

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

**Die Rolle der Indolamin-2,3-Dioxygenase bei der
Immunreaktion gegen *Neospora caninum* in
humanen Zellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Marcus Johannes Czesla

2019

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

gez.

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

Erstgutachter: Prof.Dr.med. Walter Däubener

Zweitgutachter: Prof. Dr. med Ortwin Adams

Ich bedanke mich herzlich bei

Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener

für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung,

bei meiner Arbeitsgruppe und dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,

insbesondere Frau Dr. rer. nat. K. Spekker, Frau Vanessa Ince und Frau S. Stuhlsatz,

ferner bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden.

Danke für eure Geduld und eure Unterstützung.

gewidmet

meinen Kindern und meiner Familie sowie allen, die mich auf meinem bisherigen Weg

unterstützt, bestärkt und gehalten haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Spekker K, Czesla M, Ince V, Heseler K, Schmidt S K, Schares G and Däubener W. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in the defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun* 77:4496-501.

Abkürzungen

-	minus
>	größer
<	kleiner
%	Prozent
+	plus
μCi	Micro Curie
μl	Microliter
86HG39	Astrozytomzellen
A549	Alveolarzellen Typ II/Lungentumorzellen
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
cNOS	Stickstoffsynthase
FCS	Fetal cattle serum
g	Erdbeschleunigung
HBMEC	Human brain mesenchymal endothelial cells
HFF	Human foreskin fibroblasts
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL1	Interleukin 1
iNOS	induzierbare Stickstoffsynthase
cNOS	konstitutive Stickstoffsynthase
IRG	Immunity-related GTPasis
min	Minuten
ml	Milliliter
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
NcSRS2	<i>N. caninum</i> SAG1-related sequence 2
N ^G MMA	N ^G -monomethyl-L-Arginin

NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
OD	Extinktion
PBS	Phosphate balanced saline
PV	parasitophore Vakuole
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeiner Teil	1
1.2. Morphologie und Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.3. Morphologie und Lebenszyklus von <i>Neospora caninum</i>	5
1.4. Grundlagen der humoralen und zellulären Immunreaktion gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1.5. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase	10
1.6. Eigene Fragestellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Herkunft, Kultivierung und Ernte der Zellen	12
2.2. Kultivierung und Ernte von <i>Toxoplasma gondii</i> und <i>Neospora caninum</i>	13
2.3. Photometrische Messung der Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase mittels IDO-Assay	14
2.4. Messung der Proliferation von <i>Neospora caninum</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> (³ H-Uracil-Methode)	15
2.5. Statistik	15
3. Ergebnisse	17
3.1. Wachstumsverhalten von <i>Toxoplasma gondii</i> Typ II und III in IFN γ -stimulierten Wirtszellen	17
3.2. Wachstumsverhalten von <i>Neospora caninum</i> in verschiedenen humanen Wirtszellen	30
3.3. IFN γ -vermittelte Hemmung des Wachstums von <i>Neospora caninum</i> in Zellen humanen Ursprungs	32
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	47

1. Einleitung

1.1. Allgemeiner Teil

Toxoplasma gondii, ein Protozoon aus dem Phylum Apicomplexa, ist einer der erfolgreichsten Parasiten weltweit. Taxonomisch ist er der Familie der Apicomplexa zuzuordnen (Mehlhorn 1989), zu der auch die malariaverursachenden Plasmodien gehören. Entdeckt wurde *T. gondii* bereits 1908 von Nicolle und Manceaux, welche den Parasiten aus dem afrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gondii* isolierten. *T. gondii* ist in der Lage, nahezu alle Warmblüter, inklusive des Menschen, zu infizieren. Weltweit sind ca. 30 % aller Menschen mit *T. gondii* infiziert, wobei die Durchseuchungsrate vom Alter abhängig ist und länderspezifisch zwischen 10 % und 80 % schwanken kann (Schlüter et al. 2014). Die Übertragung auf den Menschen verläuft über Gewebezysten, vor allem bei Verzehr von rohem Fleisch, oder durch Kontakt mit den sehr umweltstabilen Oozysten aus Katzenkot (Dubey et al. 1970), beispielsweise beim Reinigen eines Katzenabortes oder bei Gartenarbeiten. Eine Besonderheit der humanen Toxoplasmose ist, dass die Primärerkrankung bei Immunkompetenten zumeist symptomlos verläuft.

T. gondii ist jedoch in der Lage, die Blut/Plazenta-Schranke zu überschreiten und somit von der Mutter auf die ungeborene Frucht überzugehen. Bei einer Erstinfektion in der Schwangerschaft kommt es häufig zu fatal verlaufenden Enzephalitiden des Ungeborenen, weshalb für Schwangere gemeinhin die Empfehlung gilt, insbesondere bei der Haltung von Katzen besondere Vorsicht walten zu lassen. So sollten sie das Reinigen des Katzenabortes unterlassen oder aber als Mindestschutz bei dieser Tätigkeit Schutzhandschuhe tragen.

Auch im immunkompetenten Patienten führt die Immunreaktion nicht zur Elimination des Parasiten. Letzterer persistiert in Form von Bradyzoiten in Gewebezysten – vor allem in der Skelettmuskulatur und im Hirngewebe. Im Falle eines Immundefizits kommt es zur

Reaktivierung der Gewebezysten und anschließend zu einer Transformation der Bradyzoiten in die sich schnell teilenden Tachyzoiten. Bei Personen mit einer angeborenen oder erworbenen Immundefizienz kann dies zu einer klinisch manifesten Toxoplasmose mit lebensgefährlichen Verläufen führen. Ein Beispiel für einen solchen Verlauf ist die *Toxoplasma*-Enzephalitis bei AIDS-Patienten, welche zu den AIDS-definierenden Erkrankungen gehört und durch eine Reaktivierung der Gewebezysten verursacht wird.

Ohne adäquate Therapie – Mittel der Wahl sind Pyrimethamin und Sulfonamid in Kombination – kommt es nach kurzem Verlauf der Erkrankung zur Ausbildung des Vollbildes der Toxoplasmose und rasch zum Tod des Wirtes (Montoya et al. 2008; Laliberte und Carruthers 2008; Filisetti und Candolfi 2004).

Sowohl infektionsimmunologisch als auch unter epidemiologischen Gesichtspunkten weist *T. gondii* viele Besonderheiten auf, welche sich am besten bei Betrachtung des Lebenszyklus des Erregers erklären lassen.

1.2. Morphologie und Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Im Entwicklungszyklus von *T. gondii* gibt es unterschiedliche Erscheinungsformen. Während Tachyzoiten, Sporozoiten, Endozoiten und Bradyzoiten intrazellulär lokalisiert sind oder in Form von Zysten und Pseudozysten auftreten, handelt es sich bei den Mikrogameten und Oozysten um extrazelluläre Erscheinungsformen. Taxonomisches Merkmal von *T. gondii* ist der Apikomplex am vorderen Zellpol. Von einem Polring ziehen stützende Mikrotubuli unter der Pellicula zum hinteren Zellpol. Durch diesen Ring ziehen an der Spitze des Parasiten Ausführungsgänge von sekretorischen Organellen, den flaschenförmigen Rhoptrien und den fadenförmigen Mikronemen. Diese sekretorischen Organellen beinhalten Proteine, die für den Invasionsprozess in die Wirtszelle essentiell sind (Siewing 1985). Ein komplexes

Zusammenspiel von Polringen, Pellicula, Conoid, subpellikulären Mikrotubuli, Mikronemen und Rhoptrien ermöglicht eine gleitende Bewegung und das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Ossorio et al. 1992). Nach Adhäsion des Parasiten an der Zelloberfläche dringt er innerhalb von 15 Sekunden (Werk 1985) unter Mitnahme von Bestandteilen der Wirtsmembran in das Zellinnere vor. Wirtsmembran und Parasitenmembran vereinigen sich scheinbar an einer ringförmigen Kontaktlinie („moving junction“), welche auf der Parasitenoberfläche nach hinten gleitet (Soldati-Favre 2008). Nach Eindringen des Parasiten wird das Plasmalemm wieder verschlossen, und *T. gondii* ist nun in eine parasitophore Vakuole eingebettet. Über Mikroporen in der Zellmembran der Parasiten erfolgt die Nahrungsaufnahme (Robibaro et al. 2001).

Die parasitophore Vakuole fusioniert nicht mit Lysosomen der Wirtszelle, wie es bei phagozytierenden Vakuolen zu beobachten ist. Es wird angenommen, dass die zur Fusion mit Zellkompartimenten benötigten Membranmarker durch Inhibitoren des Parasiten verdeckt oder reduziert werden (Joiner et al. 1990). Die Vermehrung erfolgt innerhalb der Vakuole durch Endodyogenie, nach mehrfacher Teilung entsteht das typische Rosettenmuster (Seitz 1990).

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* ist sehr komplex und durch einen Wechsel von sexueller und asexueller Vermehrung gekennzeichnet. Die Entwicklung von *T. gondii* lässt sich in eine enteroepitheliale, eine exogene und eine extraintestinale Phase einteilen, welche nacheinander durchlaufen werden. Die sexuelle Vermehrung in der enteroepithelialen Phase ist ausschließlich bei Katzen zu beobachten, welche den Endwirt darstellen. Aufgenommen werden die Parasiten im Stadium von Bradyzoiten aus Zysten im Muskelgewebe von infizierten Zwischenwirten (z. B. Mäuse, Schweine). *T.-gondii*-Bradyzoiten überleben in aller Regel die Magenpassage innerhalb der Gewebezysten und werden im Darm freigesetzt. Sie

dringen schließlich in das Darmepithel ein und verwandeln sich nach einigen Replikationsschritten in Mikro- und Makrogameten, welche nach der sexuellen Vermehrung Oozysten ausbilden, die mit den Fäzes ausgeschieden werden. Oozysten können danach zu umweltresistenten Sporozoiten ausreifen und dann neue Wirte infizieren (Dönges 1988). Bei Zwischenwirten findet nach dem Eindringen der Bradyzoiten in die Dünndarmzellen eine Transformation zu Tachyzoiten statt. Diese vermehren sich durch die für *T. gondii* charakteristischen Endodyogenien. Hierunter wird die Ausbildung zweier Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle ohne Restkörper verstanden. Von dort aus erfolgt nach der initialen Vermehrung im Darmepithel eine Streuung in viele Organe. Besonders in der Muskulatur und im ZNS vollziehen die Tachyzoiten einen Wandel zu langsam replizierenden Bradyzoiten, welche im Verlauf der Infektion Gewebezysten ausbilden, die lebenslang persistieren und infektiös bleiben (Kasper 1989; Beyer et al. 1977).

Trotz seines sehr spezifischen Endwirtes ist *T. gondii* in der Lage, nahezu alle warmblütigen Lebewesen zu infizieren, jedoch sind die verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig betroffen.

Im Jahre 1984 wurde in Norwegen zum ersten Mal ein *T.-gondii*-ähnlicher Parasit im Hirngewebe von Hunden isoliert (Bjerkas et al. 1984). Dieser Parasit wurde mit neuromuskulären Erkrankungen bei Hunden in Zusammenhang gebracht, sein Name lautet daher *Neospora caninum* (Dubey et al. 1988). Erst im Jahre 1998 wurde der Hund als Endwirt dieses Parasiten identifiziert (McAllister et al. 1998), vorher war er oft als *T. gondii* fehldiagnostiziert worden (Dubey et al. 1988). Lichtmikroskopisch unterscheidet er sich von *T. gondii* durch die ungeordnete Anordnung der Tachyzoiten innerhalb der intrazellulären Vakuolen. Die *T.-gondii*-Tachyzoiten hingegen liegen in den intrazellulären Vakuolen in Rosettenform angeordnet vor. Der Lebenszyklus von *N. caninum* besteht ebenfalls aus einer

sexuellen und einer asexuellen Vermehrungsphase. Im Folgenden wird dieser detailliert beschrieben.

1.3. Morphologie und Lebenszyklus von *Neospora caninum*

N. caninum ist ebenfalls ein obligat intrazellulärer Parasit, der mehrere Wirtsspezies befallen kann (Dubey 2003). Der Unterschied zu *T. gondii* und der Toxoplasmose besteht darin, dass es sich beim Krankheitsbild der Neosporose fast ausschließlich um eine Erkrankung des Rindes und des Hundes sowie artverwandter Karnivoren handelt. Der Lebenszyklus von *N. caninum* umfasst drei typische Infektionsstadien: Tachyzoiten, Gewebezysten mit Bradyzoiten und Oozysten, wobei Tachyzoiten und Bradyzoiten intrazellulär in Zwischenwirten gefunden werden (Dubey et al. 1988; Dubey 2003). Tachyzoiten sind etwa 6 x 2 µm groß, bradyzoitenhaltige Gewebezysten erscheinen rund und durchmessen etwa 110 µm. Letztere werden zumeist in Muskel- und Nervengewebe nachgewiesen (Dubey et al. 1988; Dubey 2003).

Die Oozysten werden von Hunden und artverwandten Raubsäugern, wie z. B. Kojoten, mit den Fäzes ausgeschieden. Über Dauerformen in der Umwelt sind nur wenige Details bekannt. Aufgrund der engen Beziehung zu *T. gondii* wird angenommen, dass sich Oozysten von *N. caninum* ähnlich wie Oozysten von *T. gondii* umweltresistent verhalten (Dubey et al. 1988). Alle drei Entwicklungsstadien sind an der Transmission des Parasiten beteiligt. Fleischfresser infizieren sich bei der Aufnahme von Gewebezysten in infiziertem Muskelfleisch, Pflanzenfresser überwiegend beim Verzehr von mit Fäzes verseuchtem Wasser und Grünfutter. Die transplazentare Infektion beim Rind erfolgt meist nach Erstinfektion des trächtigen Tieres während der Schwangerschaft durch zirkulierende *N.-caninum*-Tachyzoiten, aber auch bei chronisch infizierten Tieren kann der Parasit in der Tachyzoitenform

diaplazentar übertragen werden. Eine der Verbreitung des Parasiten zuträgliche Unart in der Landwirtschaft – nämlich die Verfütterung von Rinderplazenta an Hofhunde, die vornehmlich in den USA praktiziert wird – begünstigt zudem die Durchseuchung von Hofhunden in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung mit *N. caninum*. So konnte in serologischen Studien nachgewiesen werden, dass insbesondere bei Hofhunden eine hohe Seroprävalenz vorliegt (Regidor-Cerrillo et al. 2010).

