

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

**Vergleichende Analyse der Empfindlichkeit
verschiedener Stämme von *T. gondii* auf
unterschiedliche antimikrobielle
Effektormechanismen *in vitro***

Dissertation

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

vorgelegt von
Sara Maria Waldheim
(2021)

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Für Dagmar

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Elbers, F., Woite, C., Antoni, Valentina, **Stein, S.**, Funakoshi, H. Nakamura, T.,
Schaes, G., Däubener, W., Eller, SK. Negative Impact of Hypoxia on Tryptophan 2,3-
Dioxygenase Function. Mediators Inflamm. 2016: p. 1638916.

Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der zur Familie der Apicomplexa gehört. Hauptübertragungswege für den Menschen, den Zwischenwirt, sind die Aufnahme von *T. gondii* Oozysten über die Faeces von Katzen sowie die Aufnahme von Gewebszysten über nicht ausreichend gegartes Fleisch. Bei Immunkompetenten verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch. Unter Immunsuppression kann es zur Reaktivierung einer latenten Infektion kommen. Eine Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft kann zur vertikalen Transmission auf das Ungeborene und damit zum Auftreten schwerer Symptome wie Chorioretinitis, Taubheit und zerebralen Verkalkungen führen.

In Europa und Nordamerika kommen hauptsächlich drei klonale Stämme des Parasiten vor. Bei simultaner Infektion des Endwirtes, der Katze, mit unterschiedlichen klonalen Stämmen entstehen durch sexuelle Rekombination atypische Genotypen, die von klonalen Linien abweichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Empfindlichkeit typischer und atypischer *T. gondii* Stämme auf unterschiedliche antimikrobielle Effektormechanismen in murinen mesenchymalen Stromazellen (*mMSC*) untersucht. Diese weisen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Effektormechanismen auf. Einer davon ist die Produktion reaktiver NO-Verbindungen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Reaktive NO-Verbindungen interagieren mit Enzymen des Parasiten und hemmen bzw. beeinflussen für den Parasiten relevante Stoffwechselfvorgänge. Die Produktion reaktiver NO-Verbindungen führt zudem zur Depletion von Arginin, einer für den Parasiten essentiellen Aminosäure. Einen weiteren Effektormechanismus gegen *T. gondii* in *mMSC* stellen die sog. *Immunity-related GTPases (IRG)* dar. Als mögliche Mechanismen werden dabei beispielsweise eine Regulation der Parasitenphoren Vakuolen (PV) oder eine Beschleunigung der Abschnürung der PV diskutiert.

Um die Bedeutung antiparasitärer Effektormechanismen gegen *T. gondii* *in vitro* zu analysieren, wurden *mMSC* mit Tachyzoiten unterschiedlicher *T. gondii* Stämme infiziert. Eine Stimulation von *mMSC* mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β führte zu einer Hemmung des Wachstums sowohl klonaler als auch atypischer Stämme. Dieser inhibitorische Effekt auf das Parasitenwachstum ließ sich jedoch nur bei den hoch virulenten Klonen durch Zugabe des spezifischen iNOS-Inhibitors N^G-Monomethyl-L-Arginin (N^GMMA) antagonisieren. Dies legt den Schluss nahe, dass in *mMSC* neben der iNOS ein weiterer IFN- γ -induzierter Effektormechanismus eine Rolle bei der *T. gondii* Abwehr spielt. Im Folgenden wurde die IFN- γ -induzierte Rekrutierung der GTPase *Irgb6* zur PV atypischer *T. gondii* Klone mittels spezifischer Färbungen und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach Stimulation mit IFN- γ und Infektion mit einem Typ II Parasiten wurde bei der Mehrzahl der intrazellulären Parasiten eine Kolokalisation von *Irgb6* und PV detektiert. Bei Infektion mit einem Typ I Parasiten zeigte sich nur eine schwache Kolokalisation. IFN- γ -induzierte GTPasen scheinen somit bei der Abwehr niedrig und mäßig virulenter Stämme eine größere Rolle zu spielen als bei der Abwehr hoch virulenter Parasiten.

