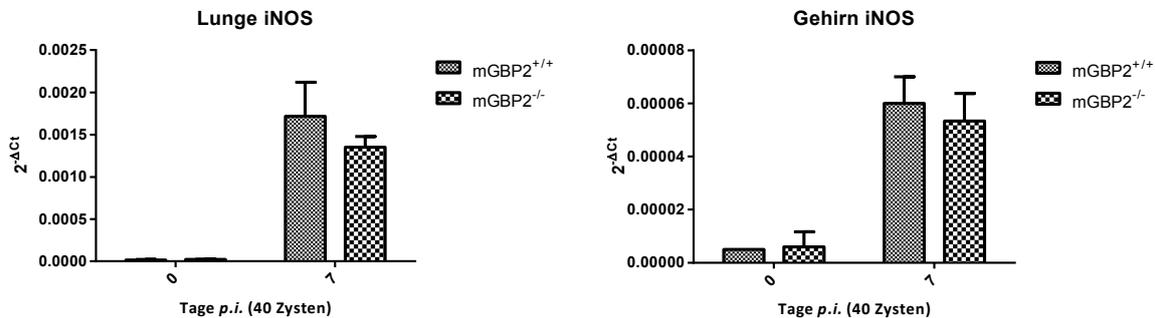
Als Nächstes wurde ebenfalls die Expression von IDO untersucht. In beiden Mauslinien war 7 Tage nach der Infektion eine vergleichbar starke Genexpression zu beobachten (Abb.3.39), daher scheint hier keine Regulation des Effektormoleküls in Abhängigkeit der Infektionsdosis

vorzuliegen.



**Abbildung 3.39: Genexpression von IDO in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

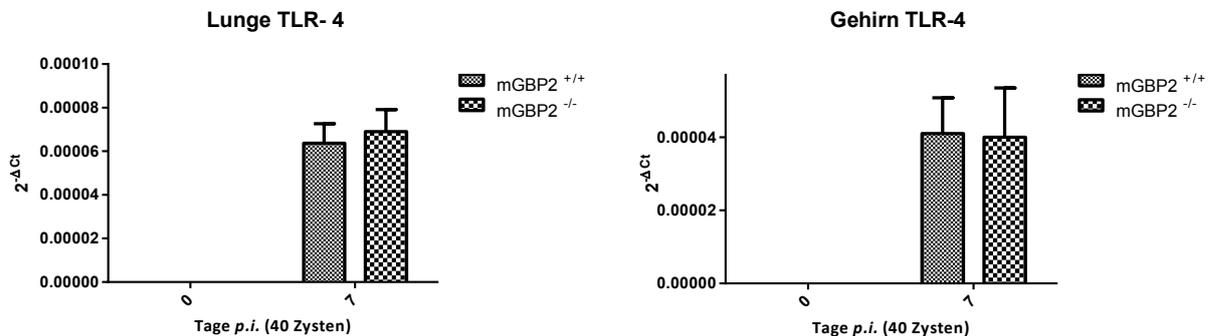
Ein weiteres, ebenfalls bereits im 20 Zysten Infektionsmodell untersuchtes Effektormolekül ist iNOS. Aber auch hier konnte kein Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Mauslinien verzeichnet werden (Abb.3.40).



**Abbildung 3.40: Genexpression von iNOS in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

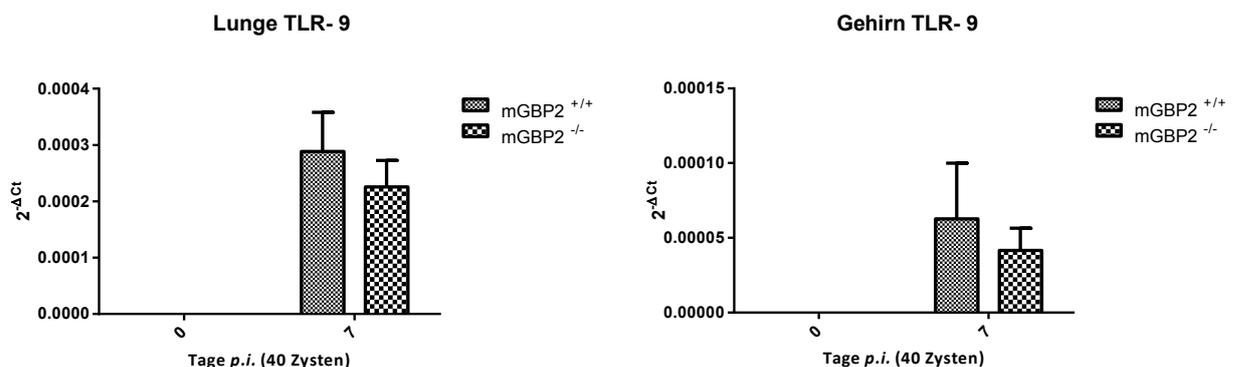
Um zu analysieren, ob Unterschiede in der TLR Expression zwischen den beiden Mauslinien existieren, wurde in den folgenden Experimenten die Genexpression untersucht. TLR4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS) an der Zelloberfläche und steuert die Zelle via des MyD88-Signalwegs (Chow et al., 1999; Debierre-Grockiego et al., 2007; Pifer und Yarovinsky, 2011; Zare-Bidaki et al., 2014). Es zeigte sich, dass die Genexpression von TLR4 hinsichtlich einer

Infektion mit *T.gondii* nur wenig hochreguliert wird (Abb. 3.41). Die Absenz von mGBP2 scheint auch nicht zu einer Deregulation der Genexpression zu führen.



**Abbildung 3.41: Genexpression von TLR 4 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3 µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

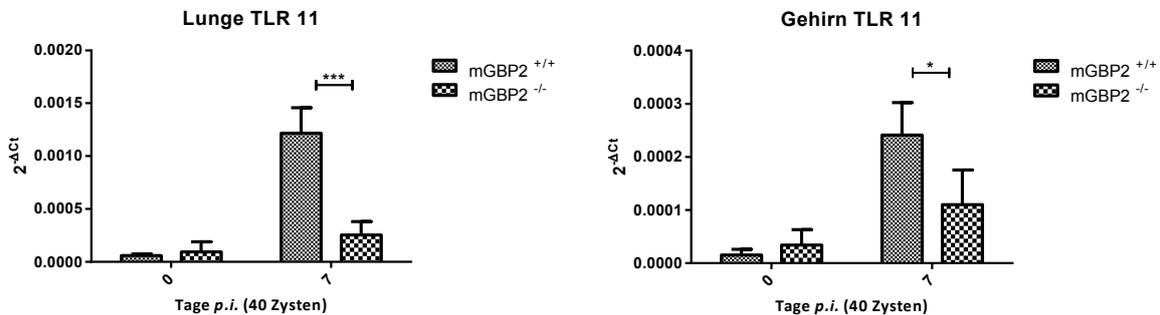
Die Genexpression von TLR9, welcher eine wichtige Rolle bei der Erkennung von extranukleärer DNA spielt, zeigte sich in der Lunge und im Gehirn der Versuchstiere an Tag 7 p.i. ähnlich (Abb. 3.42). Es konnte lediglich eine geringfügige Reduktion der Expression in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie beobachtet werden. Auch konnte festgestellt werden, dass TLR9 in der Lunge zu diesem Zeitpunkt der Infektion höher exprimiert wird als im Gehirn.



**Abbildung 3.42: Genexpression von TLR 9 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3µg/µl. Pro Well wurden 5µl in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Es folgte die Analyse der Genexpression von TLR 11 (Abb. 3.43) und TLR 12 (Abb. 3.44). TLR 11 erkennt Flagellin und Profilin von *T.gondii* ME49 und trägt vor allem zur IL-12,

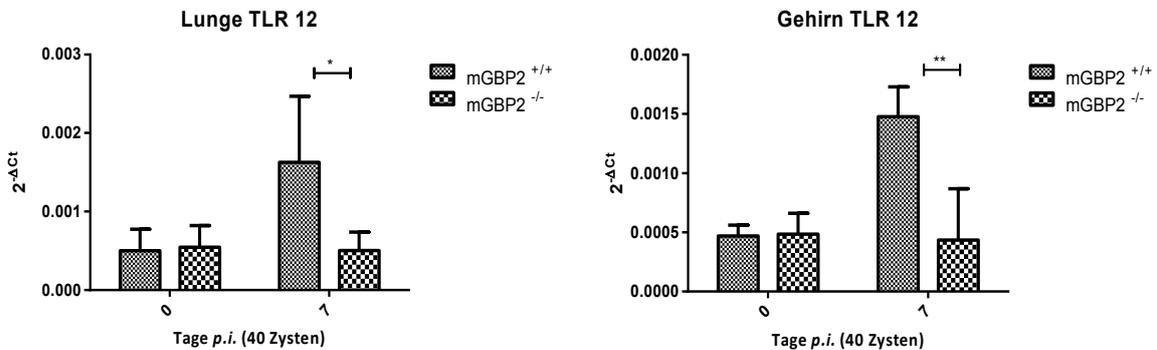
TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  Produktion und Sekretion bei (Koblansky et al., 2013; Pifer et al., 2011; Pifer und Yarovinsky, 2011; Plattner et al., 2008; Raetz et al., 2013; Yarovinsky et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). Da die vorherigen Experimente bereits zeigten, dass in der relativen Transkriptmenge dieser Zytokine keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren, sollte hier nun geprüft werden, ob die Induktion der Zytokinsekretierung in der mGBP2 defizienten Mauslinie auf demselben Wege erfolgt, oder ob es über eine alternative, kompensatorische Signalkaskade verläuft. Interessanterweise zeigten sich tatsächlich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien in der Genexpression von TLR 11 nach einer Infektion mit 40 Zysten. In der Lunge sind die Werte der relativen Transkriptmenge in den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant höher. Demnach könnte es im 40 Zysten Infektionsmodell in der mGBP2 defizienten Mauslinie zu einer verringerten Erkennung von Flagellin und Profilin zu kommen und somit zu einer geringeren Induktion der Signalkaskade via TLR 11. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Analyse der TLR 11 Transkriptmengen im Gehirn. Der Wert hier erscheint jedoch insgesamt niedriger und es zeigt sich lediglich eine 1\* Signifikanz. Dies kann jedoch mit dem Gesamtverlauf der Infektion erklärt werden, da das Gehirn wesentlich später als die Lunge von einer großen Anzahl Parasiten befallen wird.



**Abbildung 3.43: Genexpression von TLR 11 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3 $\mu$ g/ $\mu$ l. Pro Well wurden 5 $\mu$ l in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

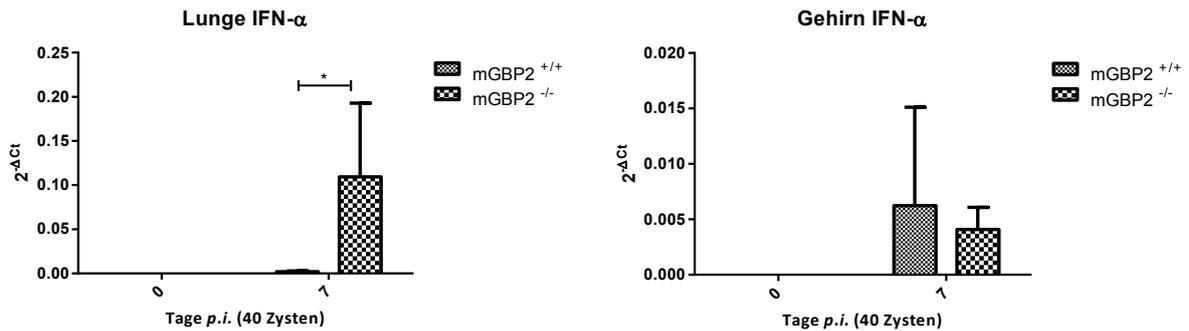
TLR 12 gehört, wie auch TLR 11, zu denjenigen Rezeptoren, die für die Erkennung von Profilin in der Maus verantwortlich sind (Raetz et al., 2013). Die Analyse der relativen Genexpression zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der TLR12 Expression in der mGBP2 defizienten Mauslinie im Vergleich zu den mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen. Dies konnte sowohl in der Lunge als auch im Gehirn gezeigt werden (Abb.3.44). Während die Genexpression in den mGBP2- defizienten Mäusen 7 Tage nach der Infektion unverändert blieb, kam es bei den

mGBP2<sup>+/+</sup> Mäusen zu einem deutlichen Anstieg. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zytokin- Induktion über den TLR12- abhängigen Signalweg verringert sein muss. Es scheinen jedoch kompensatorische Signalwege zu existieren, da gezeigt werden konnte, dass die Induktion von IL12p40, TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$  in der mGBP2- defizienten Mauslinie nicht signifikant defizitär ist.



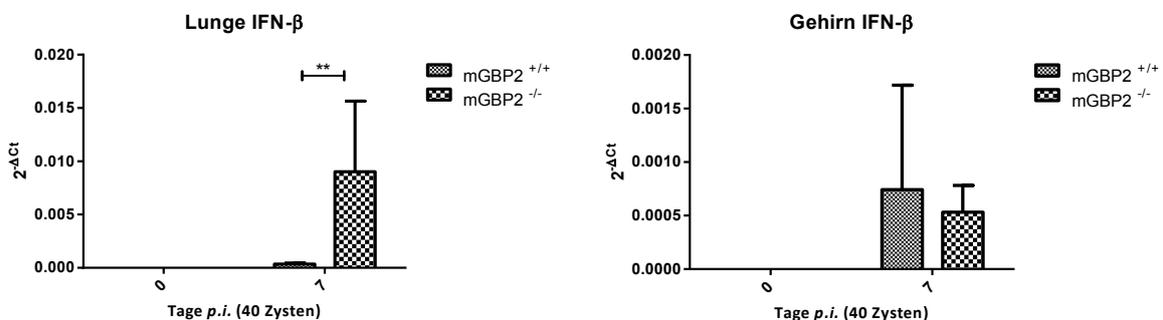
**Abbildung 3. 44: Genexpression von TLR 12 in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2- defizienten Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1- Reservoir Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro Well wurden 5  $\mu\text{l}$  in der qRT- PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Da die p65 GTPasen (mGBPs) im speziellen auch über Typ I Interferone in ihrer Expression gesteuert werden können, wurde vermutet, dass durch die Nichtverfügbarkeit von mGBP2 in der defizienten Mauslinie zu einer Deregulation dieser Gene kommen könnte. Daher wurden hier die Werte der Genexpression von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in beiden Mauslinien miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass IFN- $\alpha$  an Tag 7 p.i. im 40 Zysten Infektionsmodell in den Lungen der mGBP2 defizienten Mauslinie statistisch signifikant höher exprimiert wird, als in den Lungen der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie (Abb. 3.45). Die Werte im Gehirn sind bei beiden Mauslinien deutlich niedriger und auf einem vergleichbaren Niveau.



**Abbildung 3.45: Genexpression von IFN- $\alpha$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1-Reservoir-Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT-Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro Well wurden 5  $\mu\text{l}$  in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt. Signifikanz dargestellt als \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

Die Genexpression von IFN- $\beta$  zeigte sich am Tag 7 nach Infektion ebenfalls in den Lungen der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie signifikant erhöht, im Vergleich zur mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie. In den Gehirnen beider Mauslinien ließ sich insgesamt eine geringere Expression von IFN- $\beta$  nachweisen (Abb. 3.46).



**Abbildung 3.46: Genexpression von IFN- $\beta$  in Lunge und Gehirn von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinien im 40 Zysten Infektionsmodell.** Die Versuchstiere wurden mit am selben Tag aus CD1-Reservoir-Tieren isolierten 40 Zysten i.p. in der ZETT intraperitoneal infiziert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Präparation aller Organe des Versuchstages wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels Trizol, wie in Kapitel 2.3.2., beschrieben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe Oligo-dT-Primern durchgeführt mit einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro Well wurden 5  $\mu\text{l}$  in der qRT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils 2 Wells für ein Individuum angesetzt und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Excel und GraphPad Prism. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt. Signifikanz dargestellt als \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,0005$ .

Wenngleich die Standardabweichung in den gemessenen Werten der Gehirne recht hoch ist, ist die Genexpression auch hier auf einem vergleichbaren Level. Betrachtet man die Unterschiede in der Genexpression der Typ I Interferone, so wird deutlich, dass die Absenz von mGBP2 die Regulation von Signalwegen so verändert, dass es zu einer Deregulation von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  in der Lunge führt.

### **3.5 IMMUNANTWORT BEI INFEKTION MIT WEITEREN INTRAZELLULÄREN PATHOGENEN**

Um die Immunantwort der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie bei einer Infektion mit anderen intrazellulären Erregern zu analysieren und so die Bedeutung von mGBP2 weiter zu ergründen, wurden Versuche mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) und dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) durchgeführt.

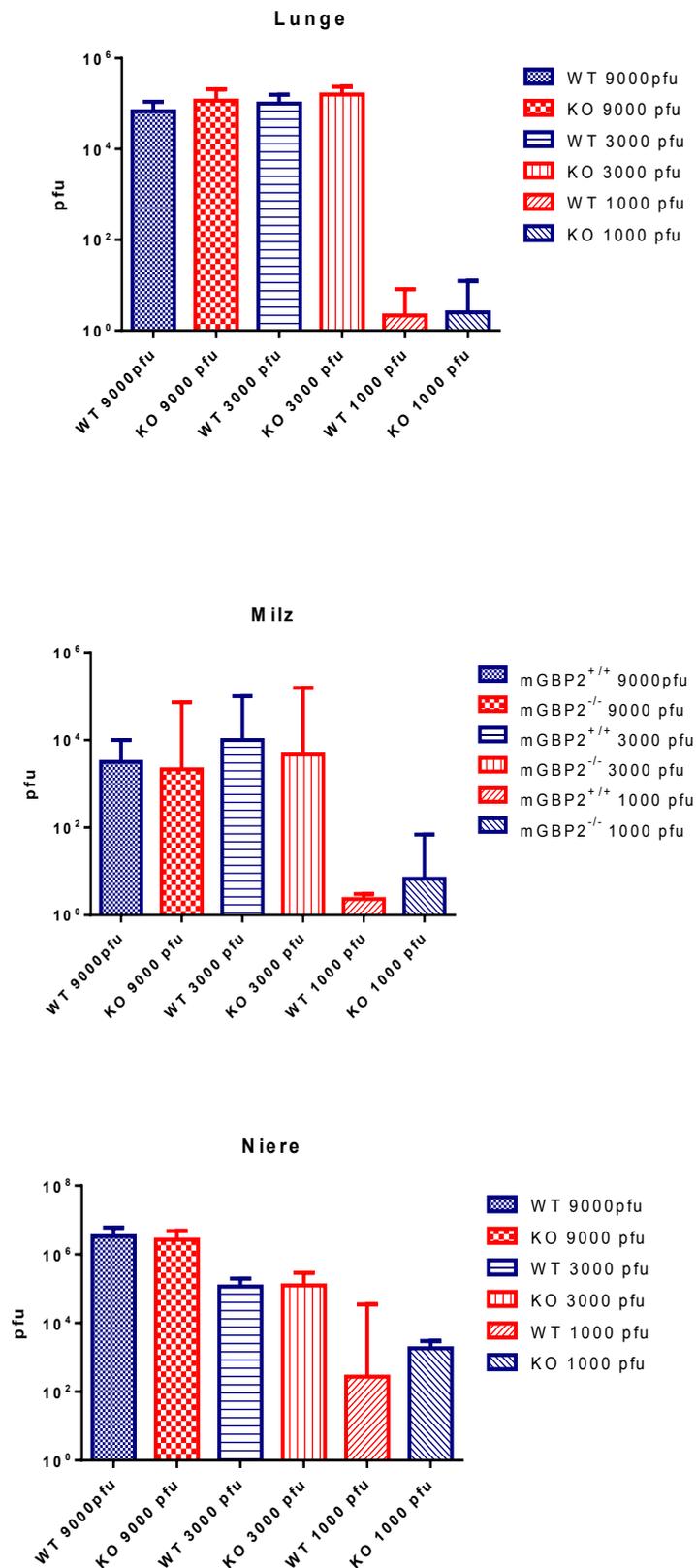
#### **3.5.1 UNTERSUCHUNGEN DER IMMUNANTWORT DER MGBP2 - DEFIZIENTEN MAUSLINIE BEI EINER LYMPHOZYTÄREN CHORIOMENINGITIS VIRUS (LCMV) INFEKTION**

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus ist ein beliebter Modellorganismus innerhalb der Immunbiologie. Da das Virus eine für den Wirt essentielle und starke T- Zell Antwort hervorruft, konnten viele offene Fragen der Biologie und Wirkung der T- Zellen untersucht und gelöst werden. So wurde beispielsweise die T- Zell Exhaustion und MHC- Restriktion ergründet (Wherry, 2011; Wherry et al., 2007; Zhou et al., 2012; Zinkernagel und Doherty, 1997). In den folgenden Versuchen sollte so überprüft werden, ob die Abwesenheit von mGBP2 einen Einfluss auf die Immunantwort gegenüber LCMV hat. Es wurden jeweils 3 verschiedene Infektionsdosen gewählt: 9000, 3000 und 1000 *Plaque forming units* (pfu). Dies sollte zeigen, ob dosisabhängige Unterschiede in der Immunantwort auftreten, wie beispielsweise ein Überschießen oder ein Ausbleiben bestimmter Immunreaktionen.