Natürlicherweise wird *N. caninum* in seinem Hauptwirt oder artverwandten Raubsäugetieren nachgewiesen. Jedoch kann *N. caninum* besonders in Nutztieren, vor allem bei Rindern, wirtschaftlich relevante Infektionen verursachen. Ferner wird der Parasit selten auch in Ziegen und Wild nachgewiesen (Dubey et al. 2007). Bis heute gibt es keinen publizierten Beleg dafür, dass *N. caninum* zu einer zoonotischen Infektion beim Menschen führt (Dubey 2003). Auch die assoziierte Erkrankung, die Neosporose, ist beim Menschen nicht beschrieben. Experimentell gelang eine Infektion mit *N. caninum* bei Rhesus-Affen, außerdem konnten in geringem Ausmaß Antikörper gegen *N. caninum* bei exponierten Personengruppen – wie zum Beispiel Landwirten in der Milch- und Nutztierhaltung – nachgewiesen werden (McCann et al. 2008; Dubey 2003; Innes et al. 2005).

Des Weiteren bestehen große Ähnlichkeiten zwischen *T. gondii* und *N. caninum*:

- Beide Parasiten werden über Nahrung/Lebensmittel übertragen,
- beide sind in der Lage, die Blut-Plazenta-Schranke zu überwinden,
- beide verursachen nach transplazentarer Übertragung eine Enzephalitis,
- beide verursachen häufig asymptomatische Primärinfektionen,
- beide befallen das ZNS und

- beide können *in vitro* in Zellen unterschiedlicher Spezies angezüchtet werden

(Innes et al. 2007).

Wie bereits erwähnt, verläuft die Primärinfektion mit *N. caninum* ebenso wie die mit *T. gondii* beim immunkompetenten Wirt häufig asymptomatisch. Ursache dafür ist eine sehr schnell einsetzende und effiziente Immunreaktion, die im Folgenden geschildert wird.

1.4. Grundlagen der humoralen und zellulären Immunreaktion gegen *Toxoplasma gondii*

Der menschliche Körper reagiert auf eine Infektion mit *T. gondii* sowohl mit einer humoralen als auch mit einer zellulären Immunantwort (Sethi und Pikarski 1987; Montoya 2004). Dabei werden sowohl Antigene der Parasitenoberfläche als auch Antigene aus dem Zytoplasma erkannt (Boothroyd 2009). Von einigen dieser Antigene ist bekannt, dass sie stadienspezifisch nur in Tachyzoiten oder Bradyzoiten exprimiert werden (Lunde und Jacobs 1983; Kasper 1989).

Im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* kommt es bei Mensch und Tier nach etwa sieben Tagen zu einem Anstieg des IgM-Titers, der jedoch nach drei bis fünf Wochen in der Regel wieder abfällt. IgG-Antikörper können hingegen teils lebenslang nachgewiesen werden (Remington 1974; Krahenbuhl und Remington 1982; Sharma 1990; Partanen et al. 1984). Während hohe IgG-Titer in Verbindung mit IgM-Antikörpern auf eine akute oder akut reaktivierte Toxoplasmose hindeuten, sprechen niedrige IgG-Titer bei negativem IgM für einen deutlich länger zurückliegenden Infektionszeitpunkt (Naot und Remington 1980). Selbst bei immunsupprimierten Patienten, welche akut an einer Toxoplasmose erkranken, finden sich meist erhöhte Antikörper-Titer (Krick und Remington 1978). Bei AIDS-Patienten mit einer *Toxoplasma*-Encephalitis sind in bis zu 91 % IgG-Antikörper gegen *T. gondii*

nachweisbar, jedoch bleiben Titerveränderungen oder IgM-Nachweise im Verlauf der Erkrankung häufig aus (Ammassari et al. 1996; McCabe et al. 1983).

Die *In-vivo*-Wirksamkeit von Antikörpern gegen extrazelluläre *T. gondii* beruht unter anderem darauf, dass nach Bindung spezifischer Antikörper eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg erfolgt, der die Lyse der Parasiten einleitet (Schreiber und Feldmann 1980). Diesen Umstand macht sich diagnostisch auch der Sabin-Feldmann-Test zunutze (Sabin und Feldmann 1948). Der alternative Weg der Komplementkaskade hingegen bricht nach Bindung der C3-Komponente an die Strukturen der Toxoplasma-Membran ab, sodass der lytische Komplex nicht zustande kommt, da das C3-Fragment in ein inaktives iC3b-Fragment gespalten wird (Fuhrman und Joiner 1989).

Bei der angeborenen zellulären Immunreaktion im Rahmen der akuten Toxoplasmose kommt es zunächst zur Phagozytose der Parasiten durch Granulozyten und Makrophagen (Krahenbuhl und Remington 1982), wobei die Phagozytose dabei auch von Antikörpern über den Fc-Rezeptor gesteuert wird. Das zeigt sich z. B. daran, dass sowohl humane als auch murine Granulozyten nach Inkubation mit erregerspezifischen Antisera Toxoplasmen verstärkt phagozytieren (Anderson und Remington 1974; Stadtsbaeder et al. 1975). Darüber hinaus zeigten auch NK-Zellen, die ebenfalls zur Innate Immunity gehören und sowohl bei akuter als auch chronischer *Toxoplasma*-Infektion induziert werden (Hauser et al. 1982), eine höhere lytische Aktivität, wenn die Erreger mit Antikörpern beladen sind (Dannemann et al. 1989).

Neben FcR-vermittelten Signalen sind T-Zell-Cytokine wesentlich an der Aktivierung von antiparasitären Effekten in murinen (Hughes et al. 1987) und humanen (Anderson et al. 1976) Makrophagen beteiligt. Bei CD4 und CD8 handelt es sich um positive T-Zell-Klone, die auch

in der Lage sind, *T. gondii* direkt abzutöten (Khan et al. 1988; Khan et al. 1990). Sie sind besonders als Produzenten von protektiven und immunregulatorischen Zytokinen wichtig.

Als protektives Zytokin kommt dem Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) eine entscheidende Rolle zu, denn es ist nicht nur gegen *T. gondii* (Suzuki et al. 1988), sondern auch gegen andere Parasiten wie *Leishmania donovani* (Murray et al. 1985), *Schistosoma mansoni* (Esparza et al. 1987) und *Eimeria bovis* (Hughes et al. 1989) sowie gegen Bakterien wie *Chlamydia psittacii* (Murray et al. 1985), wirksam. Für die Abtötung der intrazellulären Parasiten in mit Interferon stimulierten Phagozyten sind in erster Linie reaktive Sauerstoffspezies – hauptsächlich Nebenprodukte der mitochondrialen Atmung (Forth et al. 1990) – im Rahmen des sogenannten „oxidative burst“ verantwortlich (Nathan et al. 1983). Auch die beim Abbau von L-Arginin zu L-Citrullin anfallenden Stickoxide (Hibbs et al. 1987) haben eine antiparasitäre Wirkung. Man unterscheidet hier die konstitutiven (cNOS) von den (Zytokin-)induzierbaren (iNOS) Enzymen (Hibbs et al. 1987). Der antiparasitäre Effekt kommt dabei durch direkte Interaktion von Stickoxiden mit der DNA sowie durch einen Verlust zweiwertigen Eisens im Zentrum katalytischer Enzyme der mitochondrialen Atmungskette oder des Citratzyklus (Liew und Cox 1991) zustande. Neben der Produktion toxischer Radikale können durch $\text{IFN}\gamma$ weitere antiparasitäre Effekte induziert werden, von denen die Induktion des tryptophanabbauenden Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) im Humansystem von besonderer Bedeutung ist. Da die IDO der zentrale in dieser Dissertation beschriebene Effektormechanismus ist, wird dieses Enzym im folgenden Kapitel ausführlich besprochen.

Auch durch eine Infektion mit *N. caninum* wird eine starke und protektive Immunantwort induziert. So kann die Infektion mit apathogenen Stämmen von *N. caninum* eine belastbare Immunität in Mäusen und Rindern induzieren (Bartley et al. 2008). Diesbezüglich können

existierende Daten aufzeigen, dass die zelluläre Immunabwehr bei der Kontrolle von *N. caninum* von besonderer Bedeutung ist. Insbesondere IFN γ ist für eine erfolgreiche Immunantwort essentiell (Innes et al. 1995).

1.5. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein tryptophanabbauendes Enzym, welches den ersten und geschwindigkeitslimitierenden Schritt im oxidativen Abbau von Tryptophan entlang dem sogenannten Kynureninweg katalysiert. Dabei entsteht auch das photometrisch messbare Kynurenin, welches zur Quantifizierung der IDO-Aktivität dient. Die IDO ist zum einen Teil der angeborenen und der adaptiven Immunantwort verschiedener Säugetiere – z. B. von Schweinen, Rindern und Menschen – gegenüber Parasiten, insbesondere gegenüber *T. gondii* (Däubener et al. 1993; Däubener et al. 2001). Zum anderen ist sie aber auch gegen Bakterien, beispielsweise *Staphylococcus aureus* (Schroten et al. 2001), Gruppe-B-Streptokokken (MacKenzie et al. 1998), Enterokokken (MacKenzie et al. 1999) und Chlamydien (Thomas et al. 1993), wirksam. Die IDO wird nach IFN γ -Stimulation von nahezu allen Zellarten exprimiert, zum Beispiel in Glioblastomzellen (Däubener et al. 1993), Endothelzellen (Däubener et al. 2001; Däubener 2009) oder wie im Falle der folgenden Versuche auch in Fibroblasten und Lungentumorzellen (MacKenzie et al. 2007). Sie ist – abhängig von der IFN γ -Dosis – in der Lage, das intrazelluläre Parasitenwachstum zu hemmen. Die Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase korreliert unmittelbar mit der Entstehung von N-Formylkynurenin in den entsprechenden Zellkulturen. N-Formylkynurenin ist ein toxischer Metabolit, welcher im Rahmen des Tryptophanabbaus entsteht. Die Kynureninkonzentration kann zur Bestimmung der IDO-Aktivität mittels des IDO-Assay photometrisch bei 492 nm gemessen werden (Däubener et al. 1994). Obwohl IFN γ häufig

alleine zur Vermittlung einer IDO-Induktion ausreichend ist, können auch andere Zytokine die IDO-Induktion beeinflussen, beispielsweise Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 1 (IL1). Für *T. gondii* Typ I ist beispielsweise bekannt, dass das Wachstum dieses Parasiten in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (Human Brain Microvascular Endothelial Cells, HBMEC) IDO-abhängig unterdrückt werden kann (Däubener et al. 2001). Dieser durch IFN γ vermittelte antiparasitäre Effekt wird in HBMEC-Zellen durch Kostimulation mit TNF α noch gesteigert (Däubener et al. 2001).

1.6. Eigene Fragestellung

Die weiter oben bereits aufgeführten deutlichen Ähnlichkeiten von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* führen zu mehreren Überlegungen:

- Ist eine Infektion menschlicher Zellen mit *N. caninum in vitro* möglich?
- Ist die Infektion mit *N. caninum* quantitativ mit einer *T.-gondii*-Infektion in der gleichen Zelllinie vergleichbar?
- Können humane Zellen das Wachstum von *N. caninum* unterbinden?
- Welcher Effektormechanismus in humanen Zellen ist gegen *N. caninum* wirksam?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde ein *In-vitro*-Kultursystem mit unterschiedlichen humanen Zelllinien aus dem ZNS sowie der Lunge und mit nativen humanen Fibroblasten etabliert.

N. caninum ist als wenig virulent beschrieben und ähnelt somit *T. gondii* von Typ II und III, welche in den hier durchgeführten Experimenten vergleichend analysiert wurden.

2. Material und Methoden

2.1. Herkunft, Kultivierung und Ernte der Zellen

Verwendet wurden Lungenkarzinomzellen (Alveolarzellen Typ II) A549 (American Type Culture Collection, Rockville USA) sowie humane Astrozytomzellen 86HG39 (Bilzer et al. 1991). Darüber hinaus wurden als Beispiel für native, nicht entartete Zellen humane Vorhautfibroblasten – HFF (Human foreskin fibroblasts) – von ATCC, LGC Standards, Wesel, Deutschland bezogen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge, USA) ausgesät und in Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM) kultiviert. Zur Kultur von 86HG39- und A549-Zellen wurde dem IMDM 5 % fetales Kälberserum (FCS, Cambrex, East Rutherford, USA) zugesetzt, zur Kultur von HFF-Zellen wurde IMDM mit 10 % FCS verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 5–7 Tagen bei 37 °C wurden die Zellen unabhängig davon, ob sie einem Experiment zugeführt wurden oder nicht, unter Zugabe von 0.25 % Trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, USA) von der Plastikoberfläche gelöst und weiterpassagiert. Die Ernte im Einzelnen fand wie folgt statt:

Nach Entfernen des alten Mediums wurden die Kulturflaschen mit PBS gespült, um das restliche Kulturmedium zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 5 ml 0.25 % Trypsin-EDTA vom Untergrund abgelöst (Einwirkzeit: 5–10 min). Nach Zugabe von frischem Medium mit FCS (10 ml) zur Inaktivierung des Trypsins wurde der Inhalt in eine Tube (50 ml) überführt und danach für 10 min bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 5 ml neuem Medium wurde nach Resuspension ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau angefärbt. Zudem wurde die Zellzahl mit einer Zellschälkammer bestimmt, bevor die Zellen in Experimente eingesetzt bzw. für weitere Zellpassagen verwendet werden konnten.

2.2. Kultivierung und Ernte von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum*

In den Experimenten wurden unterschiedliche Stämme von *T. gondii* Typ I (BK/RH), Typ II (Me49) und Typ III (C-Stamm) sowie ein Stamm *N. caninum* (Nc-1) verwendet. Die Kultivierung der Parasiten fand mit Hilfe von HFF-Zellen unter Zugabe von 10 % FCS statt. Nach Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge, USA) wurden diese mit Tachyzoiten der entsprechenden Parasiten beimpft und das Parasitenwachstum mikroskopisch kontrolliert. Ab dem 3–4 Tag waren alle Wirtszellen lysiert und die freigesetzten Parasiten konnten geerntet werden. Die Ernte wurde methodisch wie folgt durchgeführt:

Der Überstand in den Flaschen, in welchem sich nunmehr der Großteil der Parasiten befand, wurde abgenommen und in ein Röhrchen (15 ml) überführt. Die erste Zentrifugation fand bei 21 °C und 75 g für einen Zeitraum von 5 min statt. Dieser Schritt diente der Entfernung von Zellen und großen Zellresten, welche sich nunmehr als Sediment am Boden des Röhrchens sammelten, während die Parasiten im Überstand verblieben. Im zweiten Schritt wurde nach Überführung des bei der ersten Zentrifugation entstandenen Überstandes in ein weiteres Röhrchen bei 21 °C und 1000 g für 10 min zentrifugiert. Die Parasiten befanden sich nun mehrheitlich im Sediment, sodass der Überstand gänzlich entfernt werden konnte. Je nach Größe des Sediments wurden die Parasiten in 2–5 ml tryptophanfreiem Medium RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA) resuspendiert, mittels Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und danach dem Experiment zugeführt (Däubener et al. 1993). Eine Neuinfektion von HFF für eine weitere Vermehrung fand aus dem restlichen Überstand oder direkt aus dem Kulturüberstand statt. Die Infektionsdosis der neuen Kultur richtete sich nach der Wachstumsrate der unterschiedlichen Parasiten.