An Orten, an denen Inflammation stattfindet, besteht häufig eine relevante Hypoxie. Da viele antimikrobielle Effektormoleküle wie auch die iNOS Sauerstoff als Substrat benötigen, nimmt die Hypoxie Einfluss auf die Enzymaktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die iNOS auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv ist, verbunden jedoch mit einer geringeren NO-Produktion als unter Normoxie. *mMSC* konnten das Wachstum von *T. gondii* dennoch auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren. Im Gegensatz zur Normoxie führte die Zugabe von N^GMMA zu keinem signifikanten Anstieg des Parasitenwachstums.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *mMSC* das Wachstum von *T. gondii* mithilfe der iNOS und der *IRG* hemmen können. Dieser Effekt existiert auch unter Hypoxie. Während das Wachstum von Typ II und III Parasiten nach alleiniger Stimulation mit IFN- γ gehemmt wird, ist bei Typ I Parasiten eine Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β erforderlich. Im Falle der untersuchten atypischen *T. gondii* Stämme konnte keine strikte Korrelation zwischen der Virulenz in Mäusen, der Ausprägung von bestimmten Virulenzfaktoren und der Sensitivität gegenüber den untersuchten induzierten Effektormechanismen gezeigt werden.

Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that belongs to the Apicomplexa family. For humans serving as intermediate hosts, the main routes of transmission are the ingestion of *T. gondii* oocysts through the faeces of cats and the ingestion of tissue cysts through insufficiently cooked meat. In immunocompetent individuals, the primary infection is usually asymptomatic. A latent infection can be reactivated under immunosuppression. A primary maternal infection during pregnancy can lead to vertical transmission to the unborn child and thus to the appearance of severe symptoms such as chorioretinitis, deafness and cerebral calcifications.

There are predominantly three clonal strains of the parasite found in Europe and North America. When the cat - serving as the ultimate host - is simultaneously infected with different clonal strains, sexual recombination results in atypical genotypes that deviate from clonal lines. In the present study the sensitivity of typical and atypical *T. gondii* strains to different antimicrobial effector mechanisms in murine mesenchymal stromal cells (mMSC) was examined. These show a broad spectrum of antimicrobial effector mechanisms. One of them is the production of reactive NO compounds by inducible NO synthase (iNOS). Reactive NO compounds interact with enzymes of the parasite and inhibit or influence metabolic processes that are relevant for the parasite. The production of reactive NO compounds also leads to the depletion of arginine, an amino acid that is essential for the parasite. Another effector mechanism against *T. gondii* in mMSC are the so-called immunity-related GTPases (IRG). Possible mechanisms that are discussed here are, for example, regulation of the parasite-containing vacuoles (PV) or an acceleration of the constriction of the PV.

In order to analyze the importance of antiparasitic effector mechanisms against *T. gondii* in vitro, mMSC were infected with tachyzoites from different *T. gondii* strains. Stimulation of mMSC with IFN- γ , TNF- α and IL-1 β led to an inhibition of the growth of both clonal and atypical strains. However, this inhibitory effect on parasite growth could only be antagonized in the highly virulent clones by adding the specific iNOS inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginine (N^GMMA). This suggests that in mMSC another IFN- γ -induced effector mechanism plays a role in *T. gondii* defense in addition on iNOS. Therefore, in the following the IFN- γ -induced recruitment of the GTPase Irgb6 to the PV of atypical *T. gondii* clones was examined by means of specific staining and confocal immunofluorescence microscopy. After stimulation with IFN- γ and infection with a type II parasite, a colocalization of Irgb6 and PV was detected in the majority of the intracellular parasites. Infection with a type I parasite showed only weak colocalization. IFN- γ -induced GTPases hence seem to play a more significant role in the defense against low and moderately virulent strains than in the defense against highly virulent parasites.

Relevant hypoxia is often present in locations where inflammation occurs. Since many antimicrobial effector molecules, like the iNOS, require oxygen as a substrate, hypoxia influences the enzyme activity. In the present study it could be shown that the iNOS is also active under hypoxic conditions, but associated with a lower NO production than under normoxia. However, mMSC were able to inhibit the growth of *T. gondii* even under hypoxic culture conditions. In contrast to normoxia, adding N^GMMA did not lead to a significant increase in parasite growth.

In summary, it can be stated that mMSC can inhibit the growth of *T. gondii* with the help of iNOS and IRG. This effect also exists under hypoxia. While the growth of type II and III parasites is inhibited after stimulation with IFN- γ alone, type I parasites require co-stimulation with IFN- γ , TNF- α and IL-1 β . In the case of the examined atypical *T. gondii* strains, no strict correlation could be shown between the virulence in mice, the expression of certain virulence factors, and the sensitivity to the examined induced effector mechanisms.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner
°C	Grad Celsius
A	Amper
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	<i>Bicinchonicic Acid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
cm²	Quadratcentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence System</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81m/s ²)
GBP	Guanylat-bindende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase

IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	<i>Isocove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNOS	Induzierbare Nitrit Oxid Synthase
IRG	<i>Immunity-related GTPases</i>
Irgm	<i>Immunity-related GTPase family M protein</i>
LD 100	Letale Dosis, an der 100% der Tiere versterben
m	murin
mA	Milliampere
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mMSC	<i>murine mesenchymal stromal cells</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MYD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
n	Anzahl
NF_κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
N^GMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PO₄	Phosphat
PV	Parasitophore Vakuole
RNS	Ribonukleinsäure
ROP	Rhoprien Protein
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SAG1	<i>Surface Antigen 1</i>

SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
ü.N.	über Nacht
UPS-ROP18	<i>Upstream</i> von ROP18 codierender Sequenz
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
³-HU	radioaktiv markiertes Uracil

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie von <i>T. gondii</i>	1
1.2 Entwicklungszyklus von <i>T. gondii</i>	1
1.3 Humane Toxoplasmose	2
1.3.1 Postnatale Toxoplasmose	3
1.3.2 Kongenitale Toxoplasmose.....	3
1.4 Populationsstruktur von <i>T. gondii</i>	3
1.4.1 Klonale Stämme	3
1.4.2 Atypische Stämme.....	4
1.5 Das Immunsystem	5
1.6 Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	6
1.6.1 Angeborenes Immunsystem	6
1.6.2 Adaptives Immunsystem	6
1.7 IFN- γ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen <i>T. gondii</i>	7
1.7.1 Produktion reaktiver Stickstoffverbindungen	7
1.7.2 IFN- γ -induzierbare GTPasen	8
1.7.3 Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)	8

Inhaltsverzeichnis	VII
1.8 Ziele der Arbeit.....	10
2. Materialien und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Medien und Puffer	12
2.1.3 Geräte	13
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.5 Nukleotide.....	15
2.1.6 Zytokine.....	15
2.1.7 Antikörper	15
2.1.8 Kits.....	15
2.1.9 Zelllinien.....	16
2.1.10 Parasitenstämme.....	16
2.1.11 Software	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Zellkulturmethoden	17
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	22
2.2.3 Statistische Auswertung.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Analyse der Zytokin-induzierten Aktivität der iNOS in <i>mMSC</i>	25
3.2 Zytokin-induzierte Hemmung des Wachstums unterschiedlicher <i>T. gondii</i> in <i>mMSC</i>	27
3.2.1 <i>T. gondii</i> Typ I – BK.....	27
3.2.2 <i>T. gondii</i> Typ II – ME49	28
3.2.3 <i>T. gondii</i> Typ III – NED	29
3.2.4 C12.....	30
3.2.5 BoB.....	31
3.2.6 B6-H6.....	32
3.2.7 A-7.....	33

3.2.8 2-H8	34
3.3 Analyse der Kolokalisation von <i>Irgb6</i> an die PV atypischer <i>T. gondii</i> Stämme	35
3.3.1 IFN- γ -abhängige <i>Irgb6</i> -Expression in <i>mMSC</i>	36
3.3.2 Analyse der Kolokalisation von <i>Irgb6</i> und <i>T. gondii SAG1</i> in IFN- γ -stimulierten <i>mMSC</i>	36
3.4 Analyse antiparasitärer Effektormechanismen unter Hypoxie	40
3.4.1 Einfluss der Hypoxie auf die Zellzahl	40
3.4.2 Einfluss der Hypoxie auf die Zellviabilität	41
3.4.3 Aktivität der iNOS unter Hypoxie	42
3.4.4 Antiparasitärer Effekt der iNOS unter Hypoxie	43
4. Diskussion	45
4.1 iNOS-Aktivität in <i>mMSC</i> nach Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β	45
4.2 Murine mesenchymale Stromazellen können das Wachstum von <i>T. gondii</i> nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen inhibieren	46
4.3 IFN- γ induziert eine GTPasen-vermittelte Hemmung des Parasitenwachstums gegenüber mittel und niedrig virulenten <i>T. gondii</i>	47
4.4. Die iNOS ist auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv	52
4.5 Murine mesenchymale Stromazellen können das Wachstum von <i>T. gondii</i> auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren	54
4.6. Kritik und Ausblick	55
5. Literaturverzeichnis	57