##### **3.5.1.1 Bestimmung des Virustiters in LCMV- Infektionsmodellen**

Um die Virus-Belastung des Organismus zu untersuchen und zu ermitteln, ob es Unterschiede in der Replikationsrate des Virus in beiden Mauslinien gab, wurde die Analyse des Virustiters

in den immunologisch bedeutsamen Organen Lunge, Milz und Niere durchgeführt (Abb. 3.47).



**Abbildung 3.47: Bestimmung des Virustiters in mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen bei verschiedenen Infektionsdosen mit LCMV.** Die Versuchstiere wurden mit der entsprechenden Dosis LCMV intravenös infiziert. Am Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die jeweiligen Organe entnommen und eine Titerbestimmung durchgeführt. Pro Versuchsgruppe wurden 3 Tiere verwendet. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt. mGBP2<sup>+/+</sup>=C57BL/6; KO=mGBP2<sup>-/-</sup> Maus.

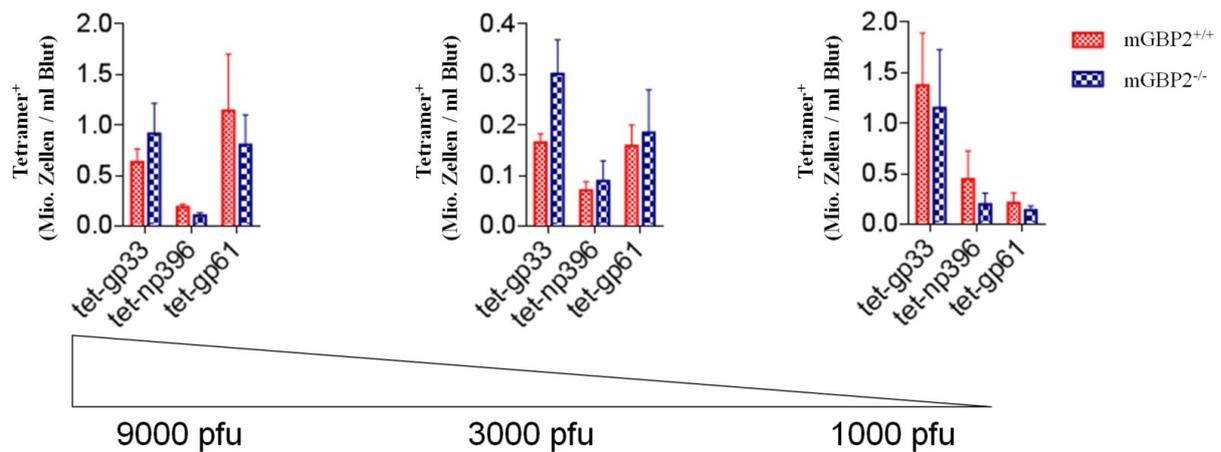
Die Versuchstiere wurden mit 9000, 3000 oder 1000 *pfu* infiziert und am Tag 22 p.i. aus dem Versuch genommen. Die bis dahin täglich durchgeführte Sichtkontrolle der Tiere zeigte, dass beide Mauslinien nur leichte Grippe-ähnliche Symptome aufwiesen, ansonsten aber unauffällig blieben.

Durch Applikation von verschiedenen Infektionsdosen sollte analysiert werden, ob es in der Immunantwort der Versuchstiere zu dosisabhängigen Unterschieden in der Replikation der Viren kommt. Es konnte gezeigt werden, dass diese hier nicht zu beobachten sind (Abb. 3.47). Es kommt zwar erwartungsgemäß insgesamt zu deutlichen Unterschieden des Titers in Abhängigkeit der Infektionsdosen, vergleicht man allerdings die mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse einer Infektionsdosis miteinander, so konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Es kann somit der Schluss gezogen werden, dass die Abwesenheit von mGBP2 keinen Einfluss auf die Kontrolle der Replikation von LCMV hat.

### 3.5.1.2 Analyse der LCMV- spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T- Zell Antwort

Die effektive Bekämpfung einer LCMV Infektion im Mausmodell basiert auf einer potenten T- Zell Antwort, mit CD8- T Zellen, die spezifisch mit dem Virus infizierte Zellen erkennen und eliminieren können. Die Identifikation der infizierten Zellen wird mithilfe der MHC- Moleküle bewirkt. Auf diesen werden bestimmte Epitope präsentiert, an welche die T- Zellen mit den T-Zell Rezeptoren binden können. Da die Sequenz verschiedener LCMV- spezifischer Epitope bekannt und etabliert ist, lassen sich die hierfür spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen im Durchflusszytometer durch Bindung an künstliche Tetramere, welche dieses Epitop tragen, numerisch quantifizieren. Für die Erfassung der spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen wurden die Epitope gp33 (KAVYNFATCGI) und np396 (FQPQNGQFI) verwendet. Die Messungen der CD4<sup>+</sup> T- Zell Antwort wurde mit Hilfe von Tetrameren, welche das Epitop gp61 (GLNGPDIYKGVYQFKSVEFD) trugen, durchgeführt. Die Tiere beider Mauslinien wurden mit 9000, 3000 oder 1000 pfu i.v. in die Schwanzvene infiziert. Am Tag 20 p.i. wurden die Versuchstiere euthanasiert und das Blut entnommen. Nach der anschließenden Färbung zeigte

sich in der Messung im Durchflusszytometer, dass in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie eine starke Induktion einer LCMV- spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort vergleichbar zu der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie zu beobachten war (Abb. 3.48). Die Messung mit dem Tetramer gp33 erreichte bei allen Infektionsmodellen den höchsten Wert. Es konnte jedoch auch bei dem Epitop np396 eine deutliche Induktion gezeigt werden. Aus den Versuchen ist zu schließen, dass die CD8<sup>+</sup> T- Lymphozytäre Immunantwort in der mGBP2 defizienten Mauslinie weder gehemmt, noch dereguliert war.



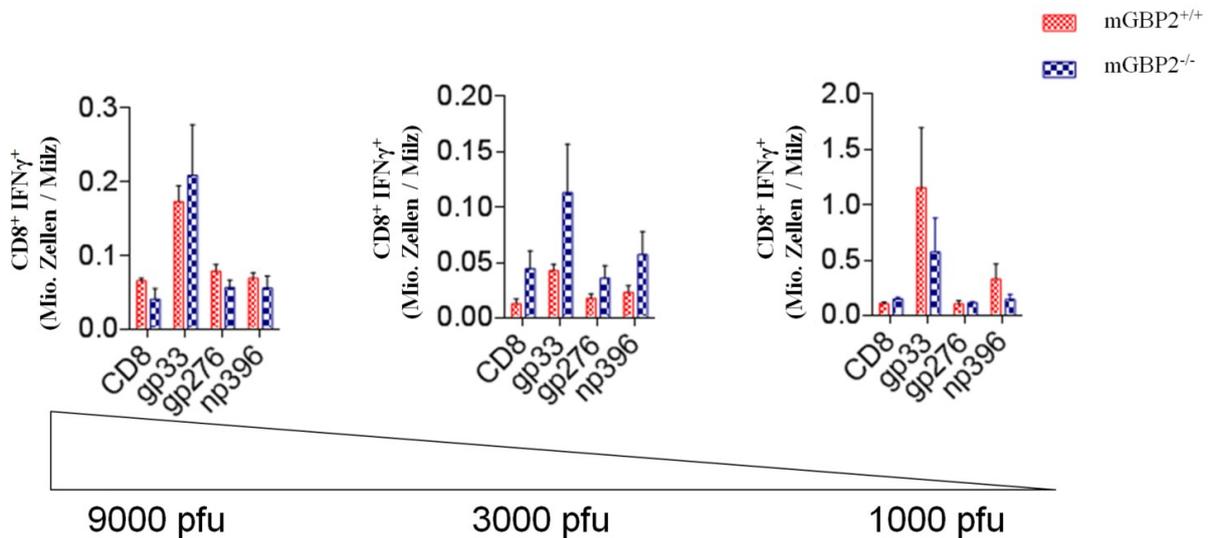
**Abbildung 3.48: LCMV- spezifische T- Zell Antwort bei der Infektion mit LCMV.** Es wurden 9000, 3000 oder 1000 pfu appliziert. Die Versuchstiere wurden mit der entsprechenden Dosis LCMV intravenös infiziert. Am Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Milz entnommen, deren Zellen vereinzelt und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Es kamen die Tetramere mit den Epitopen gp33,np396 und gp61 zum Einsatz. Pro Versuchsgruppe wurden 3 Tiere verwendet. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser drei Wiederholungen sind dargestellt.

Die Analyse der LCMV spezifischen CD4<sup>+</sup> T- Zell Antwort zeigte nicht ausschließlich, aber vor allem in den Infektionsmodellen mit 9000 und 3000 pfu, eine starke Induktion in beiden Mauslinien. Es kann daher der Schluss gezogen werden, dass die Immunreaktion der T- Helferzellen durch die Absenz von mGBP2 nicht verändert war. mGBP2 scheint demnach bei der intrazellulären Bekämpfung von LCMV, dem Transport und der Prozessierung zu den MHC-I und II Molekülen nicht maßgeblich beteiligt zu sein.

### 3.5.1.3 Analyse der Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozytären Immunantwort durch intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)

Die voran gegangenen Experimente zeigten eine deutliche Induktion der CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort in der mGBP2 defizienten Mauslinie. Um nun zu überprüfen, ob diese Zellen aktiviert und ähnlich funktional sind wie in mGBP2<sup>+/+</sup> Tieren, wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt (Abb.3.45). Hierzu wurden Versuchstiere beider Mauslinien mit 9000, 3000 oder 1000 pfu LCMV infiziert. Am Tag 20 wurden die Tiere euthanasiert, die Milz ent-

nommen und die Zellen vereinzelt. Nach erfolgter Restimulation mit den Proteinen gp33, gp276 (SGVENPPGGYCL) oder np396 wurden diese und naive, nicht- restimierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 3.49: : Intrazelluläre Zytokininfärbung (ICS). Veranschaulichung der IFN $\gamma$  Produktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Milzen aus mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen bei Infektionen mit 9000, 3000 oder 1000 pfu LCMV.** Am jeweiligen Versuchstag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt, mit jeweiligen Proteinen gp33, np276 und np396 restimuliert und für die Messung im Durchflusszytometer vorbereitet. Das Ergebnis der Messung von 3 individuell durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Pro Versuchstag und Mauslinie wurden jeweils 3 Mäuse verwendet.

Es konnte in der mGBP2<sup>-/-</sup> wie auch in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie eine starke IFN- $\gamma$  Produktion nachgewiesen werden (Abb.3.49). Die Restimulation durch das Peptid gp33 war hierbei am effektivsten. Die geringen Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien erwiesen sich als statistisch insignifikant. Es konnte somit gezeigt werden, dass die CD8<sup>+</sup> T- Zellen in der mGBP2- defizienten Mauslinie aktiviert und funktional sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es keine dosisabhängigen Unterschiede gibt.

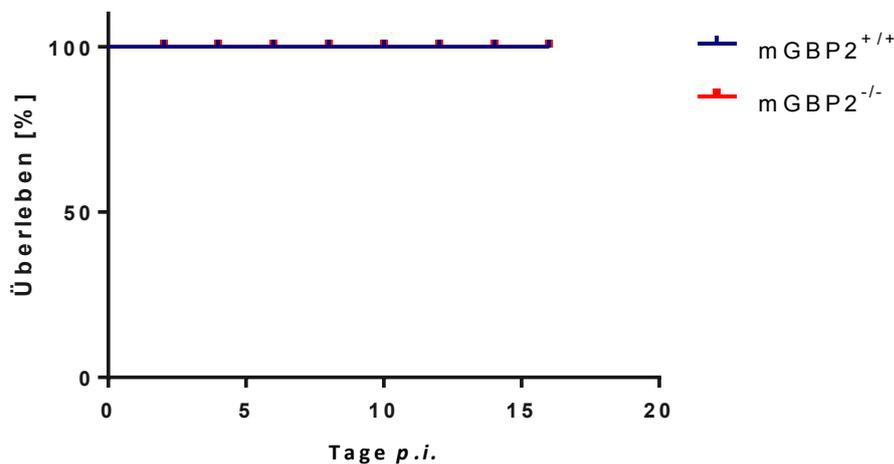
### 3.5.2 INFektion DER MGBP2-DEFIZIENTEN MAUSLINIE MIT DEM VESIKULÄREN STOMATITIS VIRUS (VSV)

Das Vesikuläre Stomatitis Virus wird in der immunbiologischen Forschung gerne und häufig als Modellorganismus verwendet, um eine retrovirale oder lentivirale Infektion zu simulieren (Simmons et al., 2006). Die Infektion mit VSV führt zu einer starken Induktion der T- Zell Antwort und einer intensiven Produktion von spezifischen Antikörpern durch B- Zellen (Bachmann et al., 1995; Shahinian et al., 1993). Die Infektionsversuche mit VSV wurden

durchgeführt, um zu untersuchen, ob einerseits die mGBP2 defiziente Mauslinie eine erhöhte Mortalität der vom immunkompetenten Wirt zu klärenden Infektion aufweist. Andererseits sollte analysiert werden, ob es durch das Fehlen von mGBP2 zu Veränderungen in der Produktion von Antikörpern kommt, was auf einen Defekt der B- Zell- Aktivierung durch CD4<sup>+</sup> Zellen hinweisen könnte (den Haan et al., 2014).

### 3.5.2.1 Bestimmung der Mortalitätsrate

Zur Bestimmung der Mortalitätsrate wurden Versuchstiere der C57BL/6, der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie und der mGBP2- defizienten Mauslinie mit  $2 \times 10^6$  pfu des Vesikulären Stomatitis Virus infiziert (Abb.3.50). Es wurden täglich Sichtkontrollen durchgeführt. Am Tag 15 wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkosemittel euthanasiert. Im Verlauf der Infektion konnten an den Versuchstieren leichte grippale Symptome, wie geringfügig verringerte Agilität oder Bewegungsdrang, beobachtet werden. Keine der beiden Mauslinien zeigte jedoch deutliche Krankheitssymptome.



**Abbildung 3.50: Mortalitätsrate von mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen bei einer Infektion mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV.** Die Tiere wurden 7 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimation in den Infektionsraum der ZETT bestellt. Am Infektionstag wurden die Tiere mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV i.v. infiziert. Es wurden tägliche Sichtkontrollen durchgeführt. Das Experiment wurde an Tag 20 p.i. beendet und die überlebenden Tiere euthanasiert.

Am Ende des Experiments zeigte sich, dass alle Versuchstiere die Infektion unbeschadet überstanden (Abb. 3.50). Die in den ersten Tagen der Infektion zu beobachtenden, leichten Symptome waren nicht mehr vorhanden. Es konnte also gezeigt werden, dass die Infektion

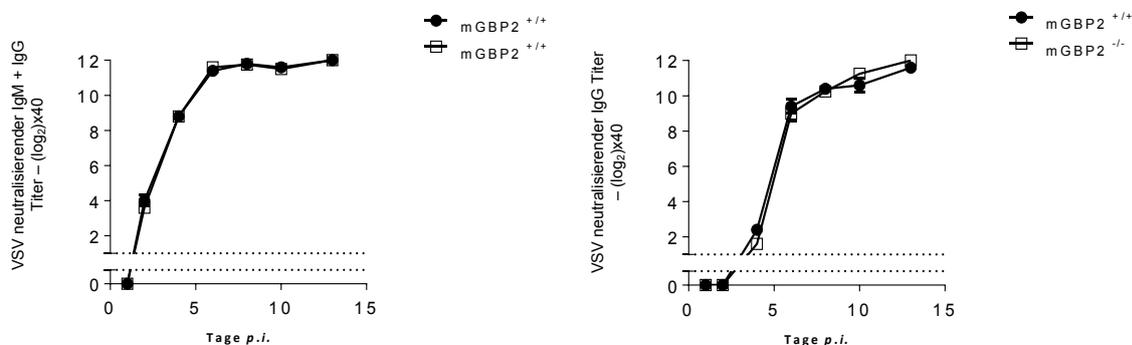
mit VSV auch in der mGBP2 defizienten Mauslinie zu keiner Mortalität führte, und demnach die Immunreaktion in dieser Mauslinie gegen das VS Virus in einem mit mGBP2<sup>+/+</sup> vergleichbaren Maße erfolgreich gewesen ist.

### 3.5.2.2 Neutralisierende Antikörper

Um zu untersuchen ob es im Verlauf einer VSV Infektion in der mGBP2- defizienten Mauslinie zu einer veränderten oder inhibierten Immunreaktion kommt, welche nicht, wie gezeigt werden konnte, final in einer erhöhten Mortalitätsrate mündet, wurde ein Neutralisationstest (*neutralizing antibody assay*) durchgeführt. Dieses Experiment erlaubt die Analyse der Produktion von VSV- spezifischen Antikörpern durch B- Zellen. Da die korrekte Funktionalität der CD4<sup>+</sup> T Zellen eine Voraussetzung für eine potente Antikörper- Sezernierung durch B- Zellen ist (Janeway, 2009), lässt das Ergebnis des Versuchs gleichzeitig einen Rückschluss auf die Funktionalität der CD4<sup>+</sup> T- Lymphozyten zu.

Den Versuchstieren wurde an den Experimentiertagen 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 13 p.i. Blut entnommen und das Serum isoliert. Es wurden diese Versuchszeitpunkte ausgewählt da die initiale Antikörperproduktion besonders aussagekräftig ist, und daher hier am ehesten ein messbarer Unterschied zwischen beiden Mauslinien nachzuweisen wäre.

An den ersten beiden Versuchstagen konnten noch keine neutralisierenden Antikörper gemessen werden (Abb.3.51).



**Abbildung 3.51: Neutralisierende Antikörper von VSV infizierten mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 2x10<sup>6</sup> pfu.** Die Tiere wurden 7 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimation in den Infektionsraum der ZETT bestellt. Am Infektionstag wurden die Tiere mit 2x10<sup>6</sup> pfu VSV i.v. infiziert. Den Versuchstieren wurde an den jeweiligen Versuchstagen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde anschließend sofort zur Analyse verwendet. Der Versuch wurde dreimal individuell durchgeführt. Pro Mauslinie wurden 6 Tiere verwendet. Nach Versuchsende an Tag 20 wurden die Tiere euthanasiert.

An den Versuchstagen 4 bis 8 p.i. war eine sehr stark ansteigende Menge der IgG sowie der IgG+IgM Titer zu beobachten (Abb.3.51). Die Werte von Tag 10 bis zum Versuchsende erreichten ein Plateau.

Somit konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass es in der mGBP2- defizienten Mauslinie eine potente Sezernierung von VSV- neutralisierenden Antikörper gab, da keine Unterschiede zwischen den Mauslinien detektiert werden konnten. Somit kann der Schluss gezogen werden, dass die Produktion der Antikörper durch die B- Zellen, sowie die Aktivierung der B- Zellen durch die CD4<sup>+</sup> T- Zellen in Folge der Abwesenheit von mGBP2 in einer VSV- Infektion nicht beeinträchtigt ist. mGBP2 scheint demnach keine essentielle Rolle in der Immunantwort gegenüber VSV inne zu haben.