2.3. Photometrische Messung der Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase mittels IDO-Assay

Die Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase steht in direktem Zusammenhang mit der Konzentration von Kynurenin im Überstand der stimulierten Zellkulturen. Die Messung des Kynurenins erlaubt also einen direkten Rückschluss auf die IDO-Aktivität (Däubener et al. 1994). Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 96-Well-Flachbodenmikrotiterplatten in dem entsprechenden Kulturmedium in einer Anzahl von 3×10^4 pro Well ausgesät. Das Medium enthielt insgesamt 0.6 mM L-Tryptophan (0.08 mM im Standardmedium, 0.52 mM wurden zusätzlich zugegeben).

Rekombinantes IFN γ (Firma R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurde den Zellen in Konzentrationen von 1000, 300 und 100 U/ml zugegeben. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit Interleukin 1 (Firma R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) 100 U/ml stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur in Medium inkubiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37 °C wurden 160 μ l des Überstandes entfernt und in Spitzbodenmikrotiterplatten überführt. Dort wurden 10 μ l einer 30 % Trichloressigsäurelösung in jedes Well zugegeben, um die Proteine im Medium auszufällen. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, um N-Formylkynurenin in Kynurenin zu hydrolysieren. Nach Zentrifugation bei 600 g – zur Pelletierung der Proteinpräzipitate – wurden 100 μ l Überstand entnommen und in Flachbodenmikrotiterplatten überführt. Des Weiteren wurden 100 μ l einer 1.2 % 4-Dimethylamino-Benzaldehyd-Lösung in Eisessig (Ehrlich-Reagenz der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben. Der Eisessig wurde von Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen. Nach zehnmütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 492 nm mit einem Photometer der Firma Tecan (Grailsheim, Deutschland) gemessen.

2.4. Messung der Proliferation von *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* (³H-Uracil-Methode)

Das Wachstum von *N. caninum* und *T. gondii* wurde mittels der ³H-Uracil-Inkorporationsmethode gemessen (Innes et al. 1995; Pfefferkorn et al. 1977). Die Beschickung der Platten mit HFF-Zellen und den anderen Wirtszellen fand analog zu der des IDO-Assay statt, wobei das Medium zunächst nicht mit Tryptophan supplementiert wurde. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturen mit *T. gondii* oder *N. caninum* (2×10^4 Parasiten pro Well) infiziert. Ein Teil der Kulturen wurde gleichzeitig mit der Parasiteninfektion mit L-Tryptophan supplementiert (Endkonzentration 0,6 mM). Daraufhin wurden die nunmehr infizierten Zellen erneut 48 bis 96 Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit der unterschiedlichen Experimente wurde dem mikroskopisch sichtbaren Wachstum der Parasiten angepasst. Nach dieser Zeit wurden 10 µl 0.33 µCi ³H-Uracil/Vertiefung zugegeben und die Ansätze weitere 24 Stunden inkubiert, um die Proliferation zu erfassen. Dieses Verfahren wurde initial für die Messung der *Toxoplasma*-Proliferation etabliert. Es eignete sich, wie Vorversuche ergaben, auch zur Messung der Proliferation von *N. caninum*. Nach ca. 24 Stunden Inkubation mit ³H-Uracil wurden die Wirtszellen durch Einfrieren bei -20 °C lysiert. Nach dem Auftauen wurde die Proliferation der Parasiten mit einem Liquid-Szintillationsspektrometer in counts per minute (cpm) (1205 Betaplate, PerkinElmer, Jugesheim, Deutschland) gemessen.

2.5. Statistik

Die Daten der Experimente in den Abbildungen sind angegeben als Mittelwert +/- SEM, einmalig als Mittelwert +/- SD aus 1 bis 8 unabhängigen Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachmessung durchgeführt wurde. Zur Datenverarbeitung wurde die

GraphPadPrism-Software verwendet. Zum Vergleich der Daten kam der Student`s t-test für unpaare Gruppen zur Anwendung.

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsverhalten von *Toxoplasma gondii* Typ II und III in IFN γ -stimulierten Wirtszellen

Im folgenden Ergebnisteil soll gezeigt werden, dass der IFN γ -vermittelte antiparasitäre Effekt, welcher auf *T. gondii* Typ I (Stamm RH und BK) wirksam ist, in gleicher Weise auch auf *T. gondii* Typ II (Stamm ME49) und Typ III (Stamm C) wirkt. Abb. 3.1. zeigt, dass Typ-III-Parasiten in verschiedenen humanen Zellreihen – a) 86HG39 (Glioblastomzellen), b) HFF (menschliche Vorhautfibroblasten) und c) A549 (Lungentumorzellen) – proliferieren können.

Außerdem verdeutlicht die Abbildung, dass IFN γ in den entsprechenden Zellreihen einen antiparasitären Effekt induzieren kann.

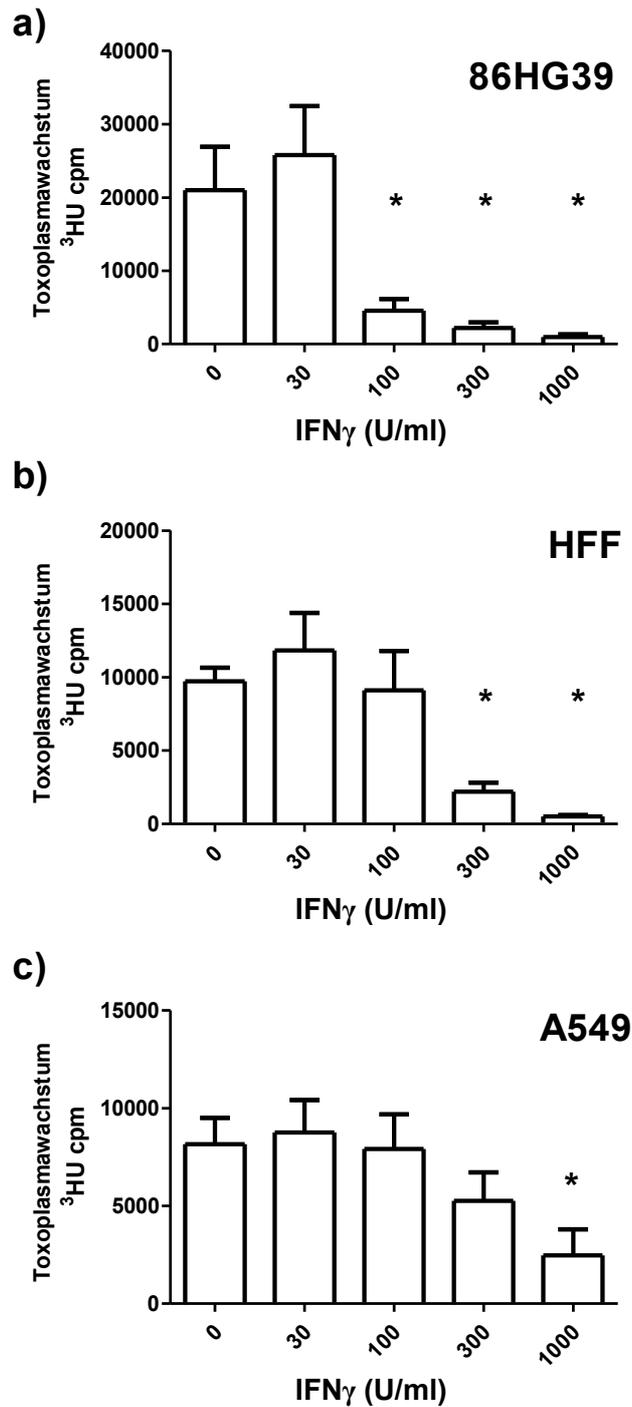


Abb. 3.1.: IFN γ -induzierte Hemmung des Wachstums von *Toxoplasma gondii* Typ III. Den frisch geernteten Zellen a) 86HG39, b) HFF und c) A549), je 3×10^4 Zellen pro Well, wurde IFN γ (Titrationstufen: 1000/300/100/30 U/ml) zugesetzt, die Kontrolle wurde in Medium ohne IFN γ vorbereitet. Nach ca. 72 Stunden Vorinkubation wurden die Platten mit *T. gondii* infiziert und die Toxoplasmaproliferation mittels der ^3H -Uracil-Methode gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM aus Dreifachbestimmungen aus a) zwei, b) drei und c) vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0.05$).

Zunächst lässt sich erkennen, dass die Positivkontrolle mit 10000 bis 20000 counts/min ein gutes Wachstum der Toxoplasmen Typ III in allen drei Zellreihen aufweist. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, dass nach Vorinkubation mit IFN γ alle drei Zellreihen eine Hemmung der intrazellulären Proliferation der Parasiten bewirken können. Hierbei zeigen sich jedoch deutliche quantitative Unterschiede. Um eine Hemmung von mehr als 50 % zu erreichen, benötigen die 86HG39-Zellen 100, die HFF-Zellen 300 und die A549-Zellen 1000 U/ml IFN γ . Im Falle der 86HG39-Zellen liegen bereits ab einer Dosis von 100 U/ml IFN γ die Proliferationswerte der Parasiten deutlich unter 5000 counts/min, also bei ca. 25 % der Positivkontrolle. Durch eine Vorbehandlung mit 1000 U/ml IFN γ wurde eine ca. 95-prozentige Reduktion des Parasitenwachstums erreicht. Bei den HFF-Zellen besteht ab 300 U/ml ein deutlicher Schutz gegenüber der Parasiteninfektion mit unter ca. 25 % der Positivkontrolle, während bei den A549-Zellen erst ab 1000 U/ml die Werte auf ca. 30 % der Positivkontrolle abfallen. Dies zeigt zunächst, dass auch ein Stamm *T. gondii* Typ III zu einer vergleichbaren *In-vitro*-Infektion der verwendeten Zellreihen in der Lage ist. Außerdem kann eine Wachstumshemmung der Parasiten durch eine IFN γ -Stimulation der verschiedenen Zelltypen erreicht werden. Die Ausprägung des antiparasitären Effektes ist jedoch abhängig von der Interferon-Dosis.

Im Anschluss soll nun geklärt werden, ob dieser antiparasitäre Effekt auf eine Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zurückzuführen ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde zunächst die IDO-Enzymaktivität in den verschiedenen Zellen quantitativ erfasst. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte +/- SEM. Sie wurden im Falle der HFF- und 86HG39-Zellen aus jeweils sechs sowie im Falle der A549-Zellen aus vier unabhängigen Experimenten jeweils mittels Dreifachmessung generiert. Abb. 3.2. zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse des IDO-Assays. Alle drei Zellreihen können nach

IFN γ -Stimulation Kynurenin produzieren, was sich anhand der photometrischen Messung belegen lässt. Ferner wurden hier, wie bereits in Abb. 3.1., quantitative Unterschiede zwischen den Zelllinien beobachtet. Während im Falle der 86HG39- und der HFF-Zellen bei 1000 U/ml IFN γ eine starke Kynureninproduktion (OD ca. 1,0) nachweisbar ist, erreichen A549-Zellen lediglich etwa 20 % dieses Wertes. Somit ist gezeigt, dass diejenigen Zelltypen, welche einen besonders starken antiparasitären Effekt vermitteln, gleichzeitig eine höhere Kynureninproduktion aufweisen. Im Umkehrschluss deutet das Ergebnis auf einen Zusammenhang zwischen der Stärke der IDO-Aktivität und der quantitativen Wachstumshemmung des Parasiten hin.

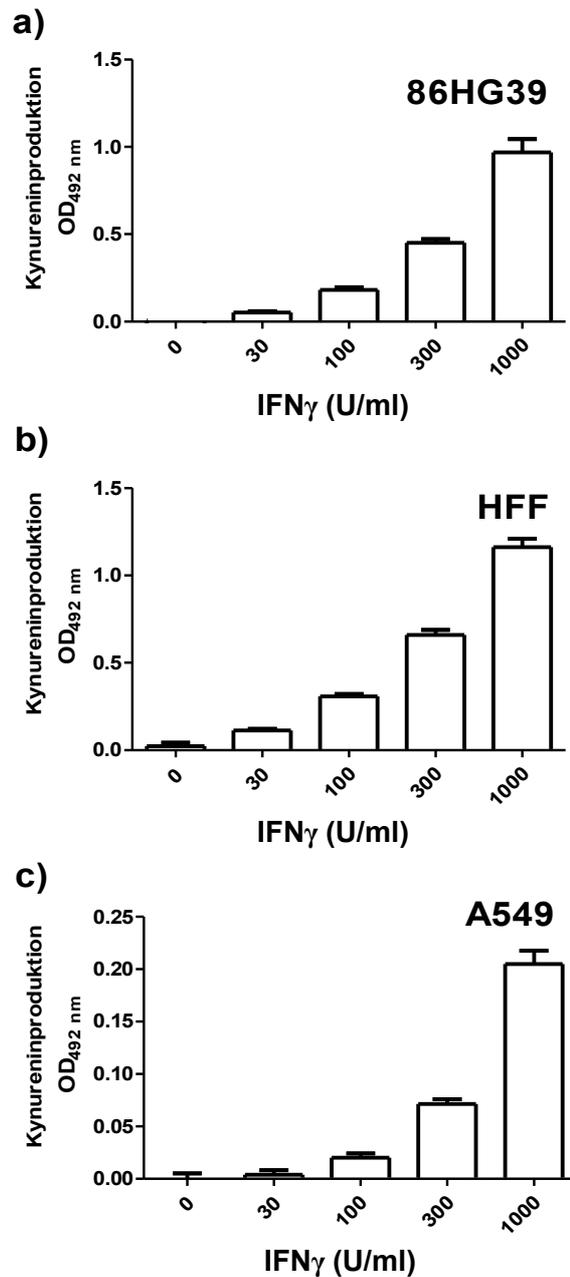
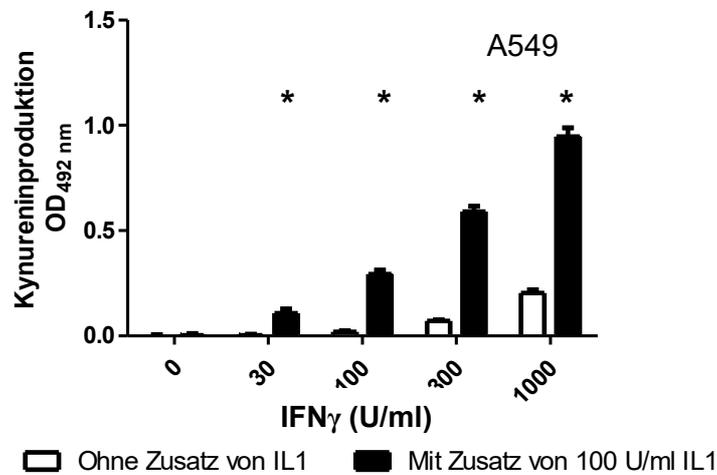


Abb. 3.2.: Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase in verschiedenen humanen Zellreihen: a) 86HG39, b) HFF, c) A549. Die entsprechenden Zelltypen (3×10^4 Zellen pro Well) wurden mit IFN γ stimuliert (Titrationstufen 30/100/300/1000 U/ml), die Kontrolle wurde in Medium ohne IFN γ vorbereitet. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde die Kynureninproduktion photometrisch bei OD 492 nm gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus Dreifachwerten aus sechs Experimenten mit HFF- und 86HG39-Zellen sowie vier Experimenten mit A549-Zellen.