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Infektionszyklus von Toxoplasma gondii.</i>	2
<i>Abb. 2: Entstehung neuer oder atypischer T. gondii-Genotypen</i>	4
<i>Abb. 3: IFN-γ-vermittelte Abwehrmechanismen gegen T. gondii.</i>	9
<i>Abb. 4: Prinzip der Färbung mit Calcein und Ethidium homodimer-1.</i>	22
<i>Abb. 5: Zytokin-vermittelte NO-Produktion in mMSC.</i>	25
<i>Abb. 6: Hemmung der Zytokin-vermittelte NO-Produktion in mMSC durch N^GMMA.</i>	26
<i>Abb. 7: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii BK Wachstums in mMSC.</i>	28
<i>Abb. 8: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii ME49 Wachstums in mMSC.</i>	29
<i>Abb. 9: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii NED Wachstums in mMSC.</i>	30
<i>Abb. 10: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii C12 Wachstums in mMSC.</i>	31
<i>Abb. 11: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii BoB Wachstums in murinen MSC.</i>	32
<i>Abb. 12: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii B6-H6 Wachstums in mMSC.</i>	33
<i>Abb. 13: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii A-7 Wachstums in mMSC.</i>	34
<i>Abb. 14: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii 2-H8 Wachstums in murinen MSC.</i>	35
<i>Abb. 15: Western Blot-Analyse zur Expression von Irgb6 in stimulierten und unstimulierten mMSC.</i>	36
<i>Abb. 16: Lokalisation von Irgb6 in mMSC nach Infektion mit T. gondii Typ I und II.</i>	38
<i>Abb. 17: Quantifizierung der Irgb6-Rekrutierung in mMSC zur PV unterschiedlicher T. gondii Stämme</i>	39
<i>Abb. 18: Proliferation nativer muriner MSC unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂).</i>	40
<i>Abb. 19: Zellviabilität nativer muriner MSC unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂).</i>	41
<i>Abb. 20: Zytokin-vermittelte NO-Produktion in murinen MSC unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂).</i>	42
<i>Abb. 21: Zytokin-induzierte Hemmung des T. gondii Wachstums in mMSC unter Hypoxie (1% O₂).</i>	43
<i>Abb. 22: Schematische Darstellung der protektiven Funktion von ROP18 für die Parasitophore Vakuole.</i>	49

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Antiparasitäre Effekte gegenüber <i>T. gondii</i> in murinen MSC.</i>	50
---	----

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirksamkeit antimikrobieller Effektormechanismen zur Immunabwehr des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Im Folgenden werden der Parasit und dessen klinische Bedeutung sowie die für die Arbeit relevanten Effektormechanismen dargestellt.

1.1 Taxonomie von *T. gondii*

Toxoplasma gondii ist ein bogenförmiger, obligat intrazellulärer Parasit, der zu der Gruppe der Apicomplexa gehört. Kennzeichnend für die Apicomplexa ist das Vorhandensein des Apikalkomplexes, ein Komplex verschiedener Organellen, der am apikalen Pol des Parasiten lokalisiert ist. Die dem Apikalkomplex zugeordneten Elemente ermöglichen die Invasion des Parasiten in die Wirtszelle und die Entstehung der Parasitophoren Vakuole, in der die Replikation des Parasiten stattfindet [1].

1.2 Entwicklungszyklus von *T. gondii*

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die sexuelle Vermehrung des Parasiten findet ausschließlich im Endwirt, der Katze, statt [2]. Nach Aufnahme der *T. gondii* Zysten über den Verzehr infizierter Beutetiere wird die Zystenwand im Dünndarm des Endwirtes enzymatisch lysiert. Die Bradyzoiten werden dort freigesetzt und durchwandern die Darmwand. Dort vermehren sie sich und entwickeln sich zu weiblichen und männlichen Gameten. Diese verschmelzen zu einer diploiden Oozyste. Beim Aufreißen der infizierten Darmzelle wird diese freigesetzt und über die Faeces ausgeschieden. Je nach Umweltbedingungen setzt ein bis mehrere Tage nach der Freisetzung der Prozess der Sporulation ein. Über kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser werden die sporulierten Oozysten vom Zwischenwirt, z.B. vom Menschen, oral aufgenommen. In dessen Darm entwickeln sich nun aus der sporulierten Oozyste schnell-replizierende Tachyzoiten. Diese wandern in das Darmepithel ein [3]. Nach Invasion in die Wirtszelle entsteht im Zytoplasma die Parasitophore Vakuole (PV). Diese schützt den Parasiten vor enzymatischer Zersetzung durch das endolysosomale System der Wirtszelle [4]. Die Tachyzoiten zeichnen sich durch rasche Vermehrung in der PV aus. Wenn die Wirtszelle platzt, werden die Tachyzoiten freigesetzt und gelangen in den Blutkreislauf und in die lymphatischen Organe des Zwischenwirtes. Hierüber gelangen sie in alle Organe und entwickeln sich dort zu sich langsam teilenden Bradyzoiten. Um sich vor einer Immunantwort zu schützen, bilden sie eine Zystenwand aus. In Gewebiszysten können die Bradyzoiten Jahre bis Jahrzehnte persistieren,

ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Über die orale Aufnahme von Gewebszysten wird ein erneuter Infektionszyklus hervorgerufen [5].