## 4 DISKUSSION

Infektionen mit intrazellulären Pathogenen gehören weltweit zu den größten Gefahren denen sich die Menschen ausgesetzt sehen (Yarovinsky, 2014). Sie sind eine besondere Herausforderung für das Immunsystem, da sie - auf die eine oder andere Art - in der Lage sind, ihr Eindringen zu verschleiern und somit nicht direkt von diesem erkannt werden können. Speziell der Parasit *Toxoplasma gondii* ist durch seine für die Apicomplexa charakteristische parasitophore Vakuole sehr gut vor dem Zugriff durch das Immunsystem geschützt. Darüber hinaus bedingen die hohe Replikationsrate und die Fähigkeit der lebenslangen Persistenz im befallenen Wirt die extrem hohe Durchseuchung des Menschen mit diesem Parasiten und stellen eine ständige Bedrohung dar (Tenter et al., 2000). Da der Erreger vor allem in immunsupprimierten Individuen zu lebensbedrohlichen Situationen führt, ist es wichtig, mehr über die Immunreaktion gegenüber *T.gondii* in Erfahrung zu bringen (Wang et al., 2017). Im Besonderen ist es essentiell zu verstehen, wie die einzelnen Akteure des Immunsystems zusammenhängen und kooperieren. Hier konnte in den letzten Jahren, von verschiedenen Arbeitsgruppen, den murinen Guanylat bindenden Proteinen (p65- GTPasen) eine entscheidende Bedeutung in der Immunantwort gegenüber *T.gondii* ME49 zugeordnet werden (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Kim et al., 2011; Meunier und Broz, 2016; Selleck et al., 2013; Yamamoto und Takeda, 2012). Im Fokus dieser Arbeit stand besonders das IFN $\gamma$ - abhängig induzierte mGBP2. Nachdem *in vitro* Experimente gezeigt hatten, dass es bei mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs im Vergleich zu mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs zu einer erhöhten Replikationsrate des Parasiten kommt und in Kollokalisationsversuchen nachgewiesen wurde, dass GFP-markiertes mGBP2 in hohem Maße zur PV rekrutiert und dort anlagert, wurde eine mGBP2 defiziente Mauslinie generiert (Degrandi et al., 2013). In den ersten Infektionsversuchen zeigte die mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie eine erhöhte Letalität und es konnte eine erhöhte Anzahl persistierender Zysten im Gehirn, im Vergleich zur mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie beobachtet werden (Degrandi et al., 2013). Aufgrund dieser ersten, vielversprechenden *in vivo* Versuche sollten in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Gens für die Immunantwort und die Konsequenzen der Absenz von mGBP2 in der Immunantwort gegen *T.gondii* ME49 tiefergehend analysiert werden.

#### 4.1 DIE ABWESENHEIT VON MGBP2 FÜHRT ZU ERHEBLICHEM ANSTIEG DER LETALITÄT NACH INFEKTION

Der in dieser Arbeit verwendete *T. gondii* Stamm des Typ II führt - im Gegensatz zu Stämmen des Typ I, wie beispielsweise der RH Stamm - in der routinemäßig verwendeten Labormaus C57BL/6 in der großen Mehrzahl der Experimente zu keiner erhöhten Mortalität (Etheridge et al., 2014; Zheng et al., 2013). Die Tiere überleben zunächst die akute Phase der Infektion mit den einhergehenden Grippe- ähnlichen Symptomen und treten dann in die chronische Phase der Infektion ein, die sich weitestgehend symptomlos zeigt. In dieser Phase bilden die Parasiten des Typs II lebenslänglich persistierende Zysten im Gehirn des Wirts. Die gezielte Deletion eines Gens oder dessen Produkts und die nach einer Infektion beobachtete Mortalitätsrate ermöglichen dabei indirekt den Hinweis auf die Bedeutung des Gens bzw. seines Produkts für das Funktionieren der Immunantwort. In der vorgelegten Dissertation, wurden Mäuse der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie mit 20 und 40 Zysten i.p. infiziert und Überlebenskurven ermittelt. IFN $\gamma$ R- KO Mäuse dienten als Vergleichstiere, um das Ausmaß der Immundefizienz in mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren zu beurteilen. Das Fehlen von IFN $\gamma$ - abhängigen Signalen führte, wie bereits gezeigt, bei beiden Infektionsdosen zur Mortalität aller Versuchstiere innerhalb der ersten 8 Tage nach Infektion (Suzuki et al., 1989; Suzuki et al., 1988). Somit sind die Infektiösität des verwendeten *T.gondii*- Stamms und die erfolgreiche Infektion nachgewiesen. Auch die Abwesenheit von mGBP2 bewirkte eine erhöhte Sterblichkeitsrate der betroffenen Versuchstiere (Abb. 3.1, 3.2). Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Infektionsdosen. Die Kohorte, welche mit 20 Zysten infiziert wurde, überlebte die akute Phase durchgängig. Jene Kohorte, welche mit 40 Zysten infiziert wurde, überlebte die akute Phase hingegen nicht und verstarb bis Tag 9 p.i. vollständig. Die Unterschiede in der Sterblichkeit des WT waren wesentlich geringer. Hier starben bei beiden Infektionsdosen lediglich 10% der Tiere ab dem 30. Tag nach Infektion. Daher kann die erhöhte Sterblichkeit der mGBP2<sup>-/-</sup> Tiere in der 40 Zysten- Infektion nicht damit erklärt werden, dass es sich um eine Überdosis handelt, da es sonst auch zu einem vermehrten Sterben der Wildtyp- Kontrolltiere gekommen wäre. Vielmehr scheint die mGBP2 defiziente Mauslinie bis zu einem gewissen Grad der Toxoplasmen- Last standhalten und somit die akute Phase der Infektion überleben zu können. Ab einem bestimmten Schwellenwert, welcher zwischen 20 und 40 Zysten liegen muss, hat die mGBP2<sup>-/-</sup> Maus jedoch einen solch gravierenden immunbiologischen Nachteil, dass er nicht mehr kompensiert werden kann. Des Weiteren lassen die Ergebnisse

die Schlussfolgerung zu, dass mGBP2 in der Immunantwort *in vivo* keine so zentrale Rolle zukommt, wie es beispielsweise bei  $\text{IFN}\gamma$  der Fall ist. Die Funktion von mGBP2 bei der Immunantwort scheint eher eine indirekt unterstützende zu sein. Diese These untermauern Erkenntnisse, wonach eine Überexpression von mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten zu einer erhöhten Zellproliferation führt und in Mäusen sogar in der Lage ist Tumore zu bilden (Gorbacheva et al., 2002). Das könnte darauf hindeuten, dass das Genprodukt durch eine wichtige Funktion in der Steuerung und der Kontrolle des Zellmetabolismus die intrazelluläre Immunantwort gegen *T.gondii* ME49 unterstützen kann. Hierbei scheint nicht die absolute Menge des Proteins von maßgeblicher Bedeutung zu sein, sondern eher der strategische Wert der jeweiligen GTPase. So konnte einerseits eine geringere Induktion von mGBP7 als mGBP2 nach Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  in ANA-1 Makrophagen gezeigt werden (Degrandi et al., 2007). Dennoch stellte sich in *in vivo* Experimenten heraus, dass die mGBP7 defiziente Mauslinie eine ähnlich hohe Sterblichkeit bei einer *T.gondii* ME49 Infektion aufweist wie die  $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$  Mauslinie (Daten AG Pfeffer/C. Beuter- Gunia, *unpubliziert*). Genau wie  $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$  Versuchstiere versterben mGBP7 defiziente Mäuse bereits bei der sehr niedrigen Infektion mit 10 Zysten *T.gondii* vollständig innerhalb von 10 Tagen (Daten AG Pfeffer/C. Beuter- Gunia, *unpubliziert*). Somit ist die Mortalitätsrate hier nicht dosisabhängig, im Gegensatz zur mGBP2- defizienten Mauslinie. Ein Vergleich der Mortalitätsraten der weiteren mGBPs, gestaltet sich schwierig, da ihre Bedeutung bei einer *in vivo Toxoplasma* Infektion unzulänglich bekannt ist und es bislang nur wenige *in vivo* Modelle hierfür gibt. Neben der mGBP2 defiziente Mauslinie sind lediglich die mGBP1<sup>-/-</sup> Mauslinie und die mGBP<sup>chr3-/-</sup> Mauslinie publiziert (Kim et al., 2011; Yamamoto et al., 2012). Hierbei zeigte sich, dass die Defizienz von mGBP1 zu einer erhöhten Sterblichkeit ab Tag 10 p.i. führt, wobei eine deutliche Dosisabhängigkeit erkennbar ist (Selleck et al., 2013). So hat mGBP1 ebenso eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *T.gondii*. Da der Verlust von mGBP2 jedoch insgesamt zu einer höheren Mortalität führt, scheint dieses Protein einen noch höheren Stellenwert inne zu haben. Die Nichtverfügbarkeit der auf Chromosom 3 kodierten mGBPs führt dazu, dass diese Mauslinie nicht in der Lage ist mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP 5 und mGBP7 zu exprimieren. Dieser Verlust von Genen führt bei den Versuchstieren innerhalb der akuten Phase der Infektion zum vollständigen Versterben (Yamamoto et al., 2012). Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der mGBPs innerhalb der Immunantwort gegen *T.gondii*. Jedoch lässt sich hieraus keinerlei Rückschluss auf eventuell vorhandene Beziehungen und Wirkungen der mGBPs untereinander ziehen. Daher wäre es, um diese im Gesamten besser zu verstehen

wichtig lediglich einzelne Gene beispielsweise mit CRISPR/Cas, aus dem Genom zu entfernen und den daraus resultierenden Effekt zu studieren.

### **4.2 STADIENKONVERSION IM 20 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL BEI MGBP2<sup>-/-</sup> MÄUSEN IST DEUTLICH MESSBAR**

Die Stadienkonversion bei *T.gondii* vom sich schnell teilenden Stadium der akuten Phase zum sich langsam teilenden Stadium der chronischen Phase stellt einen wichtigen Einschnitt innerhalb des Lebenszyklus des Parasiten dar (Bohne et al., 1994; Bohne et al., 1999; Dubey et al., 1970). Es wird angenommen, dass diese Konversion eine Stressantwort des Parasiten auf die einsetzende Immunantwort ist (Yano et al., 2002). Durch die Reduktion des eigenen Metabolismus, die Wanderung über die Blut- Hirn Schranke ins immunbiologisch schlecht erreichbare Gehirn oder in das Muskelgewebe und schließlich die Ausbildung einer Zystenwand ist der Parasit gut geschützt und in der Lage erfolgreich zu persistieren (Kim und Boothroyd, 2005; Weiss und Kim, 2000). Die Stadienkonversion selbst ist ein mehrere Tage andauernder Prozess, in welchem der Parasit seine Genexpression deutlich umstellt. Dies führt dazu, dass Tachyzoiten und Bradyzoiten anhand von spezifischen Oberflächenproteinen und Proteinen des Metabolismus voneinander differenziert werden können (Radke et al., 2005; Radke et al., 2003a). Eine beliebte Methode dazu ist die Markierung mittels spezifischer Antikörper in einem bildgebenden Verfahren, wie zum Beispiel der Konfokalmikroskopie (Ferguson, 2004; Paredes-Santos et al., 2016; Song et al., 2016). Um aber einen Überblick über die Situation *in vivo* im ganzen Organ zu erhalten, eignet sich die Beobachtung der spezifischen Genexpression eher. Vor allem das Tachyzoiten- spezifische Gen SAG-1 und das Bradyzoiten- spezifische Gen BAG-1 sind in der Literatur bereits länger als solche etabliert (Bohne et al., 1997; Mahittikorn et al., 2010; Selseleh et al., 2012; Velge-Roussel et al., 1994). Verhältnismäßig kurz als stadienspezifisch bekannt sind die Enolasen 1 (Bradyzoiten) und 2 (Tachyzoiten) (Ferguson et al., 2002; Kibe et al., 2005). Die zum Überprüfen der Funktionalität der Methode durchgeführte *in vitro* Stadienkonversion mit Hilfe der Applikation von SNP zum Kulturmedium erwies sich als sehr effizient (Bohne et al., 1994; Kirkman et al., 2001; Luder et al., 2003a). Bei Abwesenheit von SNP waren die Tachyzoiten spezifischen Gene SAG-1 und

ENO-2 deutlich messbar, während die Bradyzoiten spezifischen Gene, BAG-1 und ENO-1, kaum nachweisbar waren. Nach Zugabe von SNP verschob sich die Genexpression deutlich hin zu den Bradyzoiten-spezifischen Genen (Abb. 3.3). Es ließen sich jedoch auch noch die Tachyzoiten spezifischen Gene nachweisen. Dies war nicht unerwartet, da die Einleitung der Stadienkonversion durch SNP zwar sehr effektiv ist, sie aber keine vollständige Umwandlung aller Parasiten gewährleistet. Daher war das Auftreten von Tachyzoiten-spezifischen Transkripten in der Bradyzoiten - *in vitro* Kultur nachvollziehbar und erwartungsgemäß. Da mit diesen durchgeführten Versuchen nachgewiesen wurde, dass es möglich ist, mit Hilfe einer qPCR den Prozess der Stadienkonversion zu erfassen, wurden diese Messungen in das *in vivo* Modell übertragen.

Da zuvor durch *in vitro* Experimente eine höhere Replikation der Parasiten in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs nachgewiesen werden konnte (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2012), wurde vermutet, dass im *in vivo* Modell eine stark verminderte Immunreaktion abläuft, wodurch eventuell weniger Parasiten zur Einleitung der Stadienkonversion gedrängt werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass die Stadienkonversion lediglich im 20 Zysten- Infektionsmodell untersucht wurde. Da die Stadienkonversion zwischen Tag 10 und 14 nach Infektion einsetzt, ist ein etwaiges Auftreten der Stadienkonversion bei der mGBP2- defizienten Mauslinie im 40 Zysten Infektionsmodell aufgrund des extrem frühen, vollständigen Versterbens der Tiere bis Versuchstag 9 nach Infektion, nicht möglich bzw. aufgrund des Detektionslimits der qPCR nicht realistisch auszuwerten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Stadienkonversion mittels qPCR zeigten jedoch, dass die Stadienkonversion im Gehirn (Abb. 3.7) und in der Lunge (Abb. 3.5) der mGBP2 defizienten Mauslinie nachweisbar ist und in einem mit der mGBP2<sup>+/+</sup> Maus vergleichbaren Wert induziert wird. Da die Stadienkonversion durch immunologischen Druck, wie zum Beispiel Zytokinsekretion, Veränderung des pH- Werts oder NO ausgelöst wird (Bohne et al., 1994; Bohne et al., 1999; Radke et al., 2003b; Suzuki et al., 1989; Suzuki et al., 1988), wurde somit nachgewiesen, dass es trotz Nichtverfügbarkeit von mGBP2 innerhalb der Zellen zu einem ausreichenden intrazellulären Stress kommt, welcher den Parasiten nötigt die Stadienkonversion einzuleiten.

Betrachtet man außerdem den Verlauf der Infektion in Lunge und Gehirn auf DNA Basis, berücksichtigt man also die Gesamtzahl an Parasiten, so fällt auf, dass es auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mauslinien gab (Abb.3.4, 3.6). In der Lunge war an Tag 7 p.i. die Infektionslast im mGBP2<sup>-/-</sup> Modell leicht niedriger um dann an Tag 14 p.i. hö-

her als im mGBP2<sup>+/+</sup> Modell zu sein. Da die Standardabweichung bei den Messungen in diesem Organ jedoch verhältnismäßig hoch war, ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Solche geringen Unterschiede in der Infektionslast wirken sich somit offensichtlich nicht auf die gesamte Vitalität des Wirtsorganismus aus. An Tag 21 und 28 p.i. war die Lunge nur noch sehr geringfügig befallen und der Infektionsherd hatte sich in das Gehirn verlagert. Diese räumliche Veränderung der Mehrheit der Parasiten ist zu erwarten gewesen, da in der chronischen Phase der Infektion vermehrt Zysten im Gehirn gebildet werden (Dubey, 1988). Auch im Muskelgewebe kommt es zu einer Zystenbildung, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß. Daher wurde in diesen Experimenten von einer Analyse der Skelett- und Herzmuskulatur der Mäuse abgesehen. Im Gehirn kam es bei beiden Mauslinien zu sehr ähnlichen Werten der Toxoplasmenlast und es traten nur geringe Standardabweichungen auf (Abb.3.6). Aufgrund der bekanntermaßen geringeren Replikationsgeschwindigkeit von Bradyzoiten, und dem Wissen, dass bei Befall des Gehirns viele Toxoplasmen bereits intensiv Bradyzoiten-spezifische Gene exprimieren, sind diese geringen Unterschiede der Standardabweichung zu erwarten gewesen. Eine in der mGBP2 defizienten Mauslinie erhöhte Gesamtanzahl von Parasiten im Gehirn wäre ein Hinweis auf eine sich ausbreitende Meningoencephalitis oder eine Reaktivierung des Parasiten. Dies kann durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.

Insgesamt zeigte sich, dass die im Vorfeld gewonnenen *in vitro* Daten, wonach die Replikation von *T.gondii* in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs signifikant höher ist, nicht die *in vivo* Situation widerspiegelt. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Zum einen ist das *in vitro* Modell auf einen einzelnen Zelltyp begrenzt. *T.gondii* ist jedoch potentiell in der Lage in nahezu jede kernhaltige Zelle einzudringen und dort zu replizieren (Black und Boothroyd, 2000). So ist es gut möglich, dass aufgrund der Vielzahl der Zelltypen im *in vivo* Modell, wo jeweils ein gesamtes Organ mit vielen verschiedenen Zelltypen untersucht wird, eine verminderte Replikation, die nur in bestimmten Zelltypen auftritt, nicht exakt erfasst werden kann und daher kein signifikanter Unterschied in der Replikation nachweisbar ist. Hinzu kommt, dass die Versuchstiere der mGBP2- defizienten Mauslinie maßgeblich erst in der chronischen Phase der Infektion ab Tag 35 p.i. versterben (Abb. 3.1). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass die mGBP2<sup>-/-</sup> Maus weniger effizient in der Verhinderung der Reaktivierung von Zysten sein könnte. Der im Vorlauf der Arbeit durchgeführte Nachweis der signifikant erhöhten Zystenanzahl in der mGBP2 defizienten Mauslinie an Tag 30 p.i. deutet ebenso auf einen Defekt in der Bekämpfung von Zysten bzw. ihrer Vorläufer, den Bradyzoiten, hin (Degrandi et al., 2013). Die in derselben Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass sich der Parasit in mGBP2 defizienten Astrozyten zumin-

dest *in vitro* signifikant besser replizieren kann, unterstreicht die Wahrscheinlichkeit dieser Theorie.

Es wäre daher sehr interessant die Infektionslast von Versuchstieren über den Tag 28 p.i. hinaus zu analysieren. Gleichzeitig könnte man durch diese Versuche eine etwaige intensive Reaktivierung mit Hilfe der Stadien- spezifischen qPCR darstellen und eventuell quantifizieren. Für diese Versuche benötigt man jedoch aufgrund der hohen Mortalitätsrate in der chronischen Phase der Infektion eine große Anzahl Versuchstiere in vergleichbarem Alter und ausgewogenen Geschlechterverhältnis, welches eine große logistische Herausforderung darstellt und eine sehr große Anzahl Zuchtpaare erfordert.

### **4.3 ANALYSEN DER T- ZELL IMMUNANTWORT IN MGBP2<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Die T- Zell Immunantwort ist vor allem bei der Infektion mit intrazellulären Pathogenen von essentieller Bedeutung (Harty und Bevan, 1999). Die direkte Zerstörung der Wirtszellen durch CD8<sup>+</sup> T- Zellen sowie die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten und weiterer Immunzellen durch CD4<sup>+</sup> T- Zellen tragen in den meisten Infektionen zu einer effektiven Immunabwehr bei (Janeway, 2009). Auch für eine Infektion mit *T.gondii* ME49 ist eine potente T- Zell Antwort entscheidend (Denkers und Gazzinelli, 1998; Dupont et al., 2012). Daher wurde untersucht, ob es durch die Abwesenheit von mGBP2 hierbei zu Einschränkungen kommt.

#### **4.3.1 ANTIGENPRÄSENTATION VIA MHC I PRÄSENTATIONSWEG IST FUNKTIONAL IN MGBP2<sup>-/-</sup> MÄUSEN**

Die Antigenpräsentation über den MHC I Signalweg ist für die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T- Zellen von zentraler Bedeutung (Dzierszinski et al., 2007). Auf diesem Weg werden Antigene prozessiert und anschließend zytotoxischen T- Zellen präsentiert, die intrazellulären Ur-

sprungs bzw. im Zytosol anzutreffen sind und nicht durch Phagozytose aufgenommen wurden. Solch intrazelluläre Antigene stammen von zerstörten intrazellulären Pathogenen, welche zuvor in die Zellen eingedrungen sind. In den Überlegungen, die zu diesen Experimenten führten, wurde vermutet, dass durch eine, wie es im *in vitro* Modell gezeigt werden konnte, geringere Zerstörung der PV im mGBP2<sup>-/-</sup> Modell eine verringerte Menge intrazelluläres Antigen vorhanden ist und so die Präsentation via MHC I reduziert ist. Dies würde wiederum zu einer geringeren Menge *T.gondii* ME49 spezifischer CD8<sup>+</sup> T- Zellen führen und somit eine deutliche Immunsupprimierung darstellen, welche die erhöhte Mortalitätsrate in der chronischen Phase der 20 Zysten Infektion und der akuten Phase der 40 Zysten Infektion erklären könnte.