Für A549-Zellen ist bereits bekannt, dass sich der IFN γ -vermittelte antiparasitäre Effekt der Indolamin-2,3-Dioxygenase auf Typ-I-Toxoplasmen durch eine zeitgleich erfolgende Zugabe des Interleukins IL1 verstärken lässt. Abb. 3.3. zeigt, wie sich die Zugabe von IL1 auf die Kynureninproduktion [Abb. 3.3. a)] und auf den antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* Typ III [Abb. 3.3. b)] in A549-Zellen auswirkt. Es ist erkennbar, dass IL1 in Abwesenheit von IFN γ keinen antiparasitären Effekt auslösen kann. Zudem wird auch die Kynureninproduktion nicht induziert. Ferner zeigt die Abbildung, dass IL1 kombiniert mit einer niedrigen IFN γ -Dosis (30 U/ml) nicht ausreicht, um das Wachstum von *T. gondii* Typ III in A549-Zellen zu hemmen. IFN γ in Konzentrationen von 1000 U/ml kann zwar bereits allein einen signifikanten antiparasitären Effekt auslösen, jedoch lässt sich dieser durch Kostimulation mit IL1 deutlich verstärken. Ein vergleichbarer kostimulatorischer Effekt lässt sich auch bei der IFN γ -Dosis von 300 U/ml beobachten.

Dies korreliert gut mit den Daten zur IDO-Aktivitätsmessung [Abb 3.2. a)], denn auch hier kann IL1 allein keine IDO-Aktivität auslösen, während es die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität deutlich verstärkt. Die entsprechenden Versuche wurden in gleicher Weise wie die bereits gezeigten Experimente durchgeführt. Die Daten sind somit ebenfalls als Mittelwerte +/- SEM angegeben. Es handelt sich hier um vier unabhängige Experimente für die IDO-Messung und zwei unabhängige Experimente für die Parasitenproliferation – jeweils als Dreifachmessung durchgeführt.

a)



b)

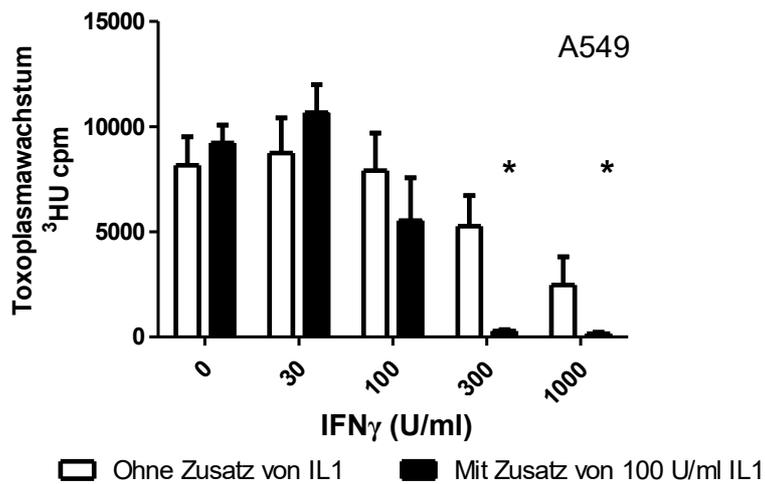


Abb. 3.3.: Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase in A549-Zellen ohne und unter Zugabe von IL1 (a) sowie korrelierendes Wachstum von *Toxoplasma gondii* Typ III (b). a) Durchführung der IDO-Messung wie in Abb. 3.2. beschrieben unter Zugabe von 100 U/ml IL1 (schwarz dargestellt) und zum Vergleich ohne IL1 (weiß dargestellt). b) Durchführung der Versuche in gleicher Weise wie in Abb. 3.1. beschrieben und Messung mittels ³H-Uracil-Methode. Positivkontrolle (weiß) ohne Zugabe von IL1 und unter Zugabe des Interleukins (schwarz). Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus drei [Teil a)] bzw. zwei [Teil b)] unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachmessung durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen mit und ohne IL1 sind mit * markiert.

Als Hinweis darauf, dass es sich bei dem beschriebenen antiparasitären Effekt tatsächlich um die Aktivität der L-Tryptophan-abbauenden Indolamin-2,3-Dioxygenase handelt, wurde für *T. gondii* Typ I nachgewiesen, dass der antiparasitäre Effekt durch die zeitgleich zur Infektion erfolgende Zugabe von L-Tryptophan antagonisierbar ist. Falls der in dieser Arbeit beobachtete IFN γ -getriggerte antiparasitäre Effekt auf Typ-III-Toxoplasmen ebenfalls über einen Tryptophanabbau vermittelt wird, sollte sich dieser Effekt auch hier durch die Zugabe von zusätzlichem L-Tryptophan aufheben lassen.

Abb. 3.4. a) und b) zeigt, dass sich der IFN γ -induzierte antiparasitäre Effekt durch die Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.52 mM) L-Tryptophan parallel zur Infektion mit Tachyzoiten von Typ-III-Toxoplasmen bei a) 86HG39-Zellen und b) HFF-Zellen nahezu vollständig aufheben lässt. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die Parasitenproliferation nach Zugabe von L-Tryptophan – unabhängig von der verwendeten IFN γ -Dosis – nicht mehr kontrollieren lässt. Dies gilt selbst für die Stimulation mit hohen Interferondosen (1000 U/ml IFN γ). Die Proliferationsrate der Parasiten steigt unabhängig von der verwendeten IFN γ -Dosis wieder auf bis zu 20000 counts/min an. Damit ist anzunehmen, dass die Wachstumskontrolle von Typ-III-Toxoplasmen ebenfalls auf die Aktivierung der Indolamin-2,3-Dioxygenase zurückzuführen ist.

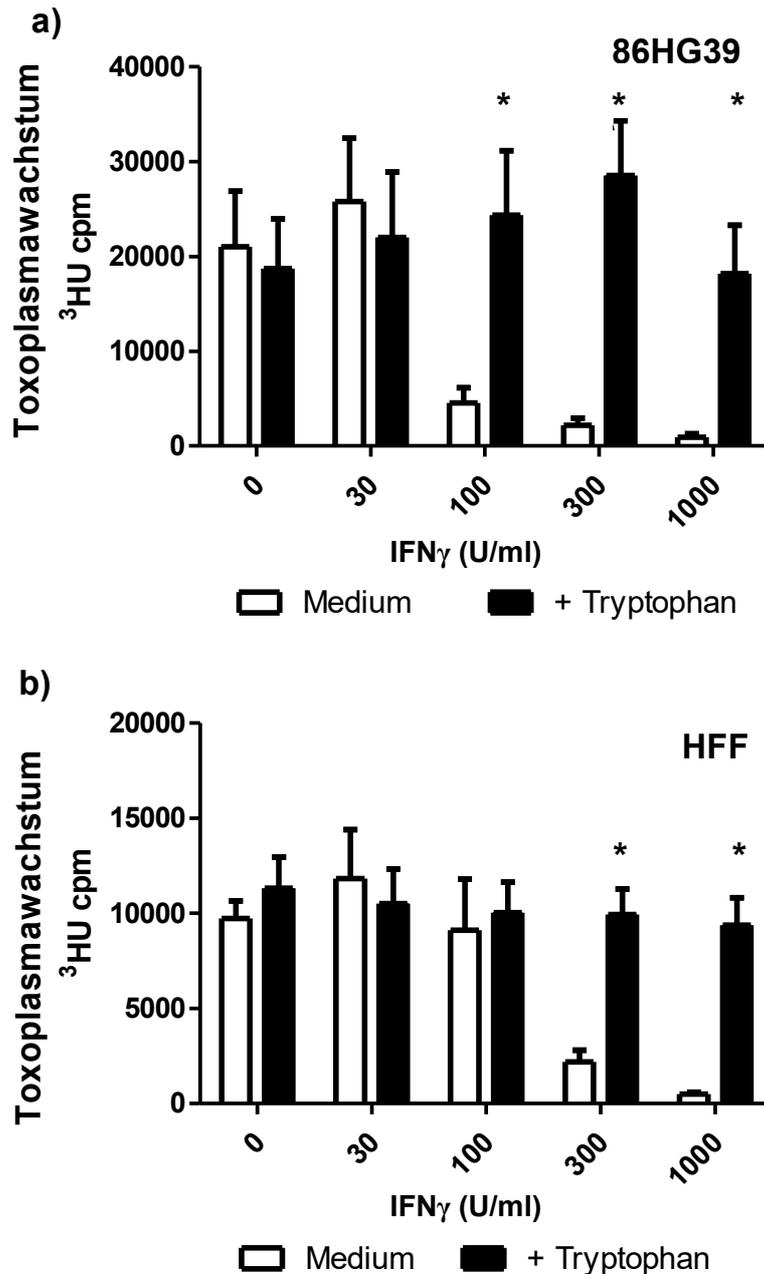


Abb. 3.4.: Aufhebung des antiparasitären Effektes gegen Typ-III-Toxoplasmen durch Tryptophansupplementation. Den Zellreihen 86HG39 (a) und HFF (b) (3×10^4 Zellen pro Well) wurde einerseits IFN γ (30 bis 1000 U/ml) zugesetzt, die Kontrolle wurde ohne das Interferon vorbereitet. Danach wurden beide Ansätze nach 72 Stunden Inkubationszeit mit *Toxoplasma gondii* (2×10^4 Parasiten) infiziert. Dem einen Ansatz wurden bei Toxoplasmainfektion ferner 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.52 mM) L-Tryptophan zugesetzt. Hiernach folgte die Messung der Proliferation mittels ^3H -Uracil-Methode. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM aus a) zwei bzw. b) drei unabhängigen Experimenten, jeweils als Dreifachmessung durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) durch die Tryptophansupplementation sind mit einem * gekennzeichnet.

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob der in Abbildung 3.3. durch IFN γ und IL1 synergistisch vermittelte antiparasitäre Effekt bei A549-Zellen ebenfalls durch eine Zugabe von Tryptophan antagonisiert werden kann. Abb. 3.5. a) zeigt, dass sich in den A549-Zellen durch eine Stimulation mit IFN γ in Abwesenheit von IL1 nur eine geringe Hemmung des Toxoplasmawachstums erzielen lässt. So führt eine hohe IFN γ -Dosis von 1000 Units/ml lediglich zu einer ca. 75-prozentigen Hemmung der Proliferation von *T. gondii* Typ III. Dieser Effekt kann durch Zugabe von Tryptophan aufgehoben werden. Abb. 3.5. b) zeigt, dass in Anwesenheit von IL1 die Proliferation von *T. gondii* Typ III bereits ab einer IFN γ -Dosis von 300 U/ml annähernd vollständig unterdrückt werden kann.

Auch hier steigt nach L-Tryptophan-Zugabe das Parasitenwachstum auf ca. 15000 counts/min an. Damit ist klar, dass auch der durch IL1 und IFN γ synergistisch vermittelte antiparasitäre Effekt auf einer IDO-vermittelten Tryptophanverarmung beruht. Dies zeigt, dass der Abwehrmechanismus gegen *T.-gondii*-Typ-III-Toxoplasmen in A549-Zellen mit dem bereits beschriebenen Effektormechanismus gegenüber *T. gondii* Typ I identisch ist.