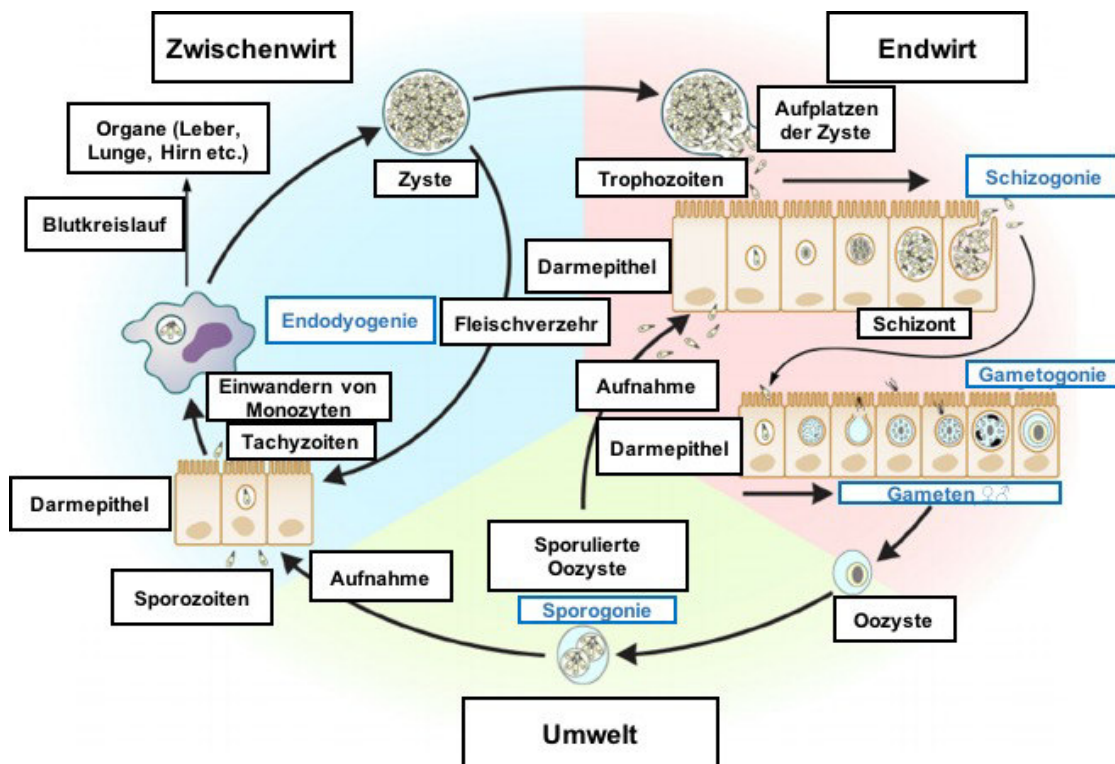


Abb. 1: Infektionszyklus von *Toxoplasma gondii*. Modifiziert nach [5]. Sexuelle Vermehrung kommt nur im Endwirt, den Mitgliedern der Familie der Felidae, vor. Nach Aufnahme von Gewebszysten über den Verzehr infizierter Zwischenwirte wird die Zystenwand im Darm der Felidae lysiert. Nach Freisetzung und Differenzierung in männliche und weibliche Gameten verschmelzen diese zu Oozyten. Beim Aufplatzen der Wirtszelle werden diese freigesetzt, gelangen über die Faeces in die Umwelt und werden dort von zahlreichen Zwischenwirten aufgenommen. In deren Darm dringen die Tachyzoiten aktiv in das Epithel ein und gelangen schließlich über den Blutkreislauf und lymphatische Organe in alle Organe. Dort erfolgt die Stadienkonversion von Tachyzoiten zu sich langsam-replizierenden Bradyzoiten, die in Gewebszysten überdauern, ohne eine Entzündungsreaktion zu induzieren.

1.3 Humane Toxoplasmose

Die Infektion des Zwischenwirtes erfolgt über die orale bzw. karnivore Aufnahme von Oozysten und Gewebszysten. Die Hauptübertragungswege für Menschen stellen hierbei die Aufnahme von *T. gondii* Oozysten über die Faeces von Katzen, z.B. über ungewaschenes Gemüse sowie die Aufnahme von Gewebszysten, z.B. über rohes oder nicht ausreichend gegartes Fleisch, dar [6].