Die Untersuchungen im Durchflusszytometer zeigten, dass es im 20 Zysten - *in vivo*- Modell keinen signifikanten Unterschied zwischen mGBP2<sup>+/+</sup>- und mGBP2<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Anzahl der CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten gibt (Abb. 3.8). Darüber hinaus konnte bei der Analyse der spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zell- Antwort, mit Hilfe des *T.gondii* spezifischen MHC-I Pentamers, in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie ebenso eine mit der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie vergleichbare Anzahl *T. gondii* spezifischer CD8<sup>+</sup> T- Zellen festgestellt werden (Abb.3.11). Somit wurde gezeigt, dass es trotz Abwesenheit von mGBP2 zu einer Antigenpräsentation über den MHC I Signalweg kommt. Es konnte erwartungsgemäß vor allem an den Tagen 7 und 14 p.i. eine hohe Anzahl *T. gondii* spezifischer CD8<sup>+</sup> T- Zellen beobachtet werden, aber auch an den Tagen 21 und 28 waren sie noch deutlich nachweisbar. Es konnte somit gezeigt werden, dass es in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus zu keiner Reduktion der *T.gondii*- spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen durch eine geringere Antigenpräsentation in den ersten 28 Tagen nach Infektion kommt, was zu einer drastischen Reduktion der T- Zell Immunreaktion führen würde. Dies wird auch durch die zumindest bis zu diesem Zeitpunkt hohe Überlebensrate der Tiere bei einer 20 Zysten Infektion bestätigt. Möglich ist, dass das vorhandene Antigen effektiv präsentiert wird oder dass es im *in vivo* Modell nicht zu einer messbar geringeren Zerstörung der PV in der Zellmembran kommt. Welche dieser Optionen zutrifft, kann jedoch anhand dieser Experimente nicht abschließend entschieden werden. Es kann allerdings ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass es im späteren Verlauf der Infektion (nach Tag 28 p.i.), wo die Mortalitätsrate der Versuchstiere rapide ansteigt, einen gravierenden Defekt in der T- Zell basierten Immunantwort gibt. Dies könnte beispielsweise durch „Erschöpfung“ (*exhaustion*) der CD8<sup>+</sup> T- Zellen entstehen (Bhadra et al., 2013; Bhadra et al., 2011a; Bhadra et al., 2011b; Gigley et al., 2012).

Eine weitere Möglichkeit weshalb kein Unterschied zwischen der Anzahl spezifischer CD8<sup>+</sup> T- Zellen sichtbar wird, ist dass es sich eventuell um ein Epitop handelt, welches nicht von der Mehrheit der spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen erkannt wird. Da die Entdeckung dieses Epitops noch nicht allzu lange her ist und es daher erst wenige Analysen mit diesem durchgeführt wurden, kann dies durchaus zutreffen (Wilson et al., 2010). Insgesamt ist die Anzahl der bekannten *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell Epitope derzeit begrenzt. So ist es durchaus denkbar, dass durch die Entdeckung neuer immunogener und somit besserer Epitope es möglich wäre, hiermit neue Infektionsversuche durchzuführen, um dann eine veränderte Aussage zu treffen.

Die durchflusszytometrische Analyse der T- Zellen an Tag 7 p.i. im 40 Zysten Infektionsmodell zeigten, dass auch bei dieser höheren Infektionsdosis eine potente T- Zell Antwort entsteht (Abb. 3.9). Die Gesamtzellzahl von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zellen stiegen deutlich. Sie waren in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie leicht erhöht, zeigten jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren. Die Amplifikation der T- Zellen ist daher auch in diesem Infektionsmodell mit der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie vergleichbar und wurde durch die Abwesenheit von mGBP2 nicht beeinträchtigt. Betrachtet man die *T.gondii* spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zell Frequenzen, zeigt sich, dass auch bei Applikation dieser erhöhten Zystenanzahl in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie eine potente und spezifische CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort ausgelöst wurde (Abb. 3.12). Die Standardabweichung zeigte zwar, dass es Schwankungen in der CD8<sup>+</sup> T- Zell Menge zwischen den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen gab, insgesamt waren diese jedoch statistisch nicht signifikant. Es konnte also gezeigt werden, dass es im Infektionsmodell mit *T.gondii* ME49 keine dosisabhängigen Unterschiede in der T- Zell Immunantwort in Abhängigkeit von mGBP2 gibt.

### **4.3.2 ANTIGENPRÄSENTATION VIA MHC II IST FUNKTIONAL - CD4<sup>+</sup> T- ZELLEN SIND IN ABWESENHEIT VON MGBP2 FUNKTIONSFÄHIG**

Nachdem die Analyse der T- Lymphozyten zeigte, dass deren Anzahl durch die Abwesenheit von mGBP2 nicht beeinträchtigt war, lag es nahe zu untersuchen, ob möglicherweise die

Funktionalität beeinträchtigt war. Die Sekretion von IFN $\gamma$  wurde in dieser Arbeit als Maß für die Funktionsfähigkeit herangezogen. Ein Verlust oder eine deutliche Reduktion der Verfügbarkeit von IFN $\gamma$  aufgrund reduzierter Sekretion von CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T- Lymphozyten hätte einen drastischen Nachteil in der Bekämpfung der Infektion mit *T.gondii* ME49 zur Folge und würde die hohe Mortalitätsrate der mGBP2 $^{-/-}$  Mäuse erklären (Gigley et al., 2011; Pfefferkorn et al., 1986). Die Sekretion von Zytokinen im Allgemeinen und IFN $\gamma$  im Besonderen lässt sich sehr gut mittels des hier gewählten Verfahrens der intrazellulären Zytokinfärbung (ICS) durchführen (Grover et al., 2012; Washino et al., 2012). Hierbei reichert sich das Zytokin in restimulierten T- Zellen durch Zugabe eines Sekretionshemmers intrazellulär an und erreicht dadurch eine im Durchflusszytometer darstellbare Menge. Um in der Infektion von vornherein eine sehr starke Induktion der Immunantwort zu erreichen, wurde das 40 Zysten Infektionsmodell für diese Versuche ausgewählt. Die Analysen zeigten eine ebenso potente Sekretion von IFN $\gamma$  in CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T- Lymphozyten in der mGBP2 $^{-/-}$  wie in der mGBP $^{+/+}$  Mauslinie (Abb. 3.13). Hieraus kann daher geschlossen werden, dass die Antigenpräsentation mittels der Signalwege MHC I und MHC II in der mGBP2 $^{-/-}$  Mauslinie funktional sein muss. Bei einer deutlich verminderten Nutzung dieses Signalwegs wäre eine deutliche Reduktion des entstehenden intrazellulären IFN $\gamma$  die Folge. Da IFN $\gamma$  zu den bedeutendsten Zytokinen bei der Kontrolle einer *T.gondii* Infektion gehört, würde eine Reduktion der Sekretion zu einem Verlust der Kontrolle über die Replikation des Parasiten führen, und so die hohe Mortalitätsrate im 40 Zysten- Infektionsmodell erklären (Gazzinelli et al., 1991; Gazzinelli et al., 1994). Somit konnte hier nachgewiesen werden, dass die T- Zell Immunantwort, an Tag 7 nach Infektion, bei Abwesenheit von mGBP2 im gleichen Maße wie in der mGBP2 $^{+/+}$  Mauslinie funktionsfähig ist, da sich kein signifikanter Defekt in der Sekretion von IFN $\gamma$  zeigen ließ. Auch eine Überproduktion von IFN $\gamma$  ist bei einer *T.gondii* Infektion bereits beobachtet worden (Gavrilescu und Denkers, 2001; Mordue et al., 2001). Daher wäre es interessant nun die IFN $\gamma$  Produktion an den Tagen 8 und 9 nach Infektion zu analysieren und zu erfahren, ob sich hier nun unmittelbar vor dem Versterben der Tiere ein Verlust der Kontrolle über die IFN $\gamma$  Produktion ereignet. Aufgrund der extrem hohen Sterblichkeit der mGBP2 defizienten Mauslinie an diesen Versuchstagen wäre dies jedoch nur mit sehr hohen Versuchstierzahlen möglich.

Aufgrund der Tatsache, dass IFN $\gamma$  auch von anderen Zelltypen, als CD4 $^+$  - oder CD8 $^+$  - T- Zellen, wie beispielsweise NK Zellen, DCs oder Makrophagen produziert wird, wäre eine Analyse der Zytokin- Sekretion dieser Zellen ebenfalls zur vollständigen Untersuchung der Situation in der mGBP2- defizienten Mauslinie zu empfehlen (Goldszmid et al., 2012; Sturge und Yarovinsky, 2014). Auch hier wäre es wichtig, auf spätere Zeitpunkte nach der Infektion

zu achten, wenngleich dies aufgrund der sehr hohen Anzahl an Versuchstieren nur schwer zu realisieren wäre.

#### **4.4 DIE GENEXPRESSION VON PRO- UND ANTI-INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINEN WIRD IN DER MGBP2 DEFIZIENTEN MAUSLINIE STARK INDUZIERT**

Die Analyse des Genexpressionsprofils von weiteren Zytokinen und anderen in der Immunantwort wichtigen Effektormolekülen lässt einen Einblick in den immunologischen Status des infizierten Tieres zu (Aviles et al., 2008; Fischer et al., 1997). Kommt es hier zu gravierenden Veränderungen, so kann dies weitreichende Folgen für die Überlebensfähigkeit in Bezug auf die jeweilige Erkrankung haben. Eine Deregulation der Genexpression von beispielsweise  $\text{IFN}\gamma$  oder  $\text{TNF}\alpha$  führt bei einer Infektion mit *T.gondii* ME49 zu einer vollständigen Mortalität innerhalb der akuten Phase der Infektion. Selbst bei der Applikation einer sehr geringen Dosis Zysten, wie 10 Zysten, ist das der Fall (Gazzinelli et al., 1996; Scharton-Kersten et al., 1996). Um die Auswirkungen der Abwesenheit von mGBP2 *in vivo* näher zu charakterisieren und besser zu verstehen, war daher die Analyse der Genexpression mittels qPCR von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, sowie anderen Effektormolekülen ein wichtiger Teil dieser Arbeit. Die Analyse der Genexpression wurde im 20 und im 40 Zysten Infektionsmodell durchgeführt.

Die Genexpression des wichtigsten Zytokins  $\text{IFN}\gamma$  im 20 Zysten Infektionsmodell zeigte sich in der mGBP2 defizienten Mauslinie ähnlich wie in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie. Betrachtet man jedoch die Genexpression anderer Zytokine, so fällt auf, dass partiell durchaus Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Mauslinien bestehen. So ist die IL12p40 Genexpression an Tag 7 p.i. in der Lunge erhöht, aber an Tag 28 p.i. niedriger als in der mGBP2<sup>+/+</sup> Maus. Eine Deregulation von IL12p40 hat zum Beispiel Einfluss auf mehrere STAT-1 abhängige Apoptose- Signalwege (Gavrilescu und Denkers, 2003). Daher kann eine Störung, vor allem an Tag 28 p.i. im Gehirn ein Hinweis auf eine geringer ausfallende Immunantwort im weiteren Verlauf der Infektion sein.

Betrachtet man beispielsweise die Genexpression von IL-1 $\beta$  in der Lunge, fällt auf, dass es an den Tagen 7 und 14 p.i. in der mGBP2- defizienten Mauslinie nur zu einer sehr geringen Genexpression kommt. Dies könnte ein Hinweis sein, dass es in der mGBP2- defizienten Mauslinie dort zeitlich begrenzt eine geringere Erkennung oder Zerstörung von intrazellulären Parasiten gibt und so eine geringere IL1 $\beta$  Produktion durch Monozyten stattfindet (Gov et al., 2013). Da sich die Unterschiede allerdings dann an den weiteren Versuchstagen ausgleichen und statistisch nicht signifikant sind, scheint dies nicht für die Erklärung des Phänotyps entscheidend zu sein. Betrachtet man jedoch die Analyse der Genexpression insgesamt, so fällt auf, dass die Versuchstiere der mGBP2- defizienten Mauslinie zwar keine deutlich signifikanten Unterschiede zur Genexpression der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie aufweisen, es kommt jedoch gehäuft zu einer niedrigeren Genexpression des jeweiligen Zytokins. So ist dies neben IL-1 $\beta$ , etwa bei der Genexpression von IL-4, Caspase 11, PD-1, TNF $\alpha$  und p47<sup>phox</sup> zu beobachten. Diese hier gemessene uneindeutige Veränderung der Immunantwort könnte zusammengekommen dennoch im weiteren Verlauf der Infektion zu irreparablen Organschäden, Nekrosen, einer Sepsis oder einer massiv erhöhten Replikation von Parasiten, z.B. durch Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T- Zellen, führen. Eine weitere mögliche Erklärung für dieses Szenario ist die Beobachtung, dass *T.gondii* in der Lage ist die intrazelluläre Immunantwort, wie zum Beispiel durch Inhibition der Antigen- Präsentation via des MHC II Signalwegs (Luder et al., 2003b) und die aktive Modulation der intrazellulären Immunantwort durch Sezernierung von Rhopty Proteinen zu beeinflussen. Diese Rhopty Proteine werden vom Parasiten nach der Invasion in die Zellmembran ins Zytosol sezerniert und sind in der Lage in den Zellkern der Wirtszelle zu gelangen, um dort Transkriptionsprozesse zu beeinflussen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Proteine auch für die Unterschiede in der Virulenz der Toxoplasma- Stämme verantwortlich sind (Niedelman et al., 2012). Zumeist handelt es sich um Kinasen, die in der Lage sind Proteine, wie zum Beispiel STAT6 zu Phosphorylieren oder zu Dephosphorylieren und sie, bzw. den jeweiligen Signalweg, somit zu aktivieren oder zu deaktivieren (Butcher et al., 2011; El Hajj et al., 2006). Die Beobachtungen, dass ROP18 und ROP5 in der Lage sind mit IRGs zu interagieren und sie durch Phosphorylierung zu deaktivieren (Etheridge et al., 2014; Fentress und Sibley, 2011) legt den Schluss nahe, dass auch andere Rhopty- Proteine mit mGBP2 interagieren könnten. Daher könnte die Abwesenheit von mGBP2 dem Parasiten entscheidend erleichtern die intrazelluläre Immunantwort zu reduzieren, somit sich effizienter zu vermehren und Zysten zu bilden.

Neben der Analyse der Genexpression ist es wichtig, zu analysieren, ob mGBP2 eventuell Einfluss auf Prozesse nimmt, die zur Sezernierung von Zytokinen und Effektormolekülen,

beitragen. Dies konnte am besten mit dem Verfahren des ELISA durchgeführt werden. Da jedoch auch bei IFN $\gamma$  und IL12p40 im ELISA keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mauslinien verzeichnet wurden, gibt es in der mGBP2- defizienten Mauslinie, zumindest bei diesen beiden, in dieser Infektion essentiellen, Zytokine keine Unterschiede. Somit ist es unwahrscheinlich, dass sich das Fehlen von mGBP2 auf die posttranskriptionellen Prozesse direkt auswirkt.

Aufgrund der Experimente zur Genexpression und der immunrelevanten Proteine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ist es denkbar, dass durch eine gewisse Verringerung der intrazellulären Immunantwort, welche durch die Abwesenheit von mGBP2 hervorgerufen wird, der Parasit in der Lage ist sich bis Tag 30 p.i. effizienter im Wirt zu replizieren. Hierbei ist das Immunsystem aufgrund der nicht zu hohen Infektionslast noch in der Lage die akute Phase und den Beginn der chronischen Phase der Infektion zu überstehen. Da durch diese *in vivo* nur geringfügig auftretende und messbare Reduktion der Immunantwort eine signifikant höhere Anzahl an Zysten in der mGBP2 defizienten Mauslinie entsteht, ist das Immunsystem ab einer nur schlecht zu bestimmenden Menge sich gleichzeitig oder in kurzer Reihenfolge reaktivierenden Zysten nicht mehr in der Lage die Infektion erfolgreich zu bekämpfen. Dies führt dann zu der beobachteten Mortalität bei den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen.

Nach der Infektion mit 40 Zysten war, im Gegensatz zum 20 Zysten- Infektionsmodell, bei der mGBP2 defizienten Mauslinie eine erhöhte Mortalitätsrate in der akuten Phase der Infektion zu beobachten (Abb.3.2). Mit Hilfe dieser erhöhten Infektionsdosis sollte untersucht werden, ob die Immunantwort durch diese in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie überhaupt eine deutlich Immunantwort generiert wird oder sie im Vergleich der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie signifikant erhöht ist. Auch hier wurde die Genexpression vorzugsweise in der Lunge und im Gehirn ausgewertet, da diese Organe nach einer intraperitonealen Applikation der Zysten die Hauptinfektionslast tragen (Di Cristina et al., 2008; Zenner et al., 1998; Zenner et al., 1999). Eine Infektion der Leber oder der Niere fällt deutlich geringer aus. Daher wurden die größten Unterschiede in den massiv befallenen Organen vermutet. Die Analyse der Genexpression zeigte auch hier eine deutliche Induktion der gemessenen immunrelevanten Zytokine und Effektor-moleküle in den mGBP2- defizienten Mäusen an Tag 7 p.i.. Es konnte also trotz einer fast vollständigen Mortalität an den Tagen 8 und 9 p.i nahezu keine signifikanten Unterschiede in der Immunantwort auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden. Es war jedoch zu beobachten, dass es vor allem im Gehirn der mGBP2- defizienten Mauslinie sehr häufig zu einer

tendenziell geringeren Genexpression der Effektormoleküle kommt. So ist es beispielsweise bei  $\text{IFN}\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6 oder PD-1 der Fall (Abb.3.30- 3-35). Da jedoch die Standardabweichung der Messwerte in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie zum Teil recht hoch war, fallen die Ergebnisse, wenngleich knapp, als statistisch nicht signifikant aus. Die Tendenz zur verringerten Genexpression und einer damit einhergehenden geringeren Immunabwehr gegen den Parasiten scheint sich demnach auch im 40 Zysten Infektionsmodell zu bestätigen. Die erhöhte Mortalitätsrate in der akuten Infektionsphase der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus kann dennoch nicht unmittelbar mit Hilfe dieser verringerten Immunantwort abschließend erklärt werden. Da die Genexpression der Zytokine im Gehirn der mGBP2<sup>-/-</sup> Versuchstiere jedoch kollektiv etwas verringert war, könnte dies insgesamt einen negativen Einfluss auf ihren Immunstatus haben.

Neben diesen leichten Verringerungen der Expression von Zytokinen konnten jedoch in der mGBP2 defizienten Mauslinie in der 40 Zysten Infektion auch signifikant defizitäre Expressionen anderer Gene nachgewiesen werden. Die in der mGBP2 defizienten Mauslinie nachgewiesene drastische Reduktion der Genexpression von TLR11 gibt einen Hinweis auf eine tatsächlich reduzierte Erkennung von *T.gondii* (Abb. 3.43). Diesem Toll- ähnlichen Rezeptor konnte die Erkennung von Flagellin und Profilin protozoischen Ursprungs zugeordnet werden (Raetz et al., 2013; Yarovinsky et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). Da TLR11 über den MyD88 Signalweg reguliert, sollte dies eigentlich zu einer verringerten Signalweiterleitung durch den MyD88 Signalweg führen, was wiederum zu einer geringeren Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{IFN}\gamma$ , IL12 oder TNF $\alpha$  führen sollte (Hatai et al., 2016; Raetz et al., 2013). Dieser direkte Zusammenhang konnte jedoch hier nicht festgestellt werden. Es muss daher kompensatorische Signalwege geben, die auch in der mGBP2 defizienten Mauslinie, zumindest zu diesem Zeitpunkt der Infektion, zu einer ausreichenden Genexpression dieser wichtigen Zytokine führt. Da jedoch für TLR11 auch festgestellt werden konnte, dass TLR11 bei der Infektion von Astrozyten, Gliazellen und Neuronen hochreguliert wird, könnte die Verringerung der Genexpression von TLR11 eine deutliche Verringerung der Immunantwort für die mGBP2 defiziente Mauslinie nach sich ziehen (Atmaca et al., 2014).