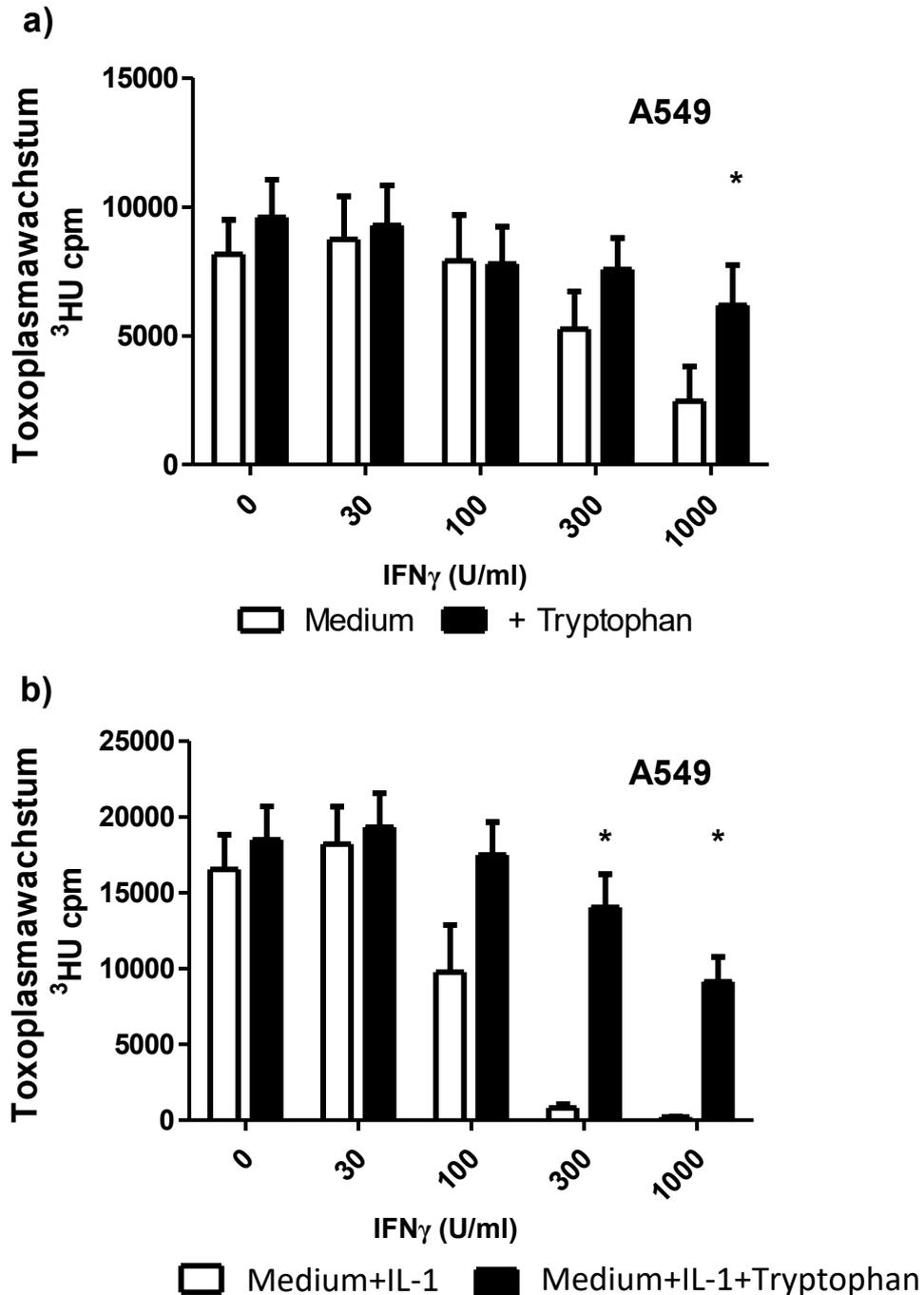


Abb. 3.5.: Proliferation, Hemmung von *Toxoplasma gondii* (Stamm C) und Tryptophanantagonismus in A549-Zellen ohne (a) und unter Zugabe von IL1 (b). Den A549-Zellen (3×10^4 Zellen pro Well) wurde einerseits IFN γ (30 bis 1000 U/ml) zugesetzt, die Kontrolle bestand aus unstimulierten Zellen. Danach wurden alle Ansätze nach 72 Stunden Inkubationszeit mit *Toxoplasma gondii* (Typ III 2×10^4) infiziert. Den jeweils schwarz dargestellten Ansätzen wurden ferner 100 $\mu\text{g/ml}$ L-Tryptophan zugesetzt. Im Falle b) wurde beiden Ansätzen zusätzlich IL1 zugegeben. Hiernach folgte die Messung der Proliferation mittels der ^3H -Uracil-Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten, die alle in Dreifachbestimmungen (drei Wells pro Experiment) durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) durch die Tryptophansupplementation sind mit einem * gekennzeichnet.

In allen bisher erwähnten Experimenten wurden Tachyzoiten des niedrig virulenten Typs III verwendet. Ähnliche Ergebnisse konnten aber auch unter Verwendung der intermediär virulenten Typ-II-Toxoplasmen (hier ME49) erzielt werden.

Exemplarisch zeigt Abb. 3.6., dass IFN γ -aktivierte HFF-Zellen in der Lage sind, das Wachstum von *T. gondii* Typ II zu hemmen, obwohl die Proliferationsrate der Parasiten in der Positivkontrolle, bei gleicher Zellzahl und Infektionsdosis, deutlich höher lag als bei dem in Abbildung 3.5 verwendeten *T. gondii* Typ III. Der proliferationshemmende Effekt ist allerdings unabhängig vom quantitativen Parasitenwachstum deutlich ausgeprägt. Ab einer IFN γ -Dosis von 300 U/ml sind HFF-Zellen in der Lage, das Parasitenwachstum deutlich zu inhibieren, bei 1000 U/ml ist eine mehr als 90-prozentige Reduktion des Parasitenwachstums erkennbar. Der von HFF-Zellen vermittelte antiparasitäre Effekt gegenüber *T. gondii* Typ II wird ebenfalls durch eine Zugabe von Tryptophan antagonisiert. Das Parasitenwachstum steigt auch hier bei Stimulation mit hohen IFN γ -Dosen wieder auf Werte im Bereich der Positivkontrolle an.

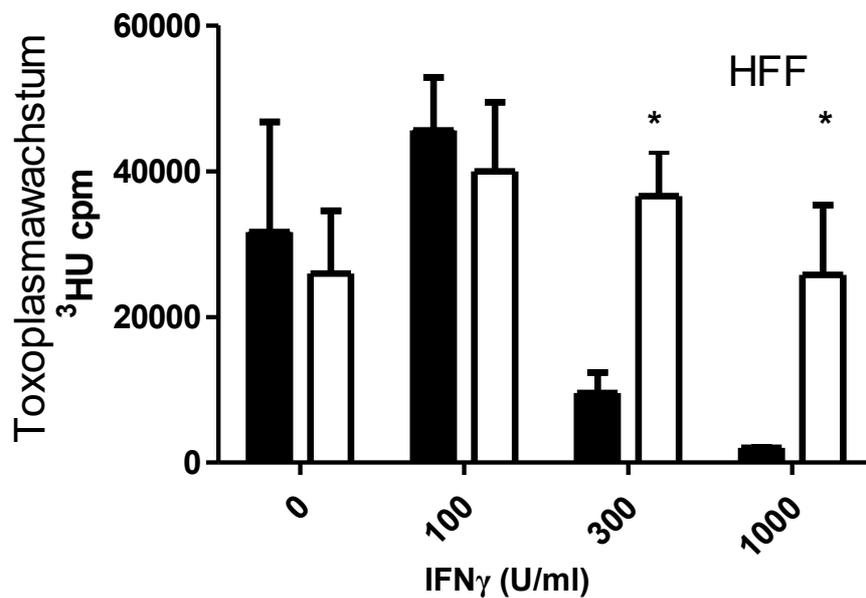


Abb. 3.6. Proliferation, Hemmung und Tryptophanantagonismus von *Toxoplasma gondii* Typ II (ME49) in menschlichen Vorhautfibroblasten (HFF). Der Versuch wurde bzgl. Zell- und Parasitenzahl sowie der Inkubationszeiten identisch zum unter 3.4. b) beschriebenen Experiment durchgeführt. Das Parasitenwachstum wurde mittels der ^3H -Uracil-Methode gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus einem Experiment, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die schwarz dargestellten Balken zeigen die Hemmung des Parasitenwachstums, die weißen Balken stellen den antagonisierenden Effekt von supplementiertem Tryptophan dar. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) durch die Tryptophansupplementation sind mit einem * gekennzeichnet.

3.2. Wachstumsverhalten von *Neospora caninum* in verschiedenen humanen Wirtszellen

Da nun der antiparasitäre Effekt der Indolamin-2,3-Dioxygenase auf unterschiedlich virulente *Toxoplasma-gondii*-Stämme gezeigt ist, soll als Nächstes untersucht werden, ob dieser Effektormechanismus auch bei verwandten Parasitenarten, hier *N. caninum*, wirksam ist. Da *N. caninum* nicht zu den zoonotischen Parasiten gehört, wurde zunächst überprüft, ob *N. caninum* in der Lage ist, verschiedene menschliche Zellen – im vorliegenden Fall 86HG39-, HFF- und A549-Zellen – *in vitro* zu infizieren. Dazu wurden erneut jeweils 3×10^4 Zellen pro Zellreihe mit 2×10^4 Parasiten der Gattung *N. caninum* bzw. *T. gondii* Typ I und Typ III infiziert und das Parasitenwachstum nach 3 Tagen Inkubation mit der ^3H -Uracil-Methode gemessen. Abbildung 3.7. zeigt nun, dass sich *N. caninum* in allen analysierten Zelltypen vermehren kann, und zwar im ungefähr gleichen quantitativen Ausmaß wie *T. gondii* Typ I und Typ III.

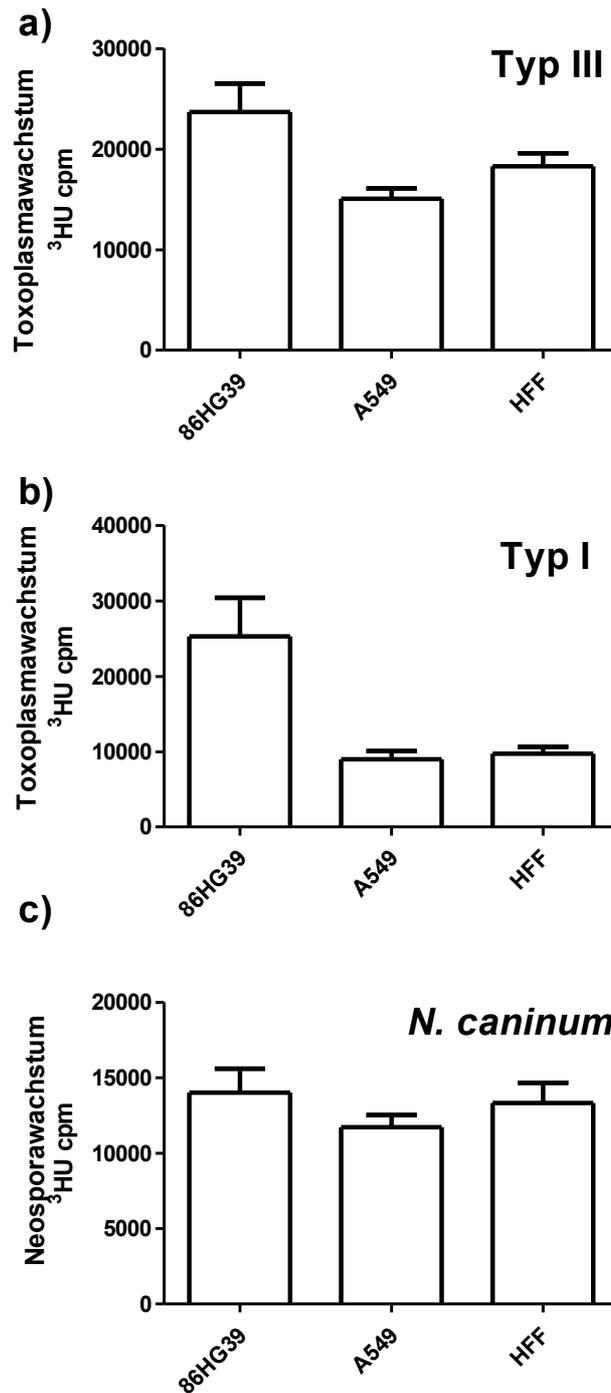


Abb. 3.7.: Proliferation von *Toxoplasma-gondii*-Stämmen Typ I und Typ III und *Neospora caninum* in verschiedenen humanen Zellen (86HG39, A549 und HFF). Die Zellreihen (3×10^4 Zellen pro Well) wurden nach 72 Stunden Inkubationszeit mit *Toxoplasma gondii* [Stämme: a) Typ III, b) Typ I (RH)] und *Neospora caninum* (c) mit je 2×10^4 Parasiten/Well infiziert. Hiernach folgte die Messung der Proliferation mittels der ³H-Uracil-Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM, a) 86HG39-Zellen aus vier, A549-Zellen und HFF-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten, b) 86HG39-Zellen und HFF-Zellen aus je drei, A549-Zellen aus vier unabhängigen Experimenten, c) 86HG39-Zellen aus sieben, A549-Zellen aus neun und HFF-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.3 IFN γ -vermittelte Hemmung des Wachstums von *Neospora caninum* in Zellen humanen Ursprungs

Nachdem gezeigt worden ist, dass eine erfolgreiche Infektion humaner Zellen mit *Neospora caninum in vitro* möglich ist, soll im nächsten Schritt analysiert werden, ob in diesen Zellen durch IFN γ -Stimulation ein antiparasitärer Effekt auf *N. caninum* ausgelöst werden kann und ob auch in diesem Fall die Indolamin-2,3-Dioxygenase als antiparasitärer Effektormechanismus wirksam ist. Für diese Analysen wurden identische Versuchsbedingungen gewählt wie in den Experimenten mit *Toxoplasma gondii*.

Abb. 3.8. zeigt eine quantitativ vergleichbare Proliferation von *N. caninum* in den gewählten drei Zellreihen. Überall wurden je ca. 10000 counts/min in der Positivkontrolle erzielt. Der antiparasitäre Effekt einer IFN γ -Stimulation gegenüber *N. caninum* zeigt sich in HFF und 86HG39 vergleichbar gut. Bei einer Stimulation mit 300 U/ml IFN γ war eine mehr als 90-prozentige Wachstumshemmung von *N. caninum* messbar. Auch A549-Zellen können die Proliferation von *N. caninum* hemmen, hier ist allerdings eine Dosis von 1000 U/ml IFN γ notwendig, um eine mehr als 90-prozentige Hemmung des Parasitenwachstums zu erzielen.

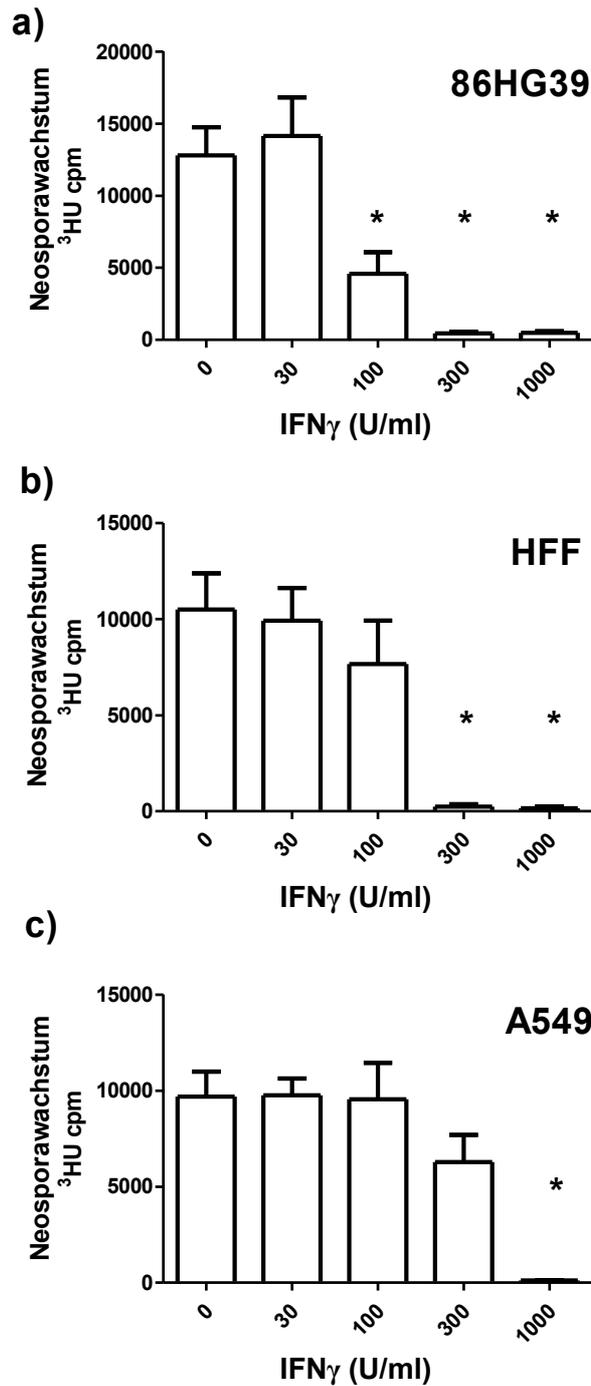


Abb. 3.8.: Proliferation und Wachstumshemmung von *Neospora caninum* in verschiedenen humanen Zellreihen [a) 86HG39, b) HFF, c) A549] in Abhängigkeit von der Dosis des IFN γ . Den frisch geernteten humanen Zellen (3×10^4 Zellen pro Well) wurde IFN γ (Titrationstufen: 1000/300/100/30 U/ml) zugesetzt, die Kontrolle wurde in Medium belassen. Danach wurden die Ansätze nach 72 Stunden Inkubationszeit mit *Neospora caninum* (2×10^4 Parasiten) infiziert. Hiernach folgte die Messung der Parasitenproliferation mittels ^3H -Uracil-Methode. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM aus a) fünf, b) drei, c) zwei unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Eine signifikante Hemmung ($p < 0.05$) des Parasitenwachstums im Vergleich zur Mediumkontrolle ist durch * gekennzeichnet.