1.3.1 Postnatale Toxoplasmose

Bei Immunkompetenten verläuft die Primärinfektion mit *T. gondii* meist asymptomatisch. In einigen Fällen treten unspezifische grippale Symptome wie Kopf- oder Muskelschmerzen auf. Ein weiteres Symptom kann eine schmerzlose Lymphadenopathie darstellen. Nur selten treten schwerwiegende Symptome wie z.B. eine Enzephalitis oder Pneumonie auf [7].

Bei Immunkompetenten kann auch eine okuläre Toxoplasmose in Form einer Chorioretinitis auftreten. Diese heilt meist folgenlos aus. Heilt sie jedoch narbig ab, kann sie langfristig in ca. 25% der Fälle zu mindestens einseitiger Blindheit führen [8].

Gegenstand der derzeitigen Diskussion ist auch eine Beteiligung einer Infektion mit *T. gondii* an der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie [9].

Im Falle einer angeborenen oder erworbenen Immunsuppression, z.B. nach Organ-Transplantation, kann es zur Reaktivierung einer latenten Infektion mit *T. gondii* kommen. Eine okuläre Toxoplasmose kann in diesem Fall schwerwiegende Folgen haben und bis zur Erblindung führen [10].

Bei AIDS-Patienten kann eine Toxoplasma-Enzephalitis infolge der Reaktivierung von intrazerebralen Gewebszysten auftreten [11].

1.3.2 Kongenitale Toxoplasmose

Bei einer Erstinfektion der Mutter während oder kurz vor der Schwangerschaft kann es zur vertikalen Transmission der Infektion auf das Ungeborene kommen. Je früher in der Schwangerschaft die Übertragung auf das Kind erfolgt, desto größer ist das Risiko für eine schwere Schädigung [12, 13]. Findet die Infektion erst zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. im dritten Trimenon statt, sind nur milde klinische Symptome zu erwarten.

Bei immunsupprimierten Schwangeren, z.B. im Rahmen einer HIV-Infektion oder einer hämatopoetischen Neoplasie, kann es selten zur Reaktivierung einer latenten Toxoplasmen-Infektion und zur Übertragung auf das ungeborene Kind kommen [14, 15].

Die klinischen Manifestationen einer kongenitalen Infektion mit *T. gondii* sind sehr variabel. Neugeborene können bei Geburt asymptomatisch sein, in Folge können jedoch, teilweise auch mehrere Jahre nach der Geburt, schwere Symptome wie Chorioretinitis, geistige Retardierung, Taubheit und zerebrale Verkalkungen auftreten [16].

1.4 Populationsstruktur von *T. gondii*

1.4.1 Klonale Stämme

Die Populationsstruktur von *T. gondii* ist klonal. Die sexuelle Vermehrung im Endwirt ist dafür verantwortlich, dass in Europa und Nordamerika hauptsächlich drei klonale Stämme von *T.*

gondii vorzufinden sind [17]. Diese werden aufgrund ihrer Virulenz für Mäuse in drei Typen unterteilt und können mittels Genotypisierung unterschieden werden.

Eine Infektion mit einem einzelnen Parasiten vom Typ I, denen die Stämme RH und BK zuzuordnen sind, verläuft bei Mäusen immer letal [18]. Typ II Parasiten, zu denen der Stamm ME49 gehört, werden als mäßig virulent eingestuft. Eine Infektion mit mehr als 10^3 Parasiten ist letal. Parasiten vom Typ III, zu denen der Stamm NED gehört, sind avirulent. Erst eine Infektion mit mehr als 10^5 Parasiten kann letal verlaufen [19].

1.4.2 Atypische Stämme

Neben den bereits genannten drei klonalen Stämmen von *T. gondii* wurden sogenannte atypische Stämme identifiziert. Während in Europa und Nordamerika vor allem die klonalen Stämme verbreitet sind, dominieren in Mittel- und Südamerika die atypischen Stämme [20].

Bei simultaner Infektion des Endwirtes mit unterschiedlichen klonalen Stämmen entstehen durch sexuelle Rekombination atypische Genotypen, die von klonalen Linien abweichen. Dies ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit antimikrobieller Effektormechanismen gegenüber atypischen Stämmen von *T. gondii* untersucht, die von Dr. Gereon Schares (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Greifswald - Insel Riems) isoliert und zur Verfügung gestellt wurden [21]. Diese atypischen Erreger wurden aus Katzenkot isoliert und genotypisiert [21].