Auch die Genexpression von TLR 12 war im Gehirn und der Lunge der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie signifikant verringert (Abb.3.44). Da gezeigt werden konnte, dass TLR 12 bei einer *T. gondii* Infektion essentiell ist und die Abwesenheit zu einer noch höheren und früher einsetzenden Mortalität führt als TLR11, könnte die drastisch reduzierte Genexpression dieses TLRs eine noch größere Bedeutung in der Entstehung der hohen Mortalitätsrate im weiteren Infektionsverlauf des 40 Zysten- Infektionsmodell haben, als TLR 11 (Andrade et al., 2013; Koblansky

et al., 2013). Dennoch muss auch hier betont werden, dass die Signalweiterleitung über den MyD88 Signalweg stattfindet (Kawasaki und Kawai, 2014) und die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine sich zu diesem Zeitpunkt als nicht signifikant reduziert zeigte. Da es jedoch zumindest in der 40 Zysten Infektion insgesamt eine Tendenz zur Reduktion der Immunantwort gibt, ist es durchaus denkbar, dass diese durch die geringere Genexpression von TLR11 bzw. 12 ausgelöst wird (Lee et al., 2013). Somit könnte man als Hypothese formulieren, dass es aufgrund dessen zu einer insgesamt reduzierten Immunantwort kommt, die die hohe Infektionslast, welche eine 40 Zysten *T.gondii* ME49 Infektion mit sich bringt, nicht ausreichend bekämpfen kann. Hierdurch könnten dann eine starke Enzephalitis mit großen Bereichen nekrotischen Gewebes oder eine Sepsis entstehen, welche als Todesursache postuliert werden könnten. Da bei der Präparation der Versuchstiere augenscheinlich jedoch keine großen Nekrosen festgestellt werden konnten, würde es sich anbieten durch lichtmikroskopische Färbungen, wie der TUNEL- Färbung, welche eine direkte Färbung apoptotischen Gewebes ermöglicht, um das Auftreten von Gewebetypen genauer zu quantifizieren. Des Weiteren wäre es sinnvoll, Gewebefärbungen anzufertigen und im Elektronenmikroskop auszuwerten, um herauszufinden, ob es eventuell durch die Abwesenheit von mGBP2 zu Veränderungen an der PV kommt. Dies könnte sich zum Beispiel durch eine veränderte Struktur der Mikrotubuli, oder durch die vermehrte Anlagerung von anderen GBPs die zur PV rekrutieren, darstellen. Dies würde einen weiteren Hinweis auf die Funktion von mGBP2 *in vivo* geben und somit mutmaßlich zum weiteren Verständnis der Immunantwort in der mGBP2 defizienten Mauslinie beitragen. Die Durchführung solcher *ex vivo* TEM- Färbungen ist jedoch mit enormen technischem Aufwand und Gerätschaften und entsprechendem Personal in der Bedienung verbunden, welche für die vorliegende Arbeit leider nicht zur Verfügung standen.

Da neueste Untersuchungen innerhalb der mGBPs ein hohes Maß an Interaktion, wie beispielsweise das Ausbilden von Clustern und Homo- bzw. Heterodimeren, zeigen konnten (Kravets et al., 2016), ist es interessant, anhand der Analyse der Genexpression der restlichen mGBPs, welche in der mGBP2 defizienten Mauslinie korrekt exprimiert werden, zu kontrollieren, ob durch die Abwesenheit dieses GBPs die Genexpression anderer GBPs beeinflusst wird. Hierdurch es möglich einen Einblick in das Zusammenwirken der mGBPs *in vivo* zu erlangen (Kravets et al., 2016; Kresse et al., 2008).

Die Analysen der Genexpression der GTPasen mGBP1, mGBP5 und mGBP7 zeigten jedoch in beiden Infektionsmodellen allesamt eine starke Induktion in der mGBP2 defizienten Mauslinie. Es scheint demnach keine dosisabhängige Induktion der hier gemessenen GBPs vorzu-

liegen. Die Menge der relativen Genexpression von mGBP5 und 7 zeigt sich im 20 und 40 Zysten Infektionsmodell dazu vergleichbar mit der Genexpression der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie. Somit wurde gezeigt, dass die Absenz von mGBP2 sich nicht unmittelbar auf die Genexpression von anderen GBPs auswirkt. Es scheint daher keine, durch das Fehlen des Gens greifende, kompensatorische Signalkaskaden zu geben, die die Transkription der anderen GBPs beeinflusst bzw. verändert. Die Genexpression von mGBP1 hingegen ist in der mGBP2 defizienten Mauslinie in der 20 und 40 Zysten Infektion um das 10 bis 15- fache erhöht. Nun könnte man annehmen, dass mGBP1 kompensatorisch wirkt, oder es eine Art Rückkopplung zwischen der Genexpression von mGBP1 und mGBP2 existiert und daher die Genexpression bei einer Abwesenheit von mGBP2 hochreguliert wird. Dies scheint auf den ersten Blick durchaus möglich. Betrachtet man jedoch das genetische Konstrukt genauer, welches künstlich in die damit mGBP2 defiziente Mauslinie integriert wurde, fällt auf, dass es sich hierbei um genomische DNA- Abschnitte handelt, die einer anderen Mauslinie entspringen. Die mGBP2-defiziente Mauslinie hat den genetischen Hintergrund der C57BL/6 Maus. Die integrierten Gene stammen jedoch von der Mauslinie 129/Ola, da die embryonalen Stammzellen, die zur Herstellung mGBP2- defizienter Mauslinien verwendet wurden, aus dieser Linie entstammen. Von der Mauslinie ist bekannt, dass standardmäßig mGBP1 eine hohe Expression aufweist. Da die Gene *mgbp2* und *mgbp1* sehr nahe zueinander im Genom liegen, ist bei einer Rückkreuzung der mGBP2 Mauslinie mit C57BL/6 ein crossing- over Ereignis zwischen diesen Genloci sehr unwahrscheinlich. Es ist daher denkbar und wahrscheinlich, dass der *mgbp1* Locus der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie aus der 129/Ola Mauslinie stammt. Somit ist es wahrscheinlicher, dass es sich hier um ein Artefakt handelt, als um einen tatsächlichen Unterschied in der Genexpression bei einer Infektion mit *T.gondii*. Dennoch ist es interessant und wichtig die Zusammenhänge und das Zusammenwirken der verschiedenen GBPs näher verstehen zu wollen und damit erklären zu können.

Trotz der relativ langen Zeit in der die Existenz von GBPs bekannt ist, sind die Funktionen und das Zusammenwirken der GBPs in einer Infektion mit *T.gondii* noch nicht ausreichend verstanden. In dieser Dissertation ist mittels der hier durchgeführten Arbeiten und Experimente eine ausführliche Analyse der Immunantwort der mGBP2 defizienten Mauslinie gegenüber *Toxoplasma gondii* entstanden.

## 4.5 mGBP2 IST NICHT ESSENTIELL IN DER IMMUNABWEHR GEGEN LCMV UND VSV

Die Immunantwort gegen Viren unterscheidet sich meistens von der gegen Bakterien oder intrazelluläre Pathogene. Während diese bei Letzteren meist auf das intensive Auslösen IFN $\gamma$ -abhängiger Signalkaskaden beruht, so werden bei viralen Eindringlingen meist INF $\beta$ -abhängige Signale induziert (Le Page et al., 2000). Dennoch gibt es auch große Gemeinsamkeiten. Um die Rolle von mGBP2 in der Immunantwort bei anderen Pathogenen zu untersuchen, wurde das Infektionsmodell mit LCMV und VSV ausgewählt.

Eine effektive Immunabwehr bei der Bekämpfung von LCMV basiert auf eine „potente“ CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort. Es wurde vermutet - vorausgesetzt mGBP2 ist ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr gegenüber LCMV - dass es aufgrund einer geringeren intrazellulären Erkennung von Viruspartikeln zu einer höheren Replikationsrate des Virus in der mGBP2 defizienten Mauslinie kommen könnte. Diese verringerte intrazelluläre Erkennung von Viruspartikeln und die damit einhergehende verringerte Präsentation über den MHC I Signalweg, würde zu einer Verringerung der LCMV- spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen führen. Da die spezifische CD8<sup>+</sup> T- Zell- Antwort bei einer LCMV- Infektion essentiell ist, könnte dies einen negativen Verlauf der Infektion, bis hin zur Mortalität, für die mGBPs- defiziente Mauslinie zur Folge haben (De Boer et al., 2001; Fung-Leung et al., 1991). Um dosisabhängige Unterschiede analysieren zu können, wurden die Versuchstiere direkt mit drei unterschiedlichen Infektionsdosen infiziert. Es zeigte sich, dass der Titer in den gemessenen Organen Lunge, Milz und Niere in beiden Genotypen vergleichbare Werte erreichte (Abb.3.48). Somit konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von mGBP2 die Replikationsrate von LCMV nicht beeinflusst. Daher scheint es wahrscheinlich, dass mGBP2 nicht direkt mit Viruspartikeln interagiert und des Weiteren nicht an der Verarbeitung derselben entscheidend beteiligt ist. Hierauf deuten auch die durchflusszytometrisch erlangten Ergebnisse mittels spezifischen Tetrameren, die die CD8<sup>+</sup> - und CD4<sup>+</sup> - T- Zell- Antwort messen, hin (De Boer et al., 2003; Masopust et al., 2007; Murali-Krishna et al., 1998). Das gp33- Peptid ist bei einer LCMV Infektion das am häufigsten präsentierte Epitop (Gallimore et al., 1998). Falls es einen Defekt in der Präsentation von Antigenen via des MHC I Signalwegs in der mGBP2- defizienten Mauslinie geben würde, wäre dieser Unterschied deutlich messbar. In der 9000 und 3000 pfu Infektionsdosis scheint es zunächst sogar eine Erhöhung dieser spezifischen CD8<sup>+</sup> T- Zellen in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie zu geben (Abb.3.49). Dies würde bedeuten, es käme in der mGBP2 defizienten Mauslinie

zu einer erhöhten Erkennung von Viruspartikeln und der anschließenden Präsentation deren Antigene via des MHC I Signalwegs. Dies bestätigte sich leider in der 1000 pfu Infektionsdosis nicht. Auch die CD4<sup>+</sup> T- Zellen Antwort konnte mittels eines Tetramers (gp61) gemessen werden (Fuller und Zajac, 2003; van Leeuwen et al., 2009). Die Induktion dieser T- Lymphozyten war ebenfalls durch die Abwesenheit von mGBP2 nicht verändert (Abb.3.49). Dies zeugt davon, dass sich in der mGBP2- defizienten Mauslinie scheinbar kein Unterschied in der Präsentation der Antigene via des MHC II Signalwegs manifestiert hat. Somit scheint die Abwesenheit von mGBP2 keinen negativen Einfluss auf die Erkennung von Viruspartikeln intra- oder extrazellulärem Ursprungs zu haben.

Um neben der Erfassung der Anzahl von CD8<sup>+</sup> T- Zellen auch eine Aussage über die Funktionalität der T- Zellen machen zu können, wurde mittels ICS die IFN $\gamma$  Sekretion in der mGBP2- defizienten Mauslinie nachgewiesen. Im 9000 pfu- Infektionsmodell zeigte sich die Sekretion in den beiden Genotypen nahezu identisch (Abb.3.45). Im 3000 pfu Infektionsmodell konnte in der mGBP2 defizienten Mauslinie, jeweils im Vergleich zur mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie, eine niedrigere und im 1000 pfu Infektionsmodell eine erhöhte Anzahl gp33 reaktiver, IFN $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup> T- Zellen nachgewiesen werden. Da die Werte im 9000 pfu Infektionsmodell wieder ausgeglichen waren, handelt es sich hier um, wenngleich recht große, statistische Varianzen. Insgesamt konnte somit in der mGBP2 defizienten Mauslinie eine funktionsfähige IFN $\gamma$  Sezernierung festgestellt werden. Diese Untersuchungen der mGBP2 defizienten Mauslinie im LCMV- Infektionsmodell zeigen insgesamt, dass mGBP2 keine essentielle Rolle in der Immunantwort, hinsichtlich Replikation des Virus oder der unmittelbaren zellulären Reaktion des Immunsystems, innehat.

Um das Infektionsportfolio der mGBP2- defizienten Mauslinie weiter zu vergrößern und in der mGBP2 defizienten Mauslinie erstmalig zu untersuchen, ob die Immunantwort im Zuge bei einer VSV Infektion beeinträchtigt oder verändert ist, wurden die Versuchstiere (mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup>) mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV infiziert. Da VSV durch einen immunkompetenten Wirt vollständig geklärt werden kann, kommt es nur bei erheblichen Beeinträchtigungen der Immunantwort, wie zum Beispiel einer Depletion der CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T- Zellen, zu einer erhöhten Mortalität (Huneycutt et al., 1993). Auch ist die Immunantwort auf die Infektion mit VSV interessant, da hier die Signalübertragung via TLR abhängiges MyD88 (Lang et al., 2007) wichtig ist und in der mGBP2 defizienten Mauslinie eine geringere TLR 11 und 12 Expression gezeigt werden konnte. Dies war bei der mGBP2 defizienten Mauslinie jedoch nicht der Fall und eine Mortalität blieb, wie auch in der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie nach VSV- In-

fektion, aus (Abb.3.51). So konnten bei der täglichen Sichtkontrolle keine auffälligen Unterschiede im Verhalten oder Aussehen, wie etwa Gewichtsabnahme oder struppiges Fell, der Mäuse festgestellt werden. Da die Immunantwort bei der VSV Infektion zum großen Teil auf eine potente Antikörper Produktion und einer funktionellen CD4<sup>+</sup> T- Zell Antwort basiert, wurde ein „Neutralisierender Antikörper Assay“ durchgeführt (Christian et al., 1996; Gobet et al., 1988). Für beide Messungen (IgM+IgG und IgG) konnte ab dem 4. Tag p.i. ein deutlicher Anstieg der VSV- spezifischen AK nachgewiesen werden (Abb.3.51). Nach 6 Tagen blieb die Konzentration der AKs auf einem konstant hohen Niveau. Somit wurde nachgewiesen, dass es in der mGBP2- defizienten Mauslinie bei einer VSV Infektion zu einer potenten AK Bildung kommt, welche es der Mauslinie erlaubt die Pathogene erfolgreich zu bekämpfen. Es kann dem zu Folge davon ausgegangen werden, dass mGBP2 in diesem Virus- Infektionsmodell, keine essentielle Funktion in der Immunantwort übernimmt. Da hier bisher jedoch nur ein kleiner Bereich der Immunantwort gegenüber diesem Virus untersucht wurde, ist auch nicht auszuschließen, dass andere Proteine die Funktion von mGBP2 übernehmen und somit die zellulären Prozesse die letztendlich zur erfolgreichen Bekämpfung führen, durch das Fehlen dennoch verändert sind. Dies müsste jedoch in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden.

Anhand der vorgestellten Analysen konnte also gezeigt werden, dass mGBP2 in der Immunantwort gegenüber LCMV und VSV keine wichtigen oder gar essentiellen Funktionen besitzt. Dennoch ist es durchaus denkbar, dass mGBP2 bei anderen Viren eine wichtigere Rolle einnimmt. mGBP2 hat neben dem direkten Kontakt mit Pathogenen oder pathogen-assoziierten Membranen, wie es bei der PV von *T.gondii* der Fall ist, auch Aufgaben die Einfluss auf den Zellzyklus nehmen (Balasubramanian et al., 2011; Gorbacheva et al., 2002; Messmer-Blust et al., 2010). Daher ist es durchaus denkbar und wahrscheinlich, dass das Fehlen von mGBP2 eine Veränderung der Immunantwort gegenüber anderen Viren als LCMV oder VSV für den Organismus zur Folge haben kann. So könnte eine Beschleunigung des Zellzyklus beispielsweise die Zeit, welche der Virus zur Replikation benötigt, verringern. Dies könnte dann in einer niedrigeren Replikationsrate des Virus resultieren. Daher ist es sehr interessant und wichtig weitere Infektionsmodelle mit der mGBP2 defizienten Mauslinie mit den unterschiedlichsten Viren zu betrachten und auszuwerten.

## 5 AUSBLICK

Die durchgeführte Analyse der Immunantwort in der mGBP2 defizienten Mauslinie zeigte, dass dieses mGBP eine wichtige Funktion in der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen hat. Um die Bedeutung von mGBP2 im Organismus näher zu determinieren sind weiterführende Arbeiten nötig. Es hat sich gezeigt, dass in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie trotz einer hohen Mortalitätsrate in der Genexpression von vielen Zytokinen und der T-Lymphozytären Immunantwort keine signifikanten Unterschiede bestehen. Um in weiteren Versuchen die Bedeutung von mGBP2 aufzuklären wäre es interessant, wie bereits beschrieben, durch elektronenmikroskopische Analysen die Struktur der parasitophoren Vakuole in der mGBP2- defizienten Mauslinie *ex vivo* zu betrachten. Hierbei könnten Antikörper eingesetzt werden, welche die Parasiten direkt markieren oder nur die äußeren Strukturen der PV sichtbar machen. Anhand dessen könnte man nun untersuchen, ob es in der mGBP2- defizienten Maus zu einer unterschiedlichen Anlagerung von Proteinen an die PV kommt. Hier wäre es zum Beispiel vorstellbar, dass andere mGBPs oder Effektormoleküle, bei denen sich zwar auf der Genexpressionsebene kein Unterschied nachweisen ließ, in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus die Aufgabe von mGBP2 übernehmen. Zugleich wäre es wichtig zu erfahren, ob und wie sich das Sekretionsmuster des Parasiten in der mGBP2 defizienten Mauslinie ändert. Auch dies würde sich durch extensive elektronenmikroskopische Analysen wahrscheinlich aufklären lassen. Dies würde einen weiteren wichtigen Schritt zum besseren Verständnis der mGBPs bedeuten. Des Weiteren ist es zur erfolgreichen Messung der T- Zell Antwort wichtig herauszufinden, welche Epitope bei einer *T.gondii* Infektion die immunogensten sind. Es ist durchaus möglich, dass lediglich dadurch keine signifikanten Unterschiede in der *T.gondii* spezifischen T- Lymphozytären Immunantwort gezeigt werden konnten, weil das Epitop SVLAFRRL nicht das immundominante Epitop bei einer solchen Infektion ist und die Unterschiede dadurch als nicht signifikant erscheinen.

Des Weiteren wäre es interessant und wünschenswert die Analysen der Genexpression der Zytokine und Effektormoleküle auszuweiten. Hier könnten unter anderem besonders die TLR abhängigen Signalwege im Fokus stehen. Um einen möglichst genauen Einblick in die Immunantwort der mGBP2- defizienten Mauslinie zu erlangen, wäre die Transkriptomanalyse eine Möglichkeit. Hierbei könnte man beispielsweise Proben von sämtlichen Organen an unterschiedlichen Versuchstagen analysieren. So würde man einen sehr genauen zeitlichen Ab-

lauf der Immunantwort erhalten und die Konsequenzen der Absenz von mGBP2 besser einschätzen können. Vor allem im 40 Zysten- Infektionsmodell wäre es sinnvoll, sich dem Todeszeitpunkt der Versuchstiere anzunähern. So könnte man versuchen, die Immunantwort von infizierten Tieren an Tag 8 oder 9 p.i. zu analysieren. Hierfür benötigt man jedoch eine sehr große Anzahl Versuchstiere, da sehr viele Tiere sterben werden, bevor man ihre Organe entnehmen kann und hieraus Proben für eine Transkriptomanalyse herstellen kann. Zusätzlich ist es problematisch diese sehr große Anzahl Tiere, die alle im ähnlichen Alter sein müssen, durch Zucht zu erhalten.

Eine weitere effektive Methode um die Immunantwort näher und großflächig zu analysieren wäre es, Proteomanalysen durchzuführen. Hierbei würde man große Mengen an Informationen erhalten wie der Status der Proteinsynthese innerhalb der infizierten Versuchstiere ist. Gleichzeitig könnte man anschließend diese Ergebnisse mit Daten einer Transkriptomanalyse in Zusammenhang stellen und so eventuell auftretende Unterschiede in der Translation der RNA und der Lebensdauer der daraus entstehenden Proteine aufdecken.

Sehr interessant wäre auch die Bedeutung von mGBP2 hinsichtlich der Infektion mit anderen Vertretern der Apicomplexa, wie den Erreger der Malaria, *Plasmodium berghei*, oder den Erreger der Schlafkrankheit, *Trypanosoma cruzii*, zu untersuchen. Die Analyse der Kolo-kalisation der mGBPs an der PV der Erreger mittels Konfokalmikroskopie oder die Bestimmung der Infektionslast *in vivo* bei Applikation unterschiedlicher Infektionsdosen wären beispielsweise gute Möglichkeiten die Funktion der mGBPs in diesen Infektionen näher zu erörtern.

Neben der Infektion mit den verschiedenen Protozoen wäre es natürlich auch sehr interessant die Aufgabe der mGBPs bei viralen Infektionen, beispielsweise mit Erregern der Hepatitis, zu analysieren. Auch wären es erstrebenswert Infektionsmodelle mit anderen intrazellulären Pathogenen, wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia* oder *Rickettsia* zu etablieren und zu analysieren. Um das Zusammenwirken der mGBPs besser erforschen zu können wäre eine Möglichkeit eine Mauslinie zu erstellen, in welcher zwei oder mehr mGBPs nicht funktional sind. Vergleicht man dann die Immunantwort dieser Doppelknockout Mäuse mit Single KO Mäusen, erhält man einen besseren Einblick in die Verbindungen der mGBPs untereinander. Zusammengenommen sind auf dem Gebiet der Erforschung der mGBPs noch sehr viele interessante offene Fragen, die es zu lösen gilt und deren Verständnis im Rahmen der Grundlagenforschung einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des Immunsystems leisten kann

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der zur Gruppe der Apicomplexa gehörende, obligat intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* ist der Erreger der Toxoplasmose. Zu den Symptomen, meist in immunsupprimierten Patienten auftretend, gehören schwere Organschäden, sowie eine Enzephalitis. Ebenso kann bei Erstinfektion von Schwangeren der Fötus durch plazentale Transmission geschädigt werden. Der Erreger ist weltweit verbreitet, wobei ein Drittel der Weltbevölkerung latent infiziert ist (WHO).