Abschließend soll im Folgenden geklärt werden, ob der zuvor festgestellte IFN γ -vermittelte antiparasitäre Effekt gegen *N. caninum* auf eine Wirkung der Indolamin-2,3-Dioxygenase zurückzuführen ist. Dass alle drei Zellreihen (86HG39, HFF und A549) nach IFN γ -Stimulation Tryptophan abbauen, ist aus Vorversuchen bekannt, die bereits exemplarisch in Abb. 3.2. gezeigt wurden. Abb. 3.9. ist nun zu entnehmen, dass der durch IFN γ ausgelöste antiparasitäre Effekt auch im Falle einer *N.-caninum*-Infektion durch die Zugabe von L-Tryptophan nahezu vollständig antagonisierbar ist.

Die synergistische Wirkung von IL1 und IFN γ auf das Toxoplasmenwachstum in A549-Zellen ist auch im *N.-caninum*-Infektionsmodell nachweisbar, wie Abb. 3.10. zeigt. Während in den entsprechenden Experimenten 300 U/ml IFN γ notwendig sind, um eine ca. 75-prozentige Hemmung des Parasitenwachstums zu vermitteln, sind in Anwesenheit von IL1 bereits 100 U/ml IFN γ für einen identischen Effekt ausreichend. Auch in diesen Experimenten kann die Wachstumshemmung von *N. caninum* durch Zugabe von 0.52 mM (100 μ g/ml) L-Tryptophan vollständig antagonisiert werden.

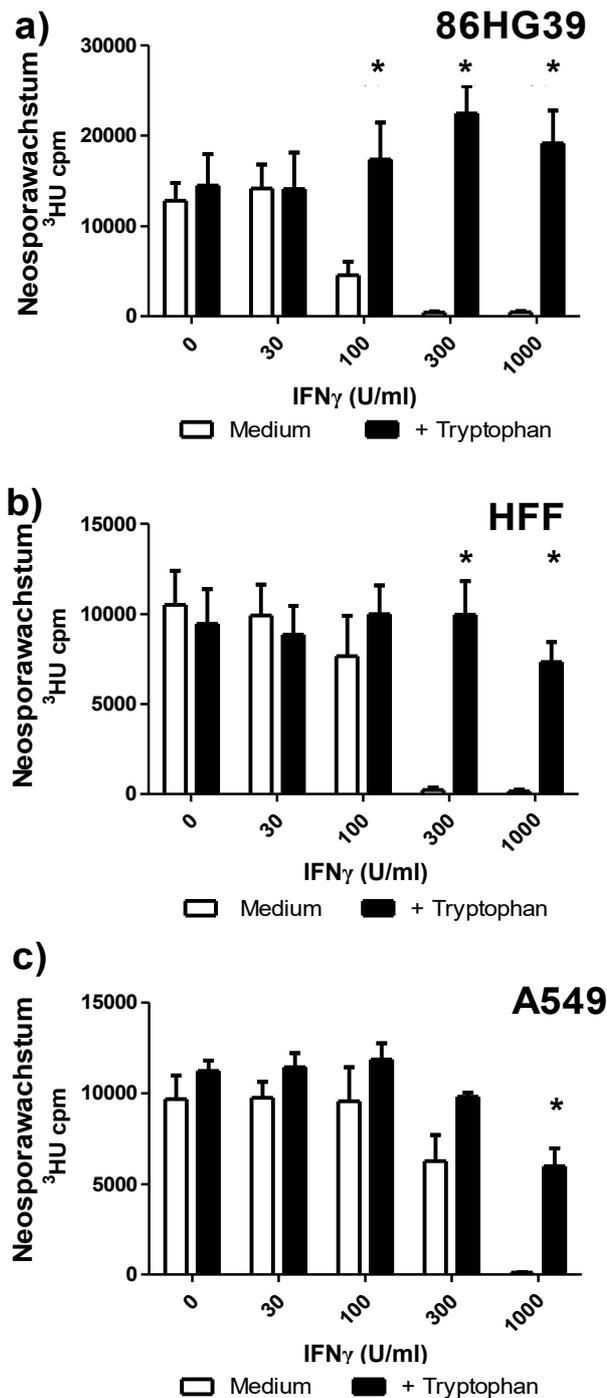


Abb. 3.9.: Die Wachstumshemmung von *Neospora caninum* in unterschiedlichen IFN γ aktivierten humanen Zellen kann durch Tryptophansupplementation aufgehoben werden. Der Versuch wurde bzgl. Zell- oder Parasitenanzahl in gleicher Weise durchgeführt, wie unter Abb. 3.8. beschrieben. Einem Teil der Kulturen wurden zusätzlich 100 μ g/ml L-Tryptophan zugesetzt. Anschließend erfolgte die Messung mittels 3 H-Uracil-Methode. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, a) 86HG39-Zellen aus zwei, b) HFF-Zellen aus drei und c) A549-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) durch die Tryptophansupplementation sind mit einem * gekennzeichnet.

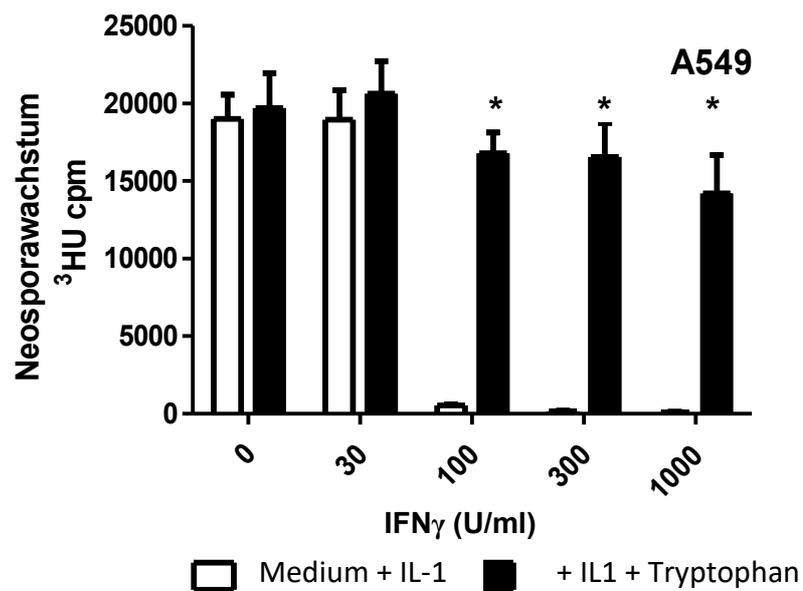


Abb. 3.10.: IDO-abhängige Hemmung von *N. caninum* in IFN γ /IL1-stimulierten A549-Zellen. In diesem Experiment wurden die A549-Zellen unter identischen Bedingungen wie in Abbildung 3.9. c) verwendet, außer dass alle Kulturen zusätzlich mit 100 U/ml IL1 versetzt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass in Anwesenheit von IL1 bereits 100 U/ml IFN γ ausreichen, um einen antiparasitären Effekt auszulösen, der durch Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden kann. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als Dreifachmessungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) durch die Tryptophansupplementation sind mit einem * gekennzeichnet.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Indolamin-2,3-Dioxygenase einen antiparasitären Effektormechanismus darstellt, der gegen die Stämme *T. gondii* Typ II und Typ III und zusätzlich auch gegen *N. caninum* wirksam ist. Ferner ist dieser Effekt sowohl bei *T. gondii* Typ II und III als auch bei *N. caninum* nahezu vollständig durch die Zugabe von L-Tryptophan antagonisierbar. Darüber hinaus ist die Intensivierung des antiparasitären Effektes, welcher bei *T. gondii* zu beobachten ist, bei den A549-Zellen durch Kostimulation mit IFN γ und IL1 auch bei einer *In-vitro*-Infektion mit *N. caninum* erkennbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Immunantwort ausgewählter humaner Zellen gegen *Neospora caninum* untersucht. Dieser obligat intrazelluläre Parasit löst zwar im Menschen keine symptomatische Erkrankung aus, ist aber wegen seiner Fähigkeit, Nutztiere zu infizieren, von großer ökonomischer Bedeutung.

N. caninum ist die Hauptursache für Aborte in der Nutztierhaltung bei Rindern. Die Prävalenz der Neosporose bei Rindern ist hoch: Man geht von einer 20- bis 70-prozentigen Seropositivität aus. Dabei ist zu beachten, dass die Seroprävalenz sich – auch in regional eng zusammenliegenden Herden – sehr stark unterscheidet und in individuellen Herden von 0 % bis zu 70 % reicht (Corbellini et al. 2005). Das Abortrisiko bei seropositiven Rindern ist drei- bis siebenmal höher als bei seronegativen Tieren. Die *N.-caninum*-induzierten Aborte bei Rindern richten zudem einen nicht zu verachtenden ökonomischen Schaden an (Innes et al. 2007). Um also im landwirtschaftlichen Bereich den wirtschaftlichen Verlust zu reduzieren, wäre eine Impfung gegen *N. caninum* das wirksamste Mittel.

Eine Infektion von Rindern löst eine starke humorale Immunantwort aus. Um eine Durchseuchung mit *N. caninum* in Herden zu ermitteln, werden üblicherweise serologische Methoden verwendet. Antikörper sind bei der Abwehr von *N. caninum* jedoch nur gering protektiv, denn sie können nur die extrazellulären Erreger erkennen und besonders über komplementvermittelte Lyse abtöten. Die intrazellulär replizierenden Parasiten in der parasitophoren Vakuole sind hingegen für Antikörper nicht zugänglich. Um diese Erreger zu eliminieren, sind somit eine zelluläre Immunantwort und die Produktion von IFN γ essentiell. Es besteht aber kein Zweifel daran, dass IFN γ eines der wichtigsten Zytokine bei der Wachstumskontrolle von *N. caninum* bei Mäusen darstellt. Zum Beispiel sind Balb/c-Mäuse normalerweise immun gegen eine akute Infektion mit *N. caninum*, sie entwickeln aber eine

chronische Infektion. Bei IFN γ -defizienten Balb/c-Mäusen hingegen geht dieser Infektionsschutz verloren und die Mäuse sterben in der akuten Phase der Infektion (Nishikawa et al. 2001).

Dabei wird IFN γ von vielen Zellen im Organismus produziert, wobei CD4-positive T-Helfer-Zellen von Typ 1 die größte Bedeutung haben. Daneben kann IFN γ auch von CD8-positiven T-Zellen und NK-Zellen sowie in geringeren Mengen auch von Makrophagen und Granulozyten produziert werden. Neben der bekannten IFN γ -Produktion durch T-Zellen bei der Neosporose konnte besonders eine intensive IFN γ -Produktion von bovinen NK-Zellen nach Kontakt mit neosporainfizierten bovinen Fibroblasten nachgewiesen werden (Boysen et al. 2006).

Die Abwehr gegen eine Infektion mit *N. caninum* während der Trächtigkeit stellt ein besonderes Problem dar, weil sich zu diesem Zeitpunkt ein semiallogener Fötus im Uterus befindet und eine gewisse Immunsuppression zum Schutz der ungeborenen Frucht notwendig ist. Andererseits ist eine proinflammatorische TH1-Reaktion zur effektiven Abwehr gegen *N. caninum* notwendig. Im Tierexperiment mit trächtigen Mäusen zeigte sich die Immunsuppression oder die Toleranz gegenüber dem fetalen Gewebe abhängig von der Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (Munn et al. 1998).

In nicht schwangeren Mäusen ist die TH1-Reaktion der entscheidende protektive Mechanismus nach einer Infektion mit *N. caninum*, während bei der Neuinfektion schwangerer Mäuse eine insgesamt schwächere Immunantwort zu beobachten ist. Ferner kam es hier zu einer stärkeren TH2-Reaktion bei fortschreitender Infektion, wobei Progesteron den regulierenden Faktor für die T-Zellantwort darstellt (Kano et al. 2005; Kano et al. 2007).

Bei Rindern hingegen zeigte sich im Rahmen der experimentellen Infektion mit *N. caninum* eine ausgeprägte T-Zell-Aktivierung unabhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme während der Trächtigkeit. Dabei wurden von den CD4-positiven Zellen sowohl TH1-Zytokine wie

IFN γ als auch TH2-Zytokine wie IL4 unabhängig vom Gestationsalter produziert (Rosbottom et al. 2007), was bei trächtigen Rindern gegen eine ausschließliche TH1-Reaktion spricht.

Bei der experimentellen Infektion von Mäusen wurden verschiedene Impfstoffe zur Verhinderung der Neosporose eingesetzt. Zum einen wurden durch *In-vitro*-Kultur attenuierte Neosporen (Bartley et al. 2008) verwendet, die zu einer Reduktion der Letalität nach Infektion mit Wildtypen führten. Zum anderen wurde das Oberflächenprotein NcSRS2 (*N. caninum* SAG1-related sequence 2), eines der Hauptoberflächenantigene, in Kombination mit einem Adjuvans verabreicht (Pinitkiatisakul et al. 2008). Dadurch ließ sich eine deutliche Reduktion der Parasitämie und der Parasitenzahl im Gehirn erreichen. Als Immunantwort nach Vakzinierung wurde eine T-Helfer-Zell-Antwort vom Typ 1 beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach einer natürlichen Infektion mit *N. caninum* (Lopez-Giatus et al. 2007) festgestellt.