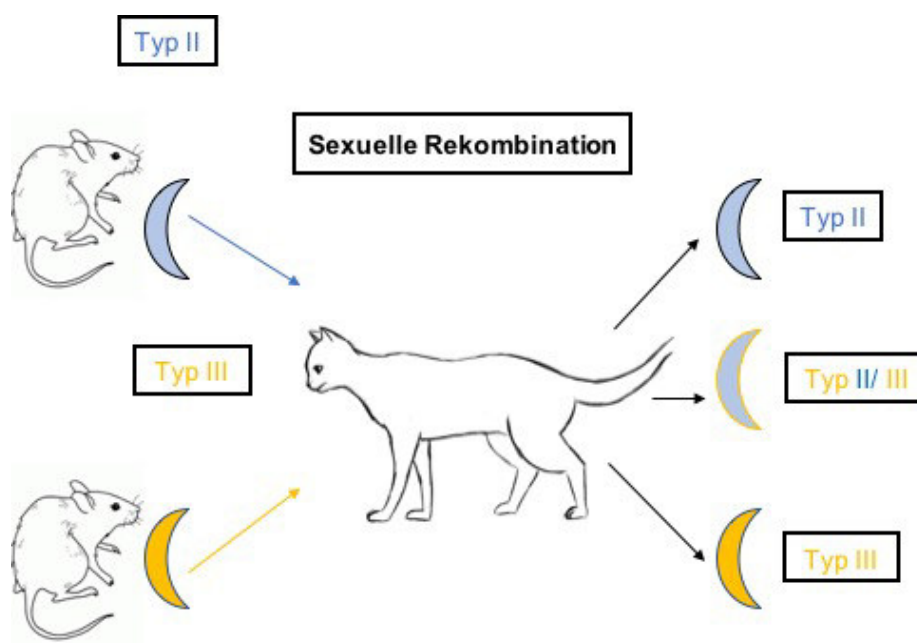


Abb. 2: Entstehung neuer oder atypischer *T. gondii*-Genotypen. Bei simultaner Infektion des Endwirtes mit unterschiedlichen klonalen Stämmen entstehen durch sexuelle Rekombination atypische Genotypen, die von klonalen Linien abweichen [21].

Ob die durch atypische Stämme hervorgerufene Infektion anders verläuft als eine Infektion mit klonalen Stämmen ist umstritten. Es gibt aber Hinweise darauf, dass eine Infektion mit einem atypischen *T. gondii* Stamm schwerwiegendere Symptome hervorrufen kann als eine Infektion mit einem klonalen Stamm [22-24]. So wird beispielsweise bei Immunkompetenten häufiger eine okuläre Toxoplasmose mit bleibenden Schäden ausgelöst [25, 26]. In einzelnen Fällen ist eine besonders schwerwiegende Reaktivierung einer Infektion mit einem atypischen Stamm unter Immunsuppression nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation beschrieben [27].

Es wird angenommen, dass eine bereits vor der Gravidität nachgewiesene Infektion der Mutter den Fetus vor einer Infektion schützt. In Einzelfällen kann es jedoch zu einer erneuten Infektion einer immunkompetenten Schwangeren mit einem atypischen *T. gondii* Stamm und einer symptomatischen kongenitalen Toxoplasmose kommen [28]. Zudem kann die Erstinfektion mit einem atypischen *T. gondii* Stamm während der Schwangerschaft zu schwereren Verläufen führen als bei Infektion mit einem klonalen Stamm [29]. Auch bei einer Infektion im dritten Trimenon, die in der Regel nicht mehr zu schwerwiegenden Schädigungen führt, sind vereinzelt schwerere Verläufe beschrieben [30].

1.5 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist die Verteidigung des Organismus gegen jegliche Art von Infektionen. Es besteht aus dem angeborenen Immunsystem, welches sich zuerst mit einem Erreger auseinandersetzt, und dem erworbenen Immunsystem, das aus zellulären Abwehrmechanismen und spezifischen Antikörpern besteht [31].

Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems greifen bei Vorhandensein einer Infektion unmittelbar. Makrophagen und neutrophile Granulozyten erkennen Pathogene anhand pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) als körperfremd und werden so aktiviert. Die Erreger werden nun in intrazelluläre Vesikel aufgenommen und dort abgetötet. Makrophagen produzieren dann Zytokine und Chemokine, die zu einer lokalen Entzündungsreaktion und zur verstärkten Einwanderung phagozytischer Zellen und Zellen der erworbenen Immunabwehr führen [31].