In der vorgelegten Arbeit wurde die Funktion des in Vertebraten konservierten Guanylat- bindenden Proteine (GBP) 2 der p65- Familie, mit besonderer Fokussierung auf die *Toxoplasma gondii* Infektion, untersucht. Die murinen GBPs (mGBPs) werden durch Typ I und II Interferone induziert. Die Steuerung findet über den JAK-STAT- Signalweg statt. Dieser Arbeit vorangehende *in vitro* Versuche in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zeigten eine weniger effektive Bekämpfung von intrazellulären *T. gondii* in mGBP2- defizienten Zellen. Des Weiteren wurde die Rekrutierung zur parasitophoren Vakuole (PV), sowie die Kolokalisation von mGBP2 mit der PV Membran (PVM) mittels Konfokalmikroskopie gezeigt. Die generierte GBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie zeigte schließlich erhöhte Mortalitätsraten bei intraperitonealer Infektion mit 20 bzw. 40 Zysten *T.gondii* ME49.

Ziel dieser Dissertation war es, die Immunantwort der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie auf zellulärer und molekularer Ebene nach einer Infektion mit obligat intrazellulären Erregern näher zu untersuchen. Die T- Zell Immunantwort ist eine der wichtigsten immunologischen Reaktionen auf ein Pathogen und wird über die Haupthistokompatibilitäts – Komplexe (MHC) Typ I, und Typ II gesteuert. In Vorarbeiten wurde eine geringere intrazelluläre Zerstörung der *T. gondii* PV in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs beobachtet, was im *in vivo* Modell in einer geringeren Antigenpräsentation über den MHC I und II Präsentationsweg und damit einhergehender verringerter Anzahl *Toxoplasma*- spezifischer CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T- Zellen resultieren könnte. Um die *T. gondii* spezifische CD8<sup>+</sup> T- Zell Antwort zu analysieren, wurden Mäuse vom WT und der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie mit 20 Zysten i.p. infiziert und den Tagen 7, 14, 21 und 28 p.i. die T- Zellen der Milzen durch Durchflusszytometrie mit Hilfe eines MHC-I-Pentamers, der ein *T. gondii* spezifisches Epitop (SVLAFRRL) trug, analysiert. Es zeigte sich eine potente *T.gondii* spezifische CD8<sup>+</sup> T Zell Frequenz in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie und kein signifikanter Unterschied zu

den Kontrolltieren. Durch intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) wurde gezeigt, dass eine potente, mit der mGBP2<sup>+/+</sup> Maus vergleichbare CD4<sup>+</sup> T- Zell Antwort in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie stattfindet. So wurde gezeigt, dass die Präsentation der Antigene über den MHC I und II Signalweg, sowie die daraus folgende T- Zell Antwort durch ein Fehlen von mGBP2 nicht beeinträchtigt wird.

Ein weiteres Projekt der Doktorarbeit war die Analyse und der Vergleich der Stadienkonversion von *T. gondii* in mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen durch Etablierung einer Taq-Man qRT-PCR. Der Erreger wird von der Maus meist in Form von Oozysten aufgenommen, aus welchen sich innerhalb weniger Tage das sich schnell teilende Stadium, die Tachyzoiten, bildet. Die Infektion findet innerhalb der ersten 14 Tage hauptsächlich in Lunge, Leber und Milz statt. Anschließend findet beim immunkompetenten Wirt eine Verlagerung der Infektion ins Gehirn statt und eine mehr oder minder zeitgleiche Konversion der Tachyzoiten zu sich langsam teilenden Bradyzoiten. Diese sind in der Lage im Gehirn Zysten zu bilden. Es wurde beschrieben, dass es *in vitro* möglich ist durch die Verwendung stadienspezifischer Gene in einer qRT-PCR Tachyzoiten von Bradyzoiten zu unterscheiden. Die Expression solcher stadienspezifischen Gene sollte in mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen ermittelt werden, um zu untersuchen, ob sie in der Lage sind die Infektion mit *T.gondii* zu bekämpfen und die Stadienkonversion eingeleitet wird. Im *in vivo* Infektionsmodell zeigte sich, dass in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus die Stadienkonversion in einem mit der mGBP2<sup>+/+</sup> Mauslinie vergleichbaren Maße stattfindet. Um einen weiteren Einblick in die Immunantwort der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus zu erlangen, wurde die Expression zahlreicher Zytokine auf RNA- Ebene mittels qRT-PCR, sowie auf Protein- Ebene mittels ELISA, untersucht. Viele analysierten Zytokine, wie IFN $\gamma$ , IL- 1 $\beta$ , IL- 4, IL- 6 zeigten keine signifikanten Unterschiede, bei Infektion der Tiere mit 20 oder 40 Zysten i.p. Bei der Analyse von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  bei der 40 Zysten Infektion konnte eine signifikante Hochregulation der Genexpression in der Lunge der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinien gezeigt werden. Die Expression von TLR11 und TLR12 war dagegen in der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie signifikant verringert. Diese veränderten Expressionsmuster von immunrelevanten Genen könnten zur beobachteten hohen Mortalitätsrate der mGBP2<sup>-/-</sup> geführt haben.

Um die Funktion von mGBP2 bei anderen intrazellulären Pathogenen zu analysieren, wurden weitere Infektionsversuche mit dem lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCMV) und dem vesikulären Stomatitis Virus (VSV) durchgeführt. Hier wurden die Erreger- spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T- Zell Antworten, der Virustiter und andere immunologische Parameter bestimmt, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zeigten.

## 7 SUMMARY

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* is the causative agent of Toxoplasmosis. The symptoms, mostly occurring in immunocompromised patients, reach from heavy organ damage to a severe encephalitis. The pathogen is distributed worldwide whereas one third of the human world population is latently infected.

In this dissertation the function of the guanylate-binding protein (GBP) 2 of the p65-family, which is conserved in vertebrates, has been studied, focussing on the infection with *T. gondii*. The murine GBPs (mGBPs) are induced via type I and type II Interferons and regulated via the JAK-STAT-signalling pathway. Prior to this work it was found that *in vitro* murine embryonic fibroblasts (MEFs) show less effective clearance of intracellular *T. gondii* when lacking mGBP2. Furthermore, the recruitment to and the colocalization of mGBP2 at the parasitophorous membrane (PV) was shown applying confocal microscopy. The then generated mGBP2-deficient mouse strain finally showed a higher mortality rate when infected with 20 and 40 cysts intraperitoneally (i.p.).

The aim of this dissertation was to analyze the immune response of the mGBP2<sup>-/-</sup> mouse strain extensively on the cellular and molecular level after infection with obligatory intracellular pathogens. The T-cell response is one of the most important immunological reactions towards a pathogen and is controlled via the presentation pathways of the major histocompatibility complex (MHC) I and II. Since there has been found a lower clearance of intracellular *T. gondii* in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs it was thought that there might be a reduced presentation of antigen via MHC I and II, hypothetically leading to a reduced number of *T. gondii* specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. To address the question whether the CD8<sup>+</sup> T-cell response is reduced mGBP2<sup>+/+</sup> and mGBP2<sup>-/-</sup> mice were infected with 20 cysts i.p. On day 7, 14, 21 and 28 post infection (p.i.) the mice were sacrificed and the T-cells of their spleens were analyzed with flow cytometry using a MHC-I Pentamer with a *T. gondii* specific epitope (SVLAFRRL). It was shown that there was a potent CD8<sup>+</sup> T-cell response in the mGBP2<sup>-/-</sup> mouse strain and it did not differ significantly from the CD8<sup>+</sup> T-cell response of the mGBP2<sup>+/+</sup> mouse strain. Further experiments using intracellular cytokine staining (ICS) showed a potent CD4<sup>+</sup> T-cell response in mGBP2<sup>-/-</sup> mice. Therefore, it was shown, that the antigen presentation via MHC I and MHC II is not impaired in the mGBP2-deficient mouse strain.

## Summary

Another project of the thesis was the analysis and comparison of the stage conversion of *T. gondii* ME49 in mGBP2<sup>+/+</sup> and mGBP2<sup>-/-</sup> mice by establishing a Taq-Man qRT-PCR. The pathogen is naturally taken up by mice as oocysts, out of which in only a few days the fast dividing stages of the Tachyzoites emerge. The acute infection, for which tachyzoites are specific, lasts approximately 14 days mainly in the lungs, liver and spleen of the animals. After this time the infection relocates in immunosufficient animals towards the brain and a stage conversion to the slowly dividing, cyst- building bradyzoites occurs. It has been published that it is possible, by using stage- specific genes, to distinguish between tachyzoites and bradyzoites by qRT-PCR *in vitro*. After establishing a qRT-PCR on stage- specific genes *in vitro* the stage- conversion was measured *in vivo*. Therefore mGBP2<sup>+/+</sup> and mGBP2<sup>-/-</sup> mice were infected with 20 cysts i.p. and sacrificed on day 7, 14, 21, 28 p.i. It showed that in the mGBP2<sup>-/-</sup> there is a potent induction of the stage- conversion, comparable to the mGBP2<sup>+/+</sup> mouse strain.

To further address the immune response of the mGBP2- deficient mouse strain on the molecular level, the expression of a multitude of cytokines and effector molecules were analyzed on the RNA level. Many analyzed cytokines like IFN $\gamma$ , IL- 1 $\beta$ , IL- 4, IL- 6 did not show a significant difference when mice were infected with 20 or 40 cysts i.p. The analysis of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in the 40 cysts infection model did show a significant upregulation of this cytokine in the lungs of mGBP2<sup>-/-</sup> animals on day 7 p.i. The expression of TLR 11 and TLR 12 on the other hand was significantly reduced by this time in the mGBP2- deficient mice. The differences in these expression pattern might lead to or contribute to the high mortality rate of the mGBP2<sup>-/-</sup> mouse strain when infected with *T. gondii* ME49.

To address the function and role of mGBP2 towards other obligatory intracellular pathogens further infection experiments were performed using the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and the vesicular stomatitis virus (VSV). Here the pathogen- specific T- cell response was analyzed quantitatively and qualitatively and in both cases a strong pathogen- specific immune response was observed.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., Rouis, M., 2015. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* 4, 296-307.

Agrawal, S., van Dooren, G.G., Beatty, W.L., Striepen, B., 2009. Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins. *The Journal of biological chemistry* 284, 33683-33691.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M., 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Andrade, W.A., Souza Mdo, C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M.S., Melo, M.B., Bartholomeu, D.C., Ghosh, S., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., 2013. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell host & microbe* 13, 42-53.

Angel, S.O., Figueras, M.J., Alomar, M.L., Echeverria, P.C., Deng, B., 2014. *Toxoplasma gondii* Hsp90: potential roles in essential cellular processes of the parasite. *Parasitology* 141, 1138-1147.

Angus, C.W., Klivington-Evans, D., Dubey, J.P., Kovacs, J.A., 2000. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis* 181, 317-324.

Atmaca, H.T., Kul, O., Karakus, E., Terzi, O.S., Canpolat, S., Antepioglu, T., 2014. Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience* 269, 184-191.

Aviles, H., Stiles, J., O'Donnell, P., Orshal, J., Leid, J., Sonnenfeld, G., Monroy, F., 2008. Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine *toxoplasma* infection. *J Parasitol* 94, 1282-1288.

Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *European journal of immunology* 25, 3445-3451.

Bakker, A.H., Schumacher, T.N., 2005. MHC multimer technology: current status and future prospects. *Current opinion in immunology* 17, 428-433.

Balasubramanian, S., Fan, M., Messmer-Blust, A.F., Yang, C.H., Trendel, J.A., Jeyaratnam, J.A., Pfeffer, L.M., Vestal, D.J., 2011. The interferon-gamma-induced GTPase, mGBP-2, inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) induction of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by inhibiting NF-kappaB and Rac protein. *The Journal of biological chemistry* 286, 20054-20064.

Barton, L.L., 1996. Lymphocytic choriomeningitis virus: a neglected central nervous system pathogen. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 22, 197.

Barton, L.L., Hyndman, N.J., 2000. Lymphocytic choriomeningitis virus: reemerging central nervous system pathogen. *Pediatrics* 105, E35.

Basavaraju, A., 2016. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop Parasitol* 6, 129-135.

Behnke, M.S., Fentress, S.J., Mashayekhi, M., Li, L.X., Taylor, G.A., Sibley, L.D., 2012. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18. *PLoS pathogens* 8, e1002992.

Behnke, M.S., Radke, J.B., Smith, A.T., Sullivan, W.J., Jr., White, M.W., 2008. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol Microbiol* 68, 1502-1518.

Bernard, A., Boumsell, L., 1984a. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum Immunol* 11, 1-10.

Bernard, A., Boumsell, L., 1984b. [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med* 13, 2311-2316.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

- Beuscher, H.U., Gunther, C., Rollinghoff, M., 1990. IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *Journal of immunology* 144, 2179-2183.
- Bhadra, R., Cobb, D.A., Khan, I.A., 2013. Donor CD8<sup>+</sup> T cells prevent *Toxoplasma gondii* de-encystation but fail to rescue the exhausted endogenous CD8<sup>+</sup> T cell population. *Infection and immunity* 81, 3414-3425.
- Bhadra, R., Gigley, J.P., Khan, I.A., 2011a. The CD8 T-cell road to immunotherapy of toxoplasmosis. *Immunotherapy* 3, 789-801.
- Bhadra, R., Gigley, J.P., Khan, I.A., 2012. PD-1-mediated attrition of polyfunctional memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic toxoplasma infection. *J Infect Dis* 206, 125-134.
- Bhadra, R., Gigley, J.P., Weiss, L.M., Khan, I.A., 2011b. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9196-9201.
- Bi, Z., Reiss, C.S., 1995. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. *Journal of virology* 69, 2208-2213.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 607-623.
- Blader, I.J., Saeij, J.P., 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117, 458-476.
- Boackle, S.A., Morris, M.A., Holers, V.M., Karp, D.R., 1998. Complement opsonization is required for presentation of immune complexes by resting peripheral blood B cells. *Journal of immunology* 161, 6537-6543.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Fütterer, A., Pfeffer, K., Howard, J.C., 1998. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *Journal of immunology* 161, 6715-6723.
- Bohne, W., Gross, U., Heesemann, J., 1993. Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. *Journal of clinical microbiology* 31, 1641-1643.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and immunity* 62, 1761-1767.

## Literaturverzeichnis

Bohne, W., Holpert, M., Gross, U., 1999. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 201, 248-254.

Bohne, W., Wirsing, A., Gross, U., 1997. Bradyzoite-specific gene expression in *Toxoplasma gondii* requires minimal genomic elements. *Mol Biochem Parasitol* 85, 89-98.

Boothroyd, J.C., Grigg, M.E., 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5, 438-442.

Boothroyd, J.C., Sibley, L.D., 1993. Population biology of *Toxoplasma gondii*. *Res Immunol* 144, 14-16.

Bretscher, P.A., 1999. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 185-190.

Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., Denkers, E.Y., 2011. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS pathogens* 7, e1002236.

Campbell, K.S., Purdy, A.K., 2011. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132, 315-325.

Carroll, M.C., 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5, 981-986.

Carter, C.C., Gorbacheva, V.Y., Vestal, D.J., 2005. Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol* 150, 1213-1220.

Cesbron, J.Y., Caron, A., Santoro, F., Wattré, P., Ovlaque, G., Pierce, R.J., Delagneau, J.P., Capron, A., 1986. [A new ELISA method for the diagnosis of toxoplasmosis. Assay of serum IgM by immunocapture with an anti-*Toxoplasma gondii* monoclonal antibody]. *Presse Med* 15, 737-740.

Chelbi-Alix, M.K., Wietzerbin, J., 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* 89, 713-718.

Chew, W.K., Wah, M.J., Ambu, S., Segarra, I., 2012. *Toxoplasma gondii*: determination of the onset of chronic infection in mice and the in vitro reactivation of brain cysts. *Exp Parasitol* 130, 22-25.

- Chintana, T., Sukthana, Y., Bunyakai, B., Lekkla, A., 1998. Toxoplasma gondii antibody in pregnant women with and without HIV infection. Southeast Asian J Trop Med Public Health 29, 383-386.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J., Gusovsky, F., 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. The Journal of biological chemistry 274, 10689-10692.
- Christian, A.Y., Barna, M., Bi, Z., Reiss, C.S., 1996. Host immune response to vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system in C57BL/6 mice. Viral Immunol 9, 195-205.
- Cobb, J.P., Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Chang, K., Qiu, Y., Laubach, V.E., Karl, I.E., Buchman, T.G., 1999. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. Surgery 126, 438-442.
- Combe, C.L., Curiel, T.J., Moretto, M.M., Khan, I.A., 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against Toxoplasma gondii in the absence of CD4(+) T cells. Infection and immunity 73, 4913-4921.
- Coppens, I., 2013. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. Nat Rev Microbiol 11, 823-835.
- Corral, M.G., Leroux, J., Stubbs, K.A., Mylne, J.S., 2017. Herbicidal properties of antimalarial drugs. Scientific reports 7, 45871.
- Dai, W., Pan, H., Kwok, O., Dubey, J.P., 1994. Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits Toxoplasma gondii growth in fibroblast cells. Journal of interferon research 14, 313-317.
- Daubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K.S., Schrotten, H., 2001. Restriction of Toxoplasma gondii growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. Infection and immunity 69, 6527-6531.
- Davis, M.M., Altman, J.D., Newell, E.W., 2011. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. Nature reviews. Immunology 11, 551-558.
- De Boer, R.J., Homann, D., Perelson, A.S., 2003. Different dynamics of CD4+ and CD8+ T cell responses during and after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. Journal of immunology 171, 3928-3935.
- De Boer, R.J., Oprea, M., Antia, R., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., Perelson, A.S., 2001. Recruitment times, proliferation, and apoptosis rates during the CD8(+) T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. Journal of virology 75, 10663-10669.

de la Torre, J.C., 2009. Molecular and cell biology of the prototypic arenavirus LCMV: implications for understanding and combating hemorrhagic fever arenaviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171 Suppl 1, E57-64.

de Souza, W., Souto-Padron, T., 1978. Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Z Parasitenkd* 56, 123-129.

Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., Schwarz, R.T., 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 179, 1129-1137.

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

Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., Pfeffer, K., 2007. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *Journal of immunology* 179, 7729-7740.

Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., Pfeffer, K., 2013. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 294-299.

Del Carmen, M.G., Mondragon, M., Gonzalez, S., Mondragon, R., 2009. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 11, 967-982.

den Haan, J.M., Arens, R., van Zelm, M.C., 2014. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology letters* 162, 103-112.

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical microbiology reviews* 11, 569-588.

Di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., Crisanti, A., 2008. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into Bradyzoites and tissue cyst formation in vivo. *Infection and immunity* 76, 3491-3501.

Dittmann, J., Stertz, S., Grimm, D., Steel, J., Garcia-Sastre, A., Haller, O., Kochs, G., 2008. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *Journal of virology* 82, 3624-3631.

Długowska, H., 2005. [Invasiveness and intracellular parasitism of *Toxoplasma gondii*]. *Wiad Parazytol* 51, 213-217.

Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M., 1975. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1, 1406-1409.

Drewry, L.L., Sibley, L.D., 2015. *Toxoplasma* Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion. *MBio* 6, e00557.

Dubey, J.P., 1988. Long-Term Persistence of *Toxoplasma-Gondii* in Tissues of Pigs Inoculated with T-Gondii Oocysts and Effect of Freezing on Viability of Tissue Cysts in Pork. *American Journal of Veterinary Research* 49, 910-913.

Dubey, J.P., 1992. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J Parasitol* 78, 151-153.

Dubey, J.P., 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44, 592-602.

Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 28, 1019-1024.

Dubey, J.P., Miller, N.L., Frenkel, J.K., 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* 157, 1767-1770.

Dubremetz, J.F., 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol* 9, 841-848.

Dupont, C.D., Christian, D.A., Hunter, C.A., 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Seminars in immunopathology* 34, 793-813.

Dzierszinski, F., Pepper, M., Stumhofer, J.S., LaRosa, D.F., Wilson, E.H., Turka, L.A., Halonen, S.K., Hunter, C.A., Roos, D.S., 2007. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infection and immunity* 75, 5200-5209.

Ehrlich, P., 1891 *Experimentelle Untersuchungen über Immunität*. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*.

Ehrlich, P. 1901 "Die seitenkettentheorie und ihre gegner." *Münch. Med. Wschr* 18: 2123-2124.