Die Produktion von IFN γ im Rahmen einer TH1-Antwort ermöglicht eine Aktivierung von Abwehrmechanismen – sowohl in Zellen des Immunsystems als auch in normalen Körperzellen wie Astrozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Für die Abwehr gegen *N. caninum* ist IFN γ essentiell, jedoch sind die durch IFN γ induzierten Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Erreger speziesspezifisch.

In Mäusen ist die durch IFN γ induzierte NO-Synthase (iNOS) ein wichtiger Effektormechanismus gegen viele Erreger, z. B. auch gegen *Toxoplasma gondii* (Bogdan et al. 2000). Dabei ist für eine maximale iNOS-Induktion eine Kostimulation mit IFN γ , IL1 und TNF α notwendig. Die iNOS ist dabei nicht nur in immunkompetenten murinen Zellen ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen *T. gondii*, sondern auch in Zellen mit überwiegend regenerativen Eigenschaften, wie z. B. murine mesenchymale Stammzellen. Diese können nach iNOS-Induktion das Wachstum von Toxoplasmen hemmen (Meisel et al. 2011). In Bezug auf *N. caninum* konnten beispielsweise Tanaka et al. zeigen, dass IFN γ -aktivierte

murine Makrophagen in der Lage sind, das Wachstum von *N. caninum* zu unterbinden (Tanaka et al. 2000). Dieser gegen *N. caninum* gerichtete Effekt konnte erfolgreich durch N^GMMA (N^G-monomethyl-L-Arginin), einem kompetitiven Inhibitor der induzierbaren Stickstoff-Oxid-Synthase (iNOS), blockiert werden. Stickoxide stellen einen der bekanntesten Effektormechanismen gegen Mikroorganismen bei Mäusen dar (Bogdan et al. 2000), während der iNOS im Humansystem nur geringe antiparasitäre Aufgaben zukommen. Dazu passt die Beobachtung, dass iNOS-defiziente Mäuse anfälliger gegenüber einer experimentellen Infektion mit *N. caninum* waren als Artgenossen des Wildtyps. *N. caninum* ist ein Erreger, der insbesondere in der Spätphase der Infektion eine Encephalitis auslösen kann. Pinhero et al. konnten zeigen, dass sich *N. caninum* in nativen Ratten-Astrozyten replizieren kann und dass die Infektion die Produktion des Zytokins TNF α fördert, welches eine proinflammatorische Reaktion vermittelt (Pinhero et al. 2006). Diese proinflammatorische Reaktion kann einerseits zu einer Hemmung des Parasitenwachstums führen. Gleichzeitig wirken NO und TNF α neurotoxisch, womit sie wahrscheinlich mitverantwortlich für die neuropathologischen Symptome und die Klinik der Neosporose bei Mäusen sind (Pinhero et al. 2006).

Die iNOS übernimmt in murinen Zellen nicht nur antiparasitäre Aufgaben, sondern kann zudem auch die zelluläre Immunantwort negativ beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die durch Toxoplasmeninfektion ausgelöste TH1-Immunantwort zur gesteigerten iNOS-Induktion führt und damit als Feedback-Mechanismus eine Hemmung der Interleukin-Produktion zur Folge hat (Candolfi et al. 1994; Candolfi et al. 1995). Später konnte die Arbeitsgruppe um Salinas zeigen, dass regulatorische T-Zellen zu einer weiteren Verminderung der IL2-Konzentration führen und damit zusätzlich immunsuppressiv wirken (Salinas et al. 2013). Dieser immunsuppressive Effekt der iNOS im Rahmen einer Toxoplasmeninfektion wurde bisher nur in murinen Zellen in *Ex-vivo*-Experimenten gefunden.

Neben der iNOS sind im murinen System auch IFN γ -induzierte GTPasen beschrieben, die sich an die parasitophore Vakuole (PV) von *T. gondii* anlagern, zu einer Ruptur der Membran der PV führen und somit eine Elimination des Erregers bewirken (Howard et al. 2011). Unklar ist, ob – wie in einigen Fällen beschrieben – danach auch die von *T. gondii* befallene Wirtszelle in Apoptose geht (Niedelmann et al. 2013). Von diesen GTPasen zu unterscheiden sind p47-GTPasen (sogenannte IRGs) (Taylor et al. 2004) und p65-GTPasen (GBPs) (Degrandi et al. 2007). Jede dieser GTPase-Familien besteht aus mehreren untereinander homologen Proteinen. Der Beitrag der GTPasen zur Abwehr von *T. gondii* ist in vielen *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimenten belegt. Die Bedeutung der GTPasen bei der Abwehr von *N. caninum* war zum Zeitpunkt dieser experimentellen Arbeiten jedoch noch völlig unklar. Mittlerweile konnten allerdings die Arbeitsgruppen um Däubener (Spekker et al. 2013) und um Adam James Reid zeigen, dass sowohl p47- als auch p65-GTPasen sich nach IFN γ -Vorstimulation der murinen Wirtszellen an die frühe PV anlagern und damit wahrscheinlich Abwehraufgaben übernehmen (Reid et al. 2012). Im murinen System wurde festgestellt, dass virulente Toxoplasmen GTPasen inaktivieren können (Degrandi et al. 2007), wobei das Parasitenprotein ROP18 eine entscheidende Rolle spielt. Das ROP18-homologe Gen in *Neospora caninum* ist jedoch ein Pseudogen und daher nicht in der Lage, IRGs zu phosphorylieren und dadurch zu inaktivieren (Reid et al. 2012). Damit kann angenommen werden, dass GTPasen in murinen Zellen ungehindert gegen *N. caninum* wirksam sind. Bisher ist jedoch die Abwehrleistung der GTPasen nur im Mausmodell gut untersucht. Beim Menschen sind p47-GTPasen im Genom weitestgehend deletiert. Es ist nur ein IRG-homologes Protein beim Menschen bekannt, das aber im Humansystem keine Abwehrleistung übernimmt und auch keine enzymatisch aktive Region besitzt (Gazzinelli et al. 2014).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist auch die durch IFN γ induzierte Indolamin-2,3-Dioxygenase an der Abwehrleistung beteiligt. Der durch die IDO vermittelte Tryptophanabbau ist, zumindest in humanen Zellen, ein wichtiger antiparasitärer Effektormechanismus. Dieser Effekt wurde zunächst in Fibroblasten, später aber auch in Endothelzellen (Däubener et al. 2001; Däubener et al. 2009), Glioblastomzellen (Däubener et al. 1993) und mesenchymalen Stammzellen (Meisel et al. 2011) beschrieben. Diese IDO-Induktion spielt jedoch im murinen System nur eine untergeordnete Rolle (Däubener et al. 2009; Meisel et al. 2011). So zeigen nach Befunden von Murakami und Divanovic IDO-defiziente Mäuse eine quantitativ und qualitativ normale Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii* (Murakami et al. 2012; Divanovic et al. 2012). Andere Modelle belegen einen geringen Effekt der IDO auf gentechnisch veränderte und somit tryptophanabhängige *Mykobakterium-tuberculosis*- (Zhang et al. 2013) bzw. *Francisella-tularensis*-Stämme (Peng und Monack 2010).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand nun in der Analyse dahingehend, ob die IDO auch antiparasitäre Effekte gegen *N. caninum* vermitteln kann. Dazu wurden *In-vitro*-Kultursysteme mit humanen Fibroblasten, Glioblastomzellen und Lungentumorzellen verwendet. Diese Zellen exprimieren – wie aus der Literatur bekannt und im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt – nach IFN γ -Stimulation die IDO (Pfefferkorn et al. 1984; Däubener et al. 1993; Heseler et al. 2008). Dabei kann diese induzierte IDO-Aktivität durch Zugabe von TNF α bzw. IL1 zelltypspezifisch gesteigert werden.

In einer zweiten Analyse konnte gezeigt werden, dass o. g. Zellen nach IFN γ -Stimulation fähig sind, das Wachstum von *N. caninum* zu hemmen. Dabei war auffallend, dass die unterschiedliche Stärke der IDO-Induktion in den einzelnen Ansätzen mit der Effektivität des antiparasitären Effektes korreliert. Zum Beweis der Annahme, dass die IDO diesen antiparasitären Effekt vermittelt, wurden Supplementationsexperimente durchgeführt, in

denen den IFN γ -stimulierten Kulturen große Mengen an Tryptophan zugesetzt wurden. Dadurch konnte der antiparasitäre Effekt in allen Fällen aufgehoben werden, was die Rolle der Tryptophandepletion als antiparasitären Effekt beweist.

Wie bereits erwähnt, spielt dieIDO-Induktion als Abwehrmechanismus in humanen Zellen eine große Rolle, nicht jedoch in Zellen murinen Ursprungs. Es stellt sich somit die Frage, ob dieIDO nur im Humansystem antimikrobielle Effekte vermittelt. Zudem liegt eine Arbeit vor, welche zeigt, dass zumindest porcine Zellen nach IFN γ -StimulationIDO exprimieren und dieIDO-Aktivität ausreicht, um antibakterielle Effekte gegen *Streptococcus suis* zu vermitteln (Adam et al. 2004).

Unter Verwendung des hier etablierten *In-vitro*-Systems zur Bestimmung antiparasitärer Effekte gegen *N. caninum* wurden in unserer Arbeitsgruppe weiterführende Analysen durchgeführt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Rinderhirnzellen nach Stimulation mit IFN γ und TNF α das Wachstum von *N. caninum* hemmen können. Dieser antiparasitäre Effekt in Rinderzellen kann durch N^GMMA nicht aufgehoben werden, was zu der Annahme führt, dass die iNOS in diesem System keine Rolle als antimikrobieller Effektormechanismus spielt. In unserer Arbeitsgruppe wurden vergleichbare Experimente mit bovinen Fibroblasten und Endothelzellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind mittlerweile publiziert und belegen, dass bovine Fibroblasten und Endothelzellen nach Stimulation mit bovinem IFN γ eineIDO-Aktivität aufweisen und dass dieseIDO ursächlich an der Hemmung des *N.-caninum*-Wachstums in diesen Zellen beteiligt ist (Spekker et al. 2009).

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass sich *N. caninum* in unterschiedlichen humanen Zellen vermehren kann. IFN γ kann in immortalisierten und in nativen humanen Zellen Abwehrmechanismen gegen *N. caninum* induzieren. Die IFN γ -induzierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelt die für die Wachstumshemmung von

N. caninum in humanen Zellen entscheidenden Abwehreffekte. Außerdem kann die Effektivität der IFN γ -vermittelten Abwehr gegen *N. caninum* in Lungenkarzinomzellen durch eine Kostimulation mit IL1 verstärkt werden.

5. Zusammenfassung

Neospora caninum ist ein Apikomplexparasit, eng verwandt mit *Toxoplasma gondii*. Natürlicherweise tritt der Parasit hauptsächlich bei Hunden und Rindern auf. Er ist jedoch in der Lage, auch andere Lebewesen zu infizieren, beispielsweise artverwandte Raubsäuger des Hundes oder auch Ziegen und rinderähnliche Wildtiere. *Neospora caninum* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, und sein Wachstum wird *in vivo* hauptsächlich durch die zelluläre Immunantwort reguliert.

Bei der Abwehr gegen *N. caninum* spielt Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) *in vitro* und *in vivo* eine entscheidende Rolle.

Die vorliegende Doktorarbeit zeigt,

- dass sich *N. caninum* in unterschiedlichen humanen Zellen vermehren kann,
- dass $\text{IFN}\gamma$ in immortalisierten und in nativen humanen Zellen Abwehrmechanismen gegen *N. caninum* induzieren kann,
- dass die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) die für die Wachstumshemmung von *N. caninum* in humanen Zellen entscheidenden Abwehreffekte vermittelt,
- dass die Effektivität der $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Abwehr gegen *N. caninum* in Lungenkarzinomzellen durch eine Kostimulation mit IL1 verstärkt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adam R A, Tenenbaum T, Valentin-Weigand P, Laryea M, Schwahn B, Angelow S, Galla HJ, Däubener W, Schrotten H. 2004.** Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis in vitro. *Infect Immun* 72:3084-3087.
2. **Ammassari A, Murri R, Cingolani A, De Luca A, Antinori A. 1996.** AIDS-Associated Cerebral Toxoplasmosis: An Update on Diagnosis and Treatment. *Curr Top Microbiol Immunol* 219:209-222.
3. **Anderson S E and Remington J S. 1974.** Effect of normal and activated human macrophages on *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 139:1154-1174.
4. **Anderson S E, Bautista S and Remington J S. 1976.** Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocyte products. *J Immunol* 117:381-387.
5. **Bartley P M, Wright S, Chianini F, Buxton D, and Innes E A. 2008.** Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. *Parasitology* 135:13-21.
6. **Beyer T, Sim V, Hutchinson W. 1977.** Cytochemistry of *Toxoplasma gondii*. VI Polysaccharides, lipids and phosphatase on cyst forms. *Tsitogia* 19:979.
7. **Bilzer T, Stavrou D, Dahme E, Keiditsch E, Burrig K F, Anzil A P, and Wechsler W. 1991.** Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418:281-293.
8. **Bjerkas I, Mohn S F, and Presthus J. 1984.** Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70:271-274.
9. **Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. 2000.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
10. **Boothroyd J C. 2009.** *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* 39:935-946.
11. **Boysen P, Klevar S, Olsen I, and Storset A K. 2006.** The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infect Immun* 74:953-960.

12. **Candolfi E, Hunter C A, Remington J S.** 1994. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 62:1995-2001.
13. **Candolfi E, Hunter C A, Remington J S.** Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 63:751-6.
14. **Corbellini L G, Pescador C A, Smith D R, Schmitz M, Correa A, Steffen D J, Driemeier D.** Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev Vet Med.* 74:130-41.
15. **Dannemann B R, Morris V A, Araujo F G, Remington J S.** 1989. Assessment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cysts. *J Immunol* 143:2684-2691.
16. **Däubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim K S, and Schrotten H.** 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* in Human Brain Microvascular Endothelial Cells by Activation of Indoleamine-2,3-Dioxygenase. *Infect Immun* 69:6527-6531.
17. **Däubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer H G, and Hadding U.** 1994. A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods* 168:39-47.
18. **Däubener W, Schmidt S K, Heseler K, Spekter K H, MacKenzie C R.** 2009. Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells. Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase. *Thromb Haemost* 102:1110-1116.
19. **Däubener W, Pilz K, Seghrouchni Z S, Bilzer T, Fischer H G, and Hadding U.** 1993. Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol* 43:31-38.
20. **Degrandi D, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Würthner J, Kurig S, Beer S, Pfeffer K.** 2007. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 179:7729-7740.
21. **Divanovic S, Sawtell N M, Trompette A, Warning J I, Dias A, Cooper A M, Yap G S, Arditi M, Shimada K, Duhadaway J B, Prendergast G C, Basaraba R J, Mellor A L, Munn D H, Aliberti J, Karp C L.** 2012. Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *J Infect Dis* 205:152-161.
22. **Dönges J.** 1988. Parasitologie. Thieme Verlag, 2. Auflage.

23. **Dubey J P, Hattel A L, Lindsay D S, and Topper M J. 1988.** Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 193:1259-1263.
24. **Dubey J P, Miller N L and Frenkel J K. 1970.** The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132:636-662.
25. **Dubey J P, Schares G, Ortega-Mora L M. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20:323-367.
26. **Dubey J P. 2003.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41:1-16.
27. **Esparza I, Männel D, Ruppel A, Falk W and Krammer P H. 1987.** Interferony and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 166:589-594.
28. **Filisetti D, and Candolfi E. 2004.** Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 40:71-80.
29. **Forth W, Henschler D and Rummel W. 1990.** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag Mannheim, 5. Auflage.
30. **Fuhrmann S A and Joiner K A. 1989.** *Toxoplasma gondii*: Mechanism of resistance to complement-mediated killing. *J Immunol* 142:940-947.
31. **Gazzinelli R T, Mendonça-Neto R, Lilue J, Howard J, Sher A. 2014.** Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe* 15:132-138.
32. **Hauser W E, Sharma S D and Remington J S. 1982.** Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell Immunol* 69:330-346.
33. **Heseler K, Spekker K, Schmidt S K, MacKenzie C R, and Däubener W. 2008.** Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:273-281.
34. **Hibbs J B, Taintor R R and Vavrin Z. 1987.** Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 239:473-476.
35. **Howard J C, Hunn J P, Steinfeldt T. 2011.** The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* 14:414-421.
36. **Hughes H P A, Boik R J, Gerhardt S A and Speer C A. 1989.** Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing. *J Parasitol* 75:489-497.

37. **Hughes H P A, Speer C A, Kyle J E and Dubey J P. 1987.** Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 55:784-791.
38. **Innes E A, Panton W R, Marks J, Trees A J, Holmdahl J, and Buxton D. 1995.** Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of ³H-Uracil. *J Comp Pathol* 113:95-100.
39. **Innes E A, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I and Buxton D. 2005.** The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108:29-36.
40. **Innes E A. 2007.** The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134:1903-1910.
41. **Joiner K A, Fuhrmann S A, Miettinen H M, Kaspar L H and Mellman I. 1990.** *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc-receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249:641-646.
42. **Kano R, Kudo A, Kamiya H, Kobayashi Y, Maeda R, and Omata Y. 2007.** C57BL/6 mice infected with *Neospora caninum* during administration of progesterone show bias toward type 2 immune response. *J Vet Med Sci* 69:1095-1097.
43. **Kano R, Masukata Y, Omata Y, Kobayashi Y, Maeda R, and Saito A. 2005.** Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 129:159-164.
44. **Kasper L H. 1989.** Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 57:668-672.
45. **Khan I A, Smith K A and Kasper L H. 1988.** Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 141:3600-3605.
46. **Khan I A, Smith K A and Kasper L H. 1990.** Induction of antigen specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J Clin Invest* 85:1879-1886.
47. **Krahenbuhl J L and Remington J S. 1982.** The immunology of *Toxoplasma* and *Toxoplasmosis*. *Immunology of parasitic infection*. Second Edition S Cohen and K Warren editors Blackwell scientific London: 356-421.
48. **Krick J A and Remington J S. 1978.** *Toxoplasmosis in the adult – an overview*. *N Engl J Med* 298:550-553.

49. **Laliberte J and Carruthers V B. 2008.** Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Cell Mol Life Sci 65:1900-1915.
50. **Liew F Y and Cox F E G. 1991.** Nonspecific defence mechanism: The role of nitric oxide. J Immunoparasitol Elsevier Science Publishers Ltd: A17-A21.
51. **Lopez-Gatius F, Almeria S, Donofrio G, Nogareda C, Garcia-Ispierto I, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yaniz J L, Pabon M, de Sousa N M and Beckers J F. 2007.** Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. Theriogenology 68:1067-1073.
52. **Lunde M N and Jacobs L. 1983.** Antigenetic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 69:806-808.
53. **MacKenzie C R, Hadding U, Däubener W. 1998.** Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. J Infect Dis 178:875-878.
54. **MacKenzie C R, Heseler K, Müller A and Däubener W. 2007.** Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. Curr Drug Metab 8:237-244.
55. **MacKenzie C R, Hucke C, Müller D, Seidel K, Takikawa O, Däubener W. 1999.** Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells. J Med Microbiol 48:935-941.
56. **McAllister M M, Dubey J P, Lindsay D S, Jolley W R, Wills R A and McGuire A M. 1998.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 28:1473-1478.
57. **McCabe R E, Gibbons D, Brooks R G, Luft B J and Remington J S. 1983.** Agglutination test for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS. Lancet 1:680.
58. **McCann C M, Vyse A J, Salmon R L, Thomas D, Williams D J, McGarry J W, Pebody R and Trees A J. 2008.** Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans. England Emerg Infect Dis 14:978-980.
59. **Mehlhorn H. 1989.** Grundriß der Zoologie. UTB Gustav Fischer.
60. **Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bülle H, Woite C, Stuhlsatz S, Schwippert W, Jäger M, Sorg R, Henschler R, Seissler J, Dilloo D, Däubener W. 2011.** Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Leukemia 25:648-654.
61. **Montoya J G and Remington J S. 2008.** Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Infect Dis 47:554-566.

62. **Montoya J G, Liesenfeld O. 2004.** Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965-1976.
63. **Munn D H, Zhou M, Attwood J T, Bondarev I, Conway S J, Marshall B, Brown C and Mellor A L. 1998.** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193.
64. **Murakami Y, Hoshi M, Hara A, Takemura M, Arioka Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Funato T, Seishima M, Saito K. 2012.** Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine* 59:245-251.
65. **Murray H W, Sitalny G L and Nathan C F. 1985.** Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon. *J Immunol* 134:1619-1623.
66. **Naot Y, and Remington J S. 1980.** An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Inf Dis* 142:757-766.
67. **Nathan C F, Murray H W, Wiebe M E and Rubin B Y. 1983.** Identification of interferon as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 158:670-689.
68. **Niedelman W, Sprockholt J K, Clough B, Frickel E M, Saeij J P. 2013.** Cell death of gamma interferon-stimulated human fibroblasts upon *Toxoplasma gondii* infection induces early parasite egress and limits parasite replication. *Infect Immun* 81:4341-4349.
69. **Nishikawa Y, Tragoolpua K, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, Otsuka H, and Mikami T. 2001.** In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:811-816.
70. **Ossorio P N, Schwartzman J D, and Boothroyd J C. 1992.** A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol Biochem Parasitol* 50:1-16.
71. **Partanen P, Turnunen H J, Paasivuo R T A and Leiniki P O. 1984.** Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. *J Clin Microbiol* 20:133-135.
72. **Peng K, Monack D M. 2010.** Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* 78:2723-2733.
73. **Pfefferkorn E R and Pfefferkorn L C. 1977.** Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool* 24:449-453.

74. **Pfefferkorn E R. 1984.** Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc Natl Acad Sci USA 81:908-912.
75. **Pinheiro A M, Costa S L, Freire S M, Almeida M A, Tardy M, El Bacha R and Costa M F. 2006.** Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. Vet Immunol Immunopathol 113:243-247.
76. **Pinitkiatisakul S, Mattsson J G and Lunden A. 2008.** Quantitative analysis of parasite DNA in the blood of immunized and naive mice after infection with *Neospora caninum*. Parasitology 135:175-182.
77. **Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Diaz S, Rojo-Montejo S, Vazquez-Moreno E, Arnaiz I, Gomez-Bautista M, Jimenez-Palacios S, Ortega-Mora L M, Collantes-Fernandez E. 2010.** *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: seroepidemiological study and oocyst shedding. Vet Parasitol 174:332-335.
78. **Reid A J, Vermont S J, Cotton J A, Harris D, Hill-Cawthorne G A, Könen-Waisman S, Latham S M, Mourier T, Norton R, Quail M A, Sanders M, Shanmugam D, Sohal A, Wasmuth J D, Brunk B, Grigg M E, Howard J C, Parkinson J, Roos D S, Trees A J, Berriman M, Pain A, Wastling J M. 2012.** Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. PLoS Pathog 8:e1002567.
79. **Remington J S. 1974.** Toxoplasmosis in adult. Bull N Y Acad Med 50:211-227.
80. **Robibaro B, Hoppe H C, Yang M, Coppens I, Ngô H M, Stedman T T, Paprotka K, Joiner K A. 2001.** Endocytosis in different lifestyles of protozoan parasitism: Role in nutrient uptake with special reference to *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 31:1343-1353.
81. **Rosbottom A, Guy C S, Gibney E H, Smith R F, Valarcher J F, Taylor G, and Williams D J. 2007.** Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. Parasite Immunol 29:219-228.
82. **Sabin A B and Feldman H A. 1948.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting an protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108:660-663.
83. **Salinas N, Olguín J E, Castellanos C, Saavedra R. 2014.** T cell suppression in vitro during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells. Scand J Immunol 79:1-11.
84. **Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. 2014.** Animals are key to human toxoplasmosis. Int J Med Microbiol 304:917-929.

85. **Schreiber R D and Feldman H A. 1980.** Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J Infect Dis* 141:366-369.
86. **Schroten H, Spors B, Hucke C, Stins M, Kim K S, Adam R, Däubener W. 2001.** Potential Role of Human Brain Microvascular Endothelial Cells in the Pathogenesis of Brain Abscess: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Neuropediatrics* 32:206-10.
87. **Sehti K K und Piekarski G. 1987.** Immunological aspects of toxoplasmosis. Immune response in parasitic infections. *Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis Vol III* Ed E J Soulsby CRC Press.
88. **Seitz H M. 1990.** Mikrobiologie von *Toxoplasma*-Spezies. In: *Infektion durch Toxoplasma gondii*, herausgegeben von P W Shah, W Stille, SM Verlag 1991.
89. **Sharma S D. 1990.** Immunology of toxoplasmosis. *Modern parasite biology*. Editor D J Wyler, W H Freeman and Company N Y: 184-199.
90. **Siewing R. 1985.** Lehrbuch der Zoologie. Band 2 Systematik. Gustav Fischer Verlag, 3. Auflage.
91. **Soldati-Favre D. 2008.** Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: The glideosome. *Parasite* 15:197-205.
92. **Spekker K, Czesla M, Ince V, Heseler K, Schmidt S K, Schares G and Däubener W. 2009.** Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in the defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun* 77:4496-501.
93. **Spekker K, Leineweber M, Degrandi D, Ince V, Brunder S, Schmidt S K, Stuhlsatz S, Howard JC, Schares G, Degistirici O, Meisel R, Sorg RV, Seissler J, Hemphill A, Pfeffer K, Däubener W. 2013.** Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Med Microbiol Immunol*. 202:197-206.
94. **Stadtsbaeder S, Nguyen B T and Calvin-Preal M C. 1975.** Respective role of antibodies and immune Macrophages during acquired immunity against toxoplasmosis in mice. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 126:461-474.
95. **Suzuki Y, Orellana M A, Schreiber R D, Remington J S. 1988.** Interferon-gamma: The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240:516-8.
96. **Tanaka T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N and Mikami T. 2000.** Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitol Res* 86:768-771.

97. **Taylor G A, Feng C G, Sher A. 2004.** GTPases: Regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4:100-109.
98. **Thomas S M, Garrity L F, Brandt C R, Schobert C S, Feng G S, Taylor M W, Carlin J M, Byrne G I. 1993.** IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol* 150:5529-5534.
99. **Werk R. 1985.** How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis* 7:449-457.
100. **Zhang Y J, Reddy M C, Ioerger T R, Rothchild A C, Dartois V, Schuster B M, Trauner A, Wallis D, Galaviz S, Huttenhower C, Sacchetti J C, Behar S M, Rubin E J. 2013.** Tryptophan biosynthesis protects mycobacteria from CD4 T-cell-mediated killing. *Cell* 155:1296-308.

Eidesstattliche Versicherung

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

07.04.2019, Marcus Johannes Czesla

Lebenslauf

Name	Marcus Johannes Czesla
Geburtsdatum	03.03.1980
Geburtsort	Wesel
Anschrift	Bauerbahn 8, 41462 Neuss
1986 – 1990	Gemeinschaftsgrundschule Borth/Wallach
1990 – 1999	Andreas Vesalius Gymnasium Wesel
Juni 1999	Abiturprüfung
1999 – 2000	Zivildienst im Pflegezentrum am Wiesenhof in Rheinberg
2000 – 2003	Ausbildung zum Krankenpfleger an der Krankenpflegeschule des St. Bernhard-Hospitals in Kamp-Lintfort
August 2003	Staatsexamen Krankenpflege
2003 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
März 2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juli 2010 – November 2014	Assistenzarzt in Fachweiterbildung Pathologie am Institut für Pathologie der Kliniken der Stadt Köln Standort Merheim
Dezember 2014 – Mai 2015	Assistenzarzt in Fachweiterbildung Anästhesie Sana-Kliniken Düsseldorf-Gerresheim
Juni 2015 – heute	Assistenzarzt in Fachweiterbildung Anästhesie Lukas-Krankenhaus Neuss
Neuss, den 07.04.2019	

Die Rolle der Indolamin-2,3-Dioxygenase bei der Immunreaktion gegen *Neospora caninum* in humanen Zellen

Vorgelegt von:
Marcus Johannes Czesla

Neospora caninum ist ein Apikomplexparasit, eng verwandt mit *Toxoplasma gondii*. Natürlicherweise tritt der Parasit hauptsächlich bei Hunden und Rindern auf. Er ist jedoch in der Lage, auch andere Lebewesen zu infizieren, beispielsweise artverwandte Raubsäuger des Hundes oder auch Ziegen und rinderähnliche Wildtiere. *Neospora caninum* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, und sein Wachstum wird *in vivo* hauptsächlich durch die zelluläre Immunantwort reguliert.

Bei der Abwehr gegen *N. caninum* spielt Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) *in vitro* und *in vivo* eine entscheidende Rolle.

Die vorliegende Doktorarbeit zeigt,

- dass sich *N. caninum* in unterschiedlichen humanen Zellen vermehren kann,
- dass $\text{IFN}\gamma$ in immortalisierten und in nativen humanen Zellen Abwehrmechanismen gegen *N. caninum* induzieren kann,
- dass die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) die für die Wachstumshemmung von *N. caninum* in humanen Zellen entscheidenden Abwehreffekte vermittelt,
- dass die Effektivität der $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Abwehr gegen *N. caninum* in Lungenkarzinomzellen durch eine Kostimulation mit IL1 verstärkt werden kann.