## Literaturverzeichnis

El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773-5784.

Etheridge, R.D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H.J., Turk, B.E., Sibley, L.D., 2014. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell host & microbe* 15, 537-550.

Fargraeus, A., Antibody Production in relation to the Development of Plasma Cells. In vivo and in vitro Experiments. *Acta Medica Scandinavica* 1948 Vol.130 No.Suppl. 204 pp.122 pp. ref.145 fefs.

Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Qiu, W., Hui, R., Beatty, W.L., Sibley, L.D., 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell host & microbe* 8, 484-495.

Fentress, S.J., Sibley, L.D., 2011. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 693-700.

Fentress, S.J., Steinfeldt, T., Howard, J.C., Sibley, L.D., 2012. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 14, 1921-1933.

Ferguson, D.J., Parmley, S.F., Tomavo, S., 2002. Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication. *International journal for parasitology* 32, 1399-1410.

Ferguson, D.J.P., 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International journal for parasitology* 34, 347-360.

Fiebig, H., Behn, I., Gruhn, R., Typlt, H., Kupper, H., Ambrosius, H., 1984. [Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells]. *Allerg Immunol (Leipz)* 30, 242-250.

Fields, B.N., Hawkins, K., 1967. Human infection with the virus of vesicular stomatitis during an epizootic. *The New England journal of medicine* 277, 989-994.

Finethy, R., Jorgensen, I., Haldar, A.K., de Zoete, M.R., Strowig, T., Flavell, R.A., Yamamoto, M., Nagarajan, U.M., Miao, E.A., Coers, J., 2015. Guanylate binding proteins

enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in Chlamydia-infected macrophages. *Infection and immunity* 83, 4740-4749.

Fischer, H.G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Hadding, U., 1997. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *European journal of immunology* 27, 1539-1548.

Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T., 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 379-384.

Fuller, M.J., Zajac, A.J., 2003. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *Journal of immunology* 170, 477-486.

Fung-Leung, W.P., Kundig, T.M., Zinkernagel, R.M., Mak, T.W., 1991. Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *The Journal of experimental medicine* 174, 1425-1429.

Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R., 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine* 187, 1383-1393.

Garulli, B., Stillitano, M.G., Barnaba, V., Castrucci, M.R., 2008. Primary CD8+ T-cell response to soluble ovalbumin is improved by chloroquine treatment in vivo. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 15, 1497-1504.

Gavrilescu, L.C., Denkers, E.Y., 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of immunology* 167, 902-909.

Gavrilescu, L.C., Denkers, E.Y., 2003. Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* 71, 2577-2583.

Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M., 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. *Journal of immunology* 146, 286-292.

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., Sher, A., 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 153, 2533-2543.

- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., Sher, A., 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology* 157, 798-805.
- Gigley, J.P., Bhadra, R., Khan, I.A., 2011. CD8 T Cells and *Toxoplasma gondii*: A New Paradigm. *J Parasitol Res* 2011, 243796.
- Gigley, J.P., Bhadra, R., Moretto, M.M., Khan, I.A., 2012. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol* 28, 377-384.
- Gobet, R., Cerny, A., Ruedi, E., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1988. The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis virus. *Exp Cell Biol* 56, 175-180.
- Goldszmid, R.S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., Sher, A., 2012. NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., Brink, R., 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681-688.
- Gorbacheva, V.Y., Lindner, D., Sen, G.C., Vestal, D.J., 2002. The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *The Journal of biological chemistry* 277, 6080-6087.
- Gov, L., Karimzadeh, A., Ueno, N., Lodoen, M.B., 2013. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *MBio* 4.
- Green, T.J., Zhang, X., Wertz, G.W., Luo, M., 2006. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313, 357-360.
- Grover, H.S., Blanchard, N., Gonzalez, F., Chan, S., Robey, E.A., Shastri, N., 2012. The *Toxoplasma gondii* peptide AS15 elicits CD4 T cells that can control parasite burden. *Infection and immunity* 80, 3279-3288.
- Guenzi, E., Topolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmler, M., Hohenadl, C., Barillari, G., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., Sturzl, M., 2001. The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J* 20, 5568-5577.

- Guenzi, E., Topolt, K., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Naschberger, E., Benelli, R., Albini, A., Sturzl, M., 2003. The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J* 22, 3772-3782.
- Gupta, S.L., Rubin, B.Y., Holmes, S.L., 1979. Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4817-4821.
- Gurung, R.B., Purdie, A.C., Begg, D.J., Whittington, R.J., 2012. In silico identification of epitopes in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins that were upregulated under stress conditions. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 19, 855-864.
- Gutierrez-Escobar, A.J., Arenas, A.F., Villoria-Guerrero, Y., Padilla-Londono, J.M., Gomez-Marín, J.E., 2008. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a nitric oxide synthase-like protein. *Exp Parasitol* 119, 358-363.
- Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., Miao, E.A., 2013. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341, 1250-1253.
- Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89, 812-818.
- Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2009. Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* 28, 219-231.
- Harty, J.T., Bevan, M.J., 1999. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Current opinion in immunology* 11, 89-93.
- Hatai, H., Lepelley, A., Zeng, W., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2016. Toll-Like Receptor 11 (TLR11) Interacts with Flagellin and Profilin through Disparate Mechanisms. *PloS one* 11, e0148987.
- Hermanns, T., Müller, U.B., Konen-Waisman, S., Howard, J.C., Steinfeldt, T., 2016. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7. *Cell Microbiol* 18, 244-259.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6, 41-61.

- Holmes, M., Liwak, U., Pricop, I., Wang, X., Tomavo, S., Ananvoranich, S., 2010. Silencing of tachyzoite enolase 2 alters nuclear targeting of bradyzoite enolase 1 in *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 12, 19-27.
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., Reth, M., 1990. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 1561-1566.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., Murray, J.M., 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 2, e13.
- Huang, J., Zeng, X., Sigal, N., Lund, P.J., Su, L.F., Huang, H., Chien, Y.H., Davis, M.M., 2016. Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1890-1897.
- Hulseberg, P.D., Zozulya, A., Chu, H.H., Triccas, J.A., Fabry, Z., Sandor, M., 2010. The same well-characterized T cell epitope SIINFEKL expressed in the context of a cytoplasmic or secreted protein in BCG induces different CD8+ T cell responses. *Immunology letters* 130, 36-42.
- Huneycutt, B.S., Bi, Z., Aoki, C.J., Reiss, C.S., 1993. Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. *Journal of virology* 67, 6698-6706.
- Hunter, C.A., Chizzonite, R., Remington, J.S., 1995. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *Journal of immunology* 155, 4347-4354.
- Hunter, C.A., Sibley, L.D., 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10, 766-778.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K., 1969. Life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 4, 806.
- Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Work, K., Siim, J.C., 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65, 380-399.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.

Janeway, 2009, Immunologie, Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport (Autoren), Springer Spektrum (Verlag)

978-3-662-44227-2 (ISBN)

Jalah, R., Rosati, M., Ganneru, B., Pilkington, G.R., Valentin, A., Kulkarni, V., Bergamaschi, C., Chowdhury, B., Zhang, G.M., Beach, R.K., Alicea, C., Broderick, K.E., Sardesai, N.Y., Pavlakis, G.N., Felber, B.K., 2013. The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. *The Journal of biological chemistry* 288, 6763-6776.

Jana, M., Pahan, K., 2009. IL-12 p40 homodimer, but not IL-12 p70, induces the expression of IL-16 in microglia and macrophages. *Mol Immunol* 46, 773-783.

Janssen, P., Piekarski, G., Korte, W., 1970. [Abortion in women with latent toxoplasma infections]. *Klin Wochenschr* 48, 25-30.

Joiner, K.A., Bermudes, D., Sinai, A., Qi, H., Polotsky, V., Beckers, C.J., 1996. Structure and function of the *Toxoplasma gondii* vacuole. *Annals of the New York Academy of Sciences* 797, 1-7.

Joiner, K.A., Roos, D.S., 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 157, 557-563.

Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 5, 461.

Kibe, M.K., Coppin, A., Dendouga, N., Oria, G., Meurice, E., Mortuaire, M., Madec, E., Tomavo, S., 2005. Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res* 33, 1722-1736.

Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J., MacMicking, J.D., 2012. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell host & microbe* 12, 432-444.

Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., MacMicking, J.D., 2011. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* 332, 717-721.

## Literaturverzeichnis

- Kim, S.K., Boothroyd, J.C., 2005. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *Journal of immunology* 174, 8038-8048.
- Kirkman, L.A., Weiss, L.M., Kim, K., 2001. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infection and immunity* 69, 148-153.
- Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K., Howard, J.C., 2003. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *Journal of immunology* 171, 1255-1265.
- Knabel, M., Franz, T.J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H., Busch, D.H., 2002. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nature medicine* 8, 631-637.
- Knight, E., Jr., Korant, B.D., 1979. Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1824-1827.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., Ghosh, S., 2013. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119-130.
- Kohler, S., 2005. Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitol Res* 96, 258-272.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., Kohler, G., 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.
- Kotturi, M.F., Peters, B., Buendia-Laysa, F., Jr., Sidney, J., Oseroff, C., Botten, J., Grey, H., Buchmeier, M.J., Sette, A., 2007. The CD8<sup>+</sup> T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus involves the L antigen: uncovering new tricks for an old virus. *Journal of virology* 81, 4928-4940.
- Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T.O., Klumpers, V., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., Pfeffer, K., 2016. Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *eLife* 5.
- Kravets, E., Degrandi, D., Weidtkamp-Peters, S., Ries, B., Konermann, C., Felekyan, S., Dargazanli, J.M., Praefcke, G.J., Seidel, C.A., Schmitt, L., Smits, S.H., Pfeffer, K., 2012. The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* 287, 27452-27466.

## Literaturverzeichnis

Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wuerthner, J., Pfeffer, K., Beer, S., 2008. Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* 9, 158.

Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254, 707-710.

Kumar, R., 2005. Aseptic meningitis: diagnosis and management. *Indian journal of pediatrics* 72, 57-63.

Laliberte, J., Carruthers, V.B., 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 65, 1900-1915.

Lang, K.S., Navarini, A.A., Recher, M., Lang, P.A., Heikenwalder, M., Stecher, B., Bergthaler, A., Odermatt, B., Akira, S., Honda, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 2007. MyD88 protects from lethal encephalitis during infection with vesicular stomatitis virus. *European journal of immunology* 37, 2434-2440.

Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D., Azuma, M., 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *Journal of immunology* 154, 97-105.

Le Page, C., Genin, P., Baines, M.G., Hiscott, J., 2000. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2, 374-386.

Lee, B.L., Moon, J.E., Shu, J.H., Yuan, L., Newman, Z.R., Schekman, R., Barton, G.M., 2013. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife* 2, e00291.

Leifeld, L., Ramakers, J., Schneiders, A.M., Dumoulin, F.L., Sterneck, M., Muller, A., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2001. Intrahepatic MxA expression is correlated with interferon-alpha expression in chronic and fulminant hepatitis. *J Pathol* 194, 478-483.

Leinikki, P.O., Turunen, H., Saari, K.M., 1985. Specific diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis by demonstration of intraocular toxoplasma IgG antibodies. *Progress in clinical and biological research* 163B, 339-341.

Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., Del carrera, J., 1999. Vesicular stomatitis. *Veterinary journal* 157, 239-260.

Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., Bell, J.C., 2004. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends in molecular medicine* 10, 210-216.

Lieberman, L.A., Cardillo, F., Owyang, A.M., Rennick, D.M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., Hunter, C.A., 2004. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *Journal of immunology* 173, 1887-1893.

Lim, J.P., Gleeson, P.A., 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* 89, 836-843.

Lingelbach, K., Joiner, K.A., 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 11), 1467-1475.

Ljunggren, H.G., Karre, K., 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.

Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine & growth factor reviews* 22, 189-195.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B., 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, 925135.

Luder, C.G., Algnier, M., Lang, C., Bleicher, N., Gross, U., 2003a. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with Toxoplasma gondii facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *International journal for parasitology* 33, 833-844.

Luder, C.G., Lang, C., Giraldo-Velasquez, M., Algnier, M., Gerdes, J., Gross, U., 2003b. Toxoplasma gondii inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *J Neuroimmunol* 134, 12-24.

Luder, C.G.K., Rahman, T., 2017. Impact of the host on Toxoplasma stage differentiation. *Microb Cell* 4, 203-211.

MacKenzie, C.R., Gonzalez, R.G., Kniep, E., Roch, S., Daubener, W., 1999. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Adv Exp Med Biol* 467, 533-539.

MacKenzie, C.R., Worku, D., Daubener, W., 2003. Regulation of IDO-mediated bacteriostasis in macrophages: role of antibiotics and anti-inflammatory agents. *Adv Exp Med Biol* 527, 67-76.

MacMicking, J.D., 2004. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol* 25, 601-609.

- MacMicking, J.D., 2005. Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr Opin Microbiol* 8, 74-82.
- MacQuillan, G.C., Mamotte, C., Reed, W.D., Jeffrey, G.P., Allan, J.E., 2003. Upregulation of endogenous intrahepatic interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 70, 219-227.
- Mahittikorn, A., Wickert, H., Sukthana, Y., 2010. *Toxoplasma gondii*: Simple duplex RT-PCR assay for detecting SAG1 and BAG1 genes during stage conversion in immunosuppressed mice. *Exp Parasitol* 124, 225-231.
- Martens, S., Howard, J., 2006. The interferon-inducible GTPases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 559-589.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., Howard, J.C., 2005. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS pathogens* 1, e24.
- Masihi, K.N., Werner, H., 1976. Rosette-forming cells during immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and immunity* 13, 1678-1683.
- Masopust, D., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., 2007. Quantitating the magnitude of the lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8 T-cell response: it is even bigger than we thought. *Journal of virology* 81, 2002-2011.
- McFadden, G.I., Roos, D.S., 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol* 7, 328-333.
- Messmer-Blust, A.F., Balasubramanian, S., Gorbacheva, V.Y., Jeyaratnam, J.A., Vestal, D.J., 2010. The interferon-gamma-induced murine guanylate-binding protein-2 inhibits rac activation during cell spreading on fibronectin and after platelet-derived growth factor treatment: role for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell* 21, 2514-2528.
- Mehlhorn, H., 2017 *Encyclopedia of Parasitology*, Springer Verlag, ISBN 978-3-662-43977-7
- Meunier, E., Broz, P., 2016. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell Microbiol* 18, 168-180.
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R.F., Costanzo, S., Anton, L., Ruhl, S., Dussurgey, S., Dick, M.S., Kistner, A., Rigard, M., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Henry, T., Broz, P., 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol* 16, 476-484.

## Literaturverzeichnis

- Morawetz, R.A., Gabriele, L., Rizzo, L.V., Noben-Trauth, N., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., Doherty, T.M., Finkelman, F., Coffman, R.L., Morse, H.C., 3rd, 1996. Interleukin (IL)-4-independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *The Journal of experimental medicine* 184, 1651-1661.
- Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A., Sibley, L.D., 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal of immunology* 167, 4574-4584.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E., Sibley, L.D., 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci* 108 ( Pt 6), 2457-2464.
- Morris, S.C., Lees, A., Finkelman, F.D., 1994. In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells. *Journal of immunology* 152, 3777-3785.
- Mouveaux, T., Oria, G., Werkmeister, E., Slomianny, C., Fox, B.A., Bzik, D.J., Tomavo, S., 2014. Nuclear glycolytic enzyme enolase of *Toxoplasma gondii* functions as a transcriptional regulator. *PloS one* 9, e105820.
- Muller, W., Kuhn, R., Rajewsky, K., 1991. Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. *European journal of immunology* 21, 921-925.
- Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., Ahmed, R., 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-187.
- Nagineeni, C.N., Detrick, B., Hooks, J.J., 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infection and immunity* 68, 407-410.
- Nathan, C., Shiloh, M.U., 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8841-8848.
- Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E., 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17, 701-738.
- Niedelman, W., Gold, D.A., Rosowski, E.E., Sprockholt, J.K., Lim, D., Farid Arenas, A., Melo, M.B., Spooner, E., Yaffe, M.B., Saeij, J.P., 2012. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. *PLoS pathogens* 8, e1002784.

- Nielsen, H.V., Di Cristina, M., Beghetto, E., Spadoni, A., Petersen, E., Gargano, N., 2006. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp Parasitol* 112, 274-279.
- Oksenhendler, E., Charreau, I., Tournier, C., Azihary, M., Carbon, C., Aboulker, J.P., 1994. *Toxoplasma gondii* infection in advanced HIV infection. *AIDS* 8, 483-487.
- Oldstone, M.B., Buchmeier, M.J., 1982. Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice. *Nature* 300, 360-362.
- Pampiglione, S., Poglayen, G., Arnone, B., De Lalia, F., 1973. *Toxoplasma gondii* oocysts in the faeces of naturally infected cat. *Br Med J* 2, 306.
- Paredes-Santos, T.C., Tomita, T., Yan Fen, M., de Souza, W., Attias, M., Vommaro, R.C., Weiss, L.M., 2016. Development of dual fluorescent stage specific reporter strain of *Toxoplasma gondii* to follow tachyzoite and bradyzoite development in vitro and in vivo. *Microbes Infect* 18, 39-47.
- Patzwahl, R., Meier, V., Ramadori, G., Mihm, S., 2001. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *Journal of virology* 75, 1332-1338.
- Pavlovic, J., Schroder, A., Blank, A., Pitossi, F., Staeheli, P., 1993. Mx Proteins - Gtpases Involved in the Interferon-Induced Antiviral State. *Gtpase Superfamily* 176, 233-243.
- Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., Su, C., 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol* 4, 1363-1379.
- Pfefferkorn, E.R., Eckel, M., Rebhun, S., 1986. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol* 20, 215-224.
- Pfefferkorn, E.R., Guyre, P.M., 1984. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infection and immunity* 44, 211-216.
- Pifer, R., Benson, A., Sturge, C.R., Yarovinsky, F., 2011. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* 286, 3307-3314.
- Pifer, R., Yarovinsky, F., 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol* 27, 388-393.

Pilla-Moffett, D., Barber, M.F., Taylor, G.A., Coers, J., 2016. Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease. *J Mol Biol* 428, 3495-3513.

Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., Soldati-Favre, D., 2008. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell host & microbe* 3, 77-87.

Pletneva, L.M., Haller, O., Porter, D.D., Prince, G.A., Blanco, J.C., 2008. Induction of type I interferons and interferon-inducible Mx genes during respiratory syncytial virus infection and reinfection in cotton rats. *The Journal of general virology* 89, 261-270.

Radke, J.R., Behnke, M.S., Mackey, A.J., Radke, J.B., Roos, D.S., White, M.W., 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol* 3, 26.

Radke, J.R., Guerini, M.N., Jerome, M., White, M.W., 2003a. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 131, 119-127.

Radke, J.R., Guerini, M.N., Jerome, M., White, M.W., 2003b. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 131, 119-127.

Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., White, M.W., 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115, 165-175.

Raetz, M., Kibardin, A., Sturge, C.R., Pifer, R., Li, H., Burstein, E., Ozato, K., Larin, S., Yarovinsky, F., 2013. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *Journal of immunology* 191, 4818-4827.

Reth, M., 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.

Robinson, S.A., Smith, J.E., Millner, P.A., 2004. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. *Parasitology* 128, 391-396.

Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J.J., Turner, S.J., Godfrey, D.I., McCluskey, J., 2015. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol* 33, 169-200.

Ruan, J., Mouveaux, T., Light, S.H., Minasov, G., Anderson, W.F., Tomavo, S., Ngo, H.M., 2015. The structure of bradyzoite-specific enolase from *Toxoplasma gondii* reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71, 417-426.

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

Saeij, J.P., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005a. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21, 476-481.

Saeij, J.P., Boyle, J.P., Grigg, M.E., Arrizabalaga, G., Boothroyd, J.C., 2005b. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infection and immunity* 73, 695-702.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* 182, 389-400.

Sarma, J.V., Ward, P.A., 2011. The complement system. *Cell Tissue Res* 343, 227-235.

Savina, A., Amigorena, S., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219, 143-156.

Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., Sher, A., 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology* 168, 5997-6001.

Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of immunology* 157, 4045-4054.

Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., Sher, A., 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine* 185, 1261-1273.

Schluter, D., Deckert-Schluter, M., Lorenz, E., Meyer, T., Rollinghoff, M., Bogdan, C., 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *Journal of immunology* 162, 3512-3518.

Scholtyssek, E., Friedhoff, K., Piekarski, G., 1970. [Electron microscopy studies on identical developmental stages of coccidia, *Toxoplasma gondii* and *Piroplasma*]. *Z Parasitenkd* 35, 119-129.

Seeber, F., 2003. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3, 99-109.

Seiler, P., Kalinke, U., Rulicke, T., Bucher, E.M., Bose, C., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 1998. Enhanced virus clearance by early inducible lymphocytic choriomeningitis virus-neutralizing antibodies in immunoglobulin-transgenic mice. *Journal of virology* 72, 2253-2258.

Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W.t., Macmicking, J.D., Sibley, L.D., 2013. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 9, e1003320.

Selseleh, M., Modarressi, M.H., Mohebbi, M., Shojaee, S., Eshragian, M.R., Selseleh, M., Azizi, E., Keshavarz, H., 2012. Real-time RT-PCR on SAG1 and BAG1 gene expression during stage conversion in immunosuppressed mice infected with *Toxoplasma gondii* Tehran strain. *Korean J Parasitol* 50, 199-205.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., Mak, T.W., 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.

Shenoy, A.R., Kim, B.H., Choi, H.P., Matsuzawa, T., Tiwari, S., MacMicking, J.D., 2007. Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology* 212, 771-784.

Shenoy, A.R., Wellington, D.A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C.J., Cresswell, P., MacMicking, J.D., 2012. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 336, 481-485.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187-192.

Shifrin, N., Raulet, D.H., Ardolino, M., 2014. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol* 26, 138-144.

Shulman, I.A., 1994. Parasitic infections and their impact on blood donor selection and testing. *Arch Pathol Lab Med* 118, 366-370.

Sibley, L.D., 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240, 72-91.

Sibley, L.D., Andrews, N.W., 2000. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1, 100-106.

- Sibley, L.D., Mordue, D.G., Su, C., Robben, P.M., Howe, D.K., 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357, 81-88.
- Siim, J.C., Hutchison, W.M., Work, K., 1969. Transmission of *Toxoplasma gondii*. Further studies on the morphology of the cystic form in cat faeces. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77, 756-757.
- Silva, N.M., Gazzinelli, R.T., Silva, D.A., Ferro, E.A., Kasper, L.H., Mineo, J.R., 1998. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during *In vivo* conversion of bradyzoites to tachyzoites. *Infection and immunity* 66, 3959-3963.
- Simmons, A., Whitehead, R.P., Kolokoltsov, A.A., Davey, R.A., 2006. Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Virology journal* 3, 8.
- Skariah, S., McIntyre, M.K., Mordue, D.G., 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107, 253-260.
- Smith, J.E., 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 25, 1301-1309.
- Smith, K.M., Pottage, L., Thomas, E.R., Leishman, A.J., Doig, T.N., Xu, D., Liew, F.Y., Garside, P., 2000. Th1 and Th2 CD4+ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner *in vivo*. *Journal of immunology* 165, 3136-3144.
- Soete, M., Dubremetz, J.F., 1996. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 76-80.
- Song, Q., Sun, X., Ji, Y., Yan, X., Zou, J., Zhao, S., Suo, X., Zhu, X., Liu, X., 2016. *In vitro* observation of the stage conversion of transgenic *Toxoplasma gondii* RH strain expressing dual fluorescent proteins. *Acta Parasitol* 61, 456-460.
- Spork, S., Hiss, J.A., Mandel, K., Sommer, M., Kooij, T.W., Chu, T., Schneider, G., Maier, U.G., Przyborski, J.M., 2009. An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 8, 1134-1145.
- Sturge, C.R., Yarovinsky, F., 2014. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity* 82, 3090-3097.

## Literaturverzeichnis

- Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A.D., 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews. Immunology* 4, 420-431.
- Sullivan, W.J., Jr., Jeffers, V., 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev* 36, 717-733.
- Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S., 1989. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *Journal of immunology* 143, 2045-2050.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., Remington, J.S., 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516-518.
- Sweeney, K.R., Morrisette, N.S., LaChapelle, S., Blader, I.J., 2010. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. *Eukaryot Cell* 9, 1680-1689.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* 30, 1217-1258.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D.J., 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2563-2582.
- van den Zypen, E., Piekarski, G., 1968. [Ultrastructure on endodyogeny in *Toxoplasma gondii*]. *Bol Chil Parasitol* 23, 90-94.
- Van Eden, W., Van Der Zee, R., Van Kooten, P., Berlo, S.E., Cobelens, P.M., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Prakken, B., Roord, S., Albani, S., 2002. Balancing the immune system: Th1 and Th2. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2, ii25-28.
- van Leeuwen, E.M., Sprent, J., Surh, C.D., 2009. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Current opinion in immunology* 21, 167-172.
- Vassilev, M.G., Antonov, K.A., Krastev, Z.A., 1999. Expression of the interferon induced Mx A protein in the liver during chronic hepatitis B and C. *Hepatology* 30, 284a-284a.
- Velge-Roussel, F., Chardes, T., Mevelec, P., Brillard, M., Hoebeke, J., Bout, D., 1994. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Mol Biochem Parasitol* 66, 31-38.

- Velge-Roussel, F., Dimier-Poisson, I., Buzoni-Gatel, D., Bout, D., 2001. Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. *Parasitology* 123, 225-233.
- Virreira Winter, S., Niedelman, W., Jensen, K.D., Rosowski, E.E., Julien, L., Spooner, E., Caradonna, K., Burleigh, B.A., Saeij, J.P., Ploegh, H.L., Frickel, E.M., 2011. Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. *PLoS one* 6, e24434.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.
- von Behring, E., Kitasato, S., 1991. [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol Immunol* 28, 1317, 1319-1320.
- Walker, D.M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B.S., Drew, M.E., Satoskar, A.R., 2014. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci* 71, 1245-1263.
- Wang, Z.D., Liu, H.H., Ma, Z.X., Ma, H.Y., Li, Z.Y., Yang, Z.B., Zhu, X.Q., Xu, B., Wei, F., Liu, Q., 2017. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in microbiology* 8, 389.
- Washino, T., Moroda, M., Iwakura, Y., Aosai, F., 2012. *Toxoplasma gondii* infection inhibits Th17-mediated spontaneous development of arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Infection and immunity* 80, 1437-1444.
- Weibel, D., Brundler, M.A., Zinkernagel, R.M., Battegay, M., 1993. Analysis of neutralizing antibody specificities of different strains of lymphocytic choriomeningitis virus with strain-specific immune sera. *Research in virology* 144, 471-478.
- Weilhammer, D.R., Iavarone, A.T., Villegas, E.N., Brooks, G.A., Sinai, A.P., Sha, W.C., 2012. Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 42, 947-959.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 5, D391-405.
- Wellenberg, G.J., van der Poel, W.H., Van Oirschot, J.T., 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary microbiology* 88, 27-45.
- Wenyon, C.M., 1926. *Protozoology; a manual for medical men, veterinarians and zoologists*. Baillière, Tindall and Cox, London,.

Wherry, E.J., 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12, 492-499.

Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., Ahmed, R., 2007. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670-684.

Wilson, D.C., Grotenbreg, G.M., Liu, K., Zhao, Y., Frickel, E.M., Gubbels, M.J., Ploegh, H.L., Yap, G.S., 2010. Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. *PLoS pathogens* 6, e1000815.

Wilson, D.C., Matthews, S., Yap, G.S., 2008. IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *Journal of immunology* 180, 5935-5945.

Xu, H.C., Grusdat, M., Pandyra, A.A., Polz, R., Huang, J., Sharma, P., Deenen, R., Kohrer, K., Rahbar, R., Diefenbach, A., Gibbert, K., Lohning, M., Hocker, L., Waibler, Z., Haussinger, D., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Lang, K.S., Lang, P.A., 2014. Type I interferon protects antiviral CD8+ T cells from NK cell cytotoxicity. *Immunity* 40, 949-960.

Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., Takeda, K., 2012. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313.

Yamamoto, M., Takeda, K., 2012. Inhibition of ATF6beta-dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence* 3, 77-80.

Yano, A., Mun, H.S., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F., Iwakura, Y., 2002. Roles of IFN-gamma on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int Rev Immunol* 21, 405-421.

Yarovinsky, F., 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature reviews. Immunology* 14, 109-121.

Yarovinsky, F., Hieny, S., Sher, A., 2008. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. *Journal of immunology* 181, 8478-8484.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.

## Literaturverzeichnis

Zare-Bidaki, M., Hakimi, H., Abdollahi, S.H., Zainodini, N., Arababadi, M.K., Kennedy, D., 2014. TLR4 in Toxoplasmosis; friends or foe? *Microb Pathog* 69-70, 28-32.

Zenner, L., Darcy, F., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F., 1998. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 90, 86-94.

Zenner, L., Foulet, A., Caudrelier, Y., Darcy, F., Gosselin, B., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F., 1999. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathol Res Pract* 195, 475-485.

Zhang, J.M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45, 27-37.

Zhao, Y.O., Khaminets, A., Hunn, J.P., Howard, J.C., 2009. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN $\gamma$ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS pathogens* 5, e1000288.

Zheng, B., Lu, S., Tong, Q., Kong, Q., Lou, D., 2013. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma Gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 31, 4578-4584.

Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M., Popkin, D.L., 2012. Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future. *Viruses* 4, 2650-2669.

Zimmermann, S., Murray, P.J., Heeg, K., Dalpke, A.H., 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN- $\gamma$  signaling. *Journal of immunology* 176, 1840-1847.

Zinecker, C.F., Striepen, B., Geyer, H., Geyer, R., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T., 2001. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 116, 127-135.

Zinkernagel, M.S., Bolinger, B., Krebs, P., Onder, L., Miller, S., Ludewig, B., 2009. Immunopathological basis of lymphocytic choriomeningitis virus-induced chorioretinitis and keratitis. *Journal of virology* 83, 159-166.

Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18, 14-17.

Zinkernagel, R.M., Leist, T., Hengartner, H., Althage, A., 1985. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity,

as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. The Journal of experimental medicine 162, 2125-2141.

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1.1: MORPHOLOGIE DER APICOMPLEXA.....	1
ABBILDUNG 1.2: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINES LYMPHOZYTEN MIT INTRAZELLULÄREN UND EXTRAZELLULÄREN TACHYZOITEN (GRÜN) VON <i>T.GONDII</i> ME49 .....	2
ABBILDUNG 1.3: LÄNGSSCHNITT DURCH DAS APIKALE ENDE EINES EXTRAZELLULÄREN TACHYZOITEN VON <i>T.GONDII</i> .....	3
ABBILDUNG 1.4: LEBENSZYKLUS VON <i>T.GONDII</i> . .....	7
ABBILDUNG 1.5: INTRAZELLULÄRE TACHYZOITEN IN EINER WIRTSZELLE. ....	8
ABBILDUNG 1.6: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER GEWEBEZISTE MIT BRADYZOITEN IM INNEREN.....	9
ABBILDUNG 1.7: ÜBERBLICK DER ZELLULÄREN BESTANDTEILE DES BLUTES INKLUSIVE DER LYMPHOZYTEN DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT.....	19
ABBILDUNG 1.8: EVOLUTIONÄRER STAMMBAUM DER GTPASEN.....	27
ABBILDUNG 1.9: INDUKTION DER GENEXPRESSION DER IFN INDUZIERBAREN GTPASEN MITTELS DES JAK/STAT- SIGNALWEGS DURCH TYP I UND II INTERFERONE.....	29
ABBILDUNG 1.10: INTRAZELLULÄRE DISRUPTION DER PARASITOPHOREN VAKUOLE VON <i>T.GONDII</i> IN WT UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	31
1.11: IFN $\gamma$ - ABHÄNGIGE REKRUTIERUNG VON MGBP2 ZUR PV VON <i>T.GONDII</i> (DEGRANDI ET AL. 2013).....	32
1.12: KLONIERUNGSSTRATEGIE ZUR ERSTELLUNG DER MGBP2 <sup>-/-</sup> DEFIZIENTEN MAUSLINIE.....	32
ABBILDUNG 1.13: ÜBERLEBENSKURVE VON MGBP2 <sup>+/+</sup> , MGBP2 <sup>-/-</sup> UND INTERFERON REGULATORY FACTOR (IRF) 1 <sup>-/-</sup> MAUSLINIEN BEI INFEKTION MIT 40 ZYSTEN <i>T.GONDII</i> ME49 I.P.....	33
ABBILDUNG 1.14: ROSETTENBILDUNG IN KNOCHENMARKSMAKROPHAGEN (BMDMs) UND ASTROZYTEN NACH INFEKTION MIT <i>T.GONDII</i> ME49: INFEKTION VON BMDMs UND ASTROZYTEN MIT <i>T. GONDII</i> ME49.....	33
ABBILDUNG 3.1: ÜBERLEBENSKURVE EINER <i>T.GONDII</i> ME49 INFEKTION MIT 20 ZYSTEN I.P.....	74
ABBILDUNG 3.2: ÜBERLEBENSKURVE EINER <i>T.GONDII</i> ME49 INFEKTION MIT 40 ZYSTEN I.P. ....	75
ABBILDUNG 3.3: EXPRESSION DER STADIENSPEZIFISCHEN GENE <i>IN VITRO</i> BEI ZUGABE VON 0 $\mu$ M SNP ODER TÄGLICHER ZUGABE VON 70 $\mu$ M SNP.....	76
ABBILDUNG 3.4: MESSUNG DER INFEKTIONSLAST IN DER LUNGE VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> TIEREN. ....	77
ABBILDUNG 3.5: MESSUNG DER STADIENKONVERSION <i>IN VIVO</i> IN DER LUNGE DER MAUSLINIEN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> TIEREN AN DEN VERSUCHSTAGEN 7, 14, 21 UND 28 P.I.....	79
ABBILDUNG 3.6: MESSUNG DER INFEKTIONSLAST IM GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MÄUSEN NACH INFEKTION MIT 20 ZYSTEN I.P. AN TAG 7, 12, 21 UND 28 P.I.....	80
ABBILDUNG 3.7: MESSUNG DER STADIENKONVERSION <i>IN VIVO</i> IM GEHIRN DER MAUSLINIEN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> AN DEN VERSUCHSTAGEN 7, 14, 21 UND 28 P.I. ....	81
ABBILDUNG 3.8: ZELLZAHLEN DER LEBENDEN T- ZELLEN IN DER NAIVEN MAUS UND IN DER MIT 20 ZYSTEN <i>T.GONDII</i> ME49 INFIZIERTEN MAUS [%].....	83
ABBILDUNG 3.9: ZELLZAHL DER LEBENDEN T- ZELLEN IN DEN NAIVEN UND MIT 40 ZYSTEN <i>T.GONDII</i> ME49 INFIZIERTEN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MÄUSE [%].....	83
ABBILDUNG 3.10: GATINGSTRATEGIE DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSEN [A;B].....	85

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 3.11: DURCHFLOSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER <i>T.GONDII</i> SPEZIFISCHEN CD8 <sup>+</sup> T- ZELLEN IN % DER GESAMT- CD8 <sup>+</sup> T- ZELLEN IN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 DEFIZIENTER MAUSLINIE IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	87
ABBILDUNG 3.12: DURCHFLOSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER <i>T.GONDII</i> SPEZIFISCHEN CD8 <sup>+</sup> T- ZELLEN IN % DER GESAMTEN CD8 <sup>+</sup> T- ZELLEN IN DER MGBP2 <sup>+/+</sup> UND DER MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIE IM 40 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	88
ABBILDUNG 3.13: INTRAZELLULÄRE ZYTOKINFÄRBUNG (ICS) AUF IFN $\gamma$ IN CD4 <sup>+</sup> -UND CD8 <sup>+</sup> T- LYMPHOZYTEN [%].....	89
ABBILDUNG 3.14: GENEXPRESSION VON IFN $\gamma$ IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	91
ABBILDUNG 3.15: GENEXPRESSION VON IL-12p40 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	91
ABBILDUNG 3.16: GENEXPRESSION VON IL-1 $\beta$ IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	92
ABBILDUNG 3.17: GENEXPRESSION VON TNF-A IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	93
ABBILDUNG 3.18: GENEXPRESSION VON p47 <sup>PHOX</sup> IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	94
ABBILDUNG 3.19: GENEXPRESSION VON IL-6 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	95
ABBILDUNG 3.20: GENEXPRESSION VON IL- 4 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	95
ABBILDUNG 3.21: GENEXPRESSION VON PD-1 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	96
ABBILDUNG 3.22: GENEXPRESSION VON CASPASE IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	97
ABBILDUNG 3.23: GENEXPRESSION VON IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	98
ABBILDUNG 3.24: GENEXPRESSION VON MGBP5 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	99
ABBILDUNG 3.25: : GENEXPRESSION VON IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	99
ABBILDUNG 3.26: GENEXPRESSION VON INDOLAMIN-2,3-DIOXYGENASE (IDO) IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	100
ABBILDUNG 3.27: GENEXPRESSION VON iNOS IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 20 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	101
ABBILDUNG 3.28: ANALYSE DER IFN $\gamma$ KONZENTRATION IM SERUM VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> TIEREN, INFIZIERT MIT 20 ZYSTEN <i>T.GONDII</i> ME49 (i.p.) MITTELS ELISA.....	102
ABBILDUNG 3.29: ANALYSE DER IL12p40 KONZENTRATION IM SERUM VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> TIEREN, INFIZIERT MIT 20 ZYSTEN <i>T.GONDII</i> ME49 (i.p.) MITTELS ELISA.....	103
ABBILDUNG 3.30: GENEXPRESSION VON IFN $\gamma$ IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFektionsMODELL.....	104

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 3.31: GENEXPRESSION VON IL-12P40 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	105
ABBILDUNG 3.32: GENEXPRESSION VON IL-1β IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	105
ABBILDUNG 3.33: GENEXPRESSION VON TNF-A IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	106
ABBILDUNG 3.34: GENEXPRESSION VON IL-6 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	106
ABBILDUNG 3.35: GENEXPRESSION VON IL-4 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	107
ABBILDUNG 3.36: : GENEXPRESSION VON PD-1 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	108
ABBILDUNG 3.38: GENEXPRESSION DER GBPs MGBP1, 5 UND 7 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	109
ABBILDUNG 3.39: GENEXPRESSION VON IDO IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	110
ABBILDUNG 3.40: GENEXPRESSION VON iNOS IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	110
ABBILDUNG 3.41: GENEXPRESSION VON TLR 4 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	111
ABBILDUNG 3.42: GENEXPRESSION VON TLR 9 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	111
ABBILDUNG 3.43: GENEXPRESSION VON TLR 11 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	112
ABBILDUNG 3. 44: GENEXPRESSION VON TLR 12 IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	113
ABBILDUNG 3.45: GENEXPRESSION VON IFN-A IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	114
ABBILDUNG 3.46: GENEXPRESSION VON IFN-B IN LUNGE UND GEHIRN VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2- DEFIZIENTEN MAUSLINIEN IM 40 ZYSTEN INFEKTIONSMODELL.....	114
ABBILDUNG 3.47: BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS IN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MÄUSEN BEI VERSCHIEDENEN INFEKTIONSDOSEN MIT LCMV.....	117
ABBILDUNG 3.48: LCMV- SPEZIFISCHE T- ZELL ANTWORT BEI DER INFEKTION MIT LCMV.....	118
ABBILDUNG 3.49: : INTRAZELLULÄRE ZYTOKINFÄRBUNG (ICS).....	119
ABBILDUNG 3.50: MORTALITÄTSRATE VON MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MÄUSEN BEI EINER INFEKTION MIT 2x10 <sup>6</sup> PFU VSV.....	120
ABBILDUNG 3.51: NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER VON VSV INFIZIERTEN MGBP2 <sup>+/+</sup> UND MGBP2 <sup>-/-</sup> MÄUSEN NACH INFEKTION MIT 2x10 <sup>6</sup> PFU.....	121

### **10 DANKSAGUNG**

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer, für die Möglichkeit bei Ihm im Labor an einem solch interessanten Thema, in einem tollen Team zu arbeiten und diese Dissertation erstellen zu können. Auch die Unterstützung bei den verschiedenen Projekten war immer sehr gut.

Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge möchte ich für die freundliche Betreuung im Rahmen der MOI II Graduiertenschule, sowie für die Übernahme der Erstellung des Gutachtens, sehr danken.

Ebenso möchte ich mich auch sehr herzlich bei Herrn Dr. Daniel Degrandi für die stets sehr gute Betreuung bei den Experimenten, deren Planung, sowie für die Anregungen innerhalb und außerhalb des Labors.

Desweiteren möchte ich mich bei der Jürgen- Manchot- Stiftung für die Finanzierung durch die MOI- II, sowie bei der stets engagierten und in allen Promotionsbelangen hilfreichen Frau Dr. Inge Krümpelbeck bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei der AG Lang für die tolle Zusammenarbeit bei den Infektionsversuchen mit LCMV sowie VSV bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch sehr herzlich bei allen Mitarbeiter/innen des Instituts für die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft untereinander bedanken.

## 11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

“Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich übernommene Sätze oder Satzteile sind als Zitat belegt, andere Anlehnungen hinsichtlich Aussage und Umfang unter Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und ist nicht veröffentlicht“.

Ort, Datum: \_\_\_\_\_ Unterschrift: \_\_\_\_\_