Im Gegensatz zur angeborenen Abwehr ist das adaptive Immunsystem in der Lage, sich an neue Krankheitserreger anzupassen. Die adaptive Immunabwehr kann auf ein großes Repertoire von Lymphozyten mit unterschiedlichen spezifischen Rezeptoren zurückgreifen. Antigen-spezifische Lymphozyten proliferieren und reifen zu Effektorzellen aus, die Pathogene eliminieren [31].

Zudem bildet die adaptive Immunabwehr auch ein immunologisches Gedächtnis in Form von Gedächtniszellen und spezifischen Antikörpern, die bei einer erneuten Infektion mit dem Pathogen zu einer schnelleren und wirksameren Immunantwort führen [31].

1.6 Immunabwehr gegen *T. gondii*

In der frühen Phase einer Infektion mit *T. gondii* ist die angeborene Immunantwort entscheidend, während in der Phase der chronischen Infektion die Komponenten des erworbenen Immunsystems relevant sind [32].

1.6.1 Angeborenes Immunsystem

Eine Erstinfektion mit *T. gondii* stimuliert die Zellen des angeborenen Immunsystems dazu, die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- γ zu produzieren. Mittels der *Toll-like* Rezeptoren (*TLR*) erkennt das angeborene Immunsystem Moleküle, die nur bei Protozoen vorkommen [33, 34]. Dabei sind multiple *TLR* an der Abwehr beteiligt. Der endosomal lokalisierte *TLR-7* ist dazu in der Lage, *T. gondii* RNS zu erkennen [35]. Der *TLR-2* befindet sich auf der Zelloberfläche und erkennt Glykosylphosphatidylinositol (GPI) auf der Oberfläche des Parasiten [36]. Der in murinen Zellen vorkommende *TLR-11* erkennt Profilin, ein Protein, das auf bisher unbekannt Weise von *T. gondii* sezerniert wird und mutmaßlich Mobilität und Invasion in die Wirtszelle vermittelt [33, 34].

Eine zentrale Rolle in der Signalübertragung von *TLR* spielt das Adapterprotein *Myeloid differentiation primary response (MYD88)*. *MYD88*-defiziente Mäuse zeigen eine mangelhafte Produktion von IL-12 und IFN- γ sowie eine erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit *T. gondii*. Die *TLR*-induzierte *MYD88*-Aktivierung scheint essentiell für die Abwehr gegen *T. gondii* zu sein [37]. Die Aktivierung von *MYD88* führt zu einer Produktion von IFN- γ und IL-12 durch Dendritische Zellen (*DC*). Weitere Quellen für IFN- γ stellen zudem Neutrophile [38] und Monozyten [39] dar.

Die Produktion von IL-12 initiiert in Natürlichen Killerzellen (*NK*) die Produktion von IFN- γ . Diese wird wiederum verstärkt durch die Produktion von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α durch Makrophagen [40].

1.6.2 Adaptives Immunsystem

In der Antwort des adaptiven Immunsystems spielen sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten eine wichtige Rolle. Wenn antigenpräsentierende Zellen *T. gondii* Antigene über die Moleküle des *Major Histocompatibility Complex* der Klasse II (*MHC II*) an nativen T-Zellen präsentieren, entwickeln sich diese bei Vorhandensein der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- γ vornehmlich zu CD4⁺-TH1-Zellen. Sie übernehmen zahlreiche regulatorische

Funktionen: Sie vermitteln unter anderem Antworten von B-Zellen und CD8⁺-T-Zellen [41] und produzieren IFN- γ .

Auch CD8⁺-T-Zellen tragen zur Produktion von IFN- γ bei. Sie können zudem zytotoxisch auf infizierte Wirtszellen wirken [42].

Eine Infektion mit *T. gondii* führt zur Produktion von Antikörpern, die Parasiten auf unterschiedliche Weise abtöten können [43]. Sie opsonieren die Parasiten für die Phagozytose und aktivieren den klassischen Weg des Komplementsystems [44, 45], können aber auch die Invasion des Parasiten in die Wirtszelle blockieren.

1.7 IFN- γ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*

IFN- γ spielt eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr einer Infektion mit *T. gondii*. Es ist das wichtigste Signalmolekül zur Induktion unterschiedlicher antiparasitärer Mechanismen [35]. Diese Mechanismen werden schematisch in Abb. 3 dargestellt. Werden humane Makrophagen *in vitro* mit IFN- γ stimuliert, sind sie dazu in der Lage, den Parasiten effektiv zu eliminieren [46]. Aus dem Blut von AIDS-Patienten isolierte Makrophagen können *T. gondii* eliminieren, nachdem sie mit IFN- γ stimuliert wurden [47].

1.7.1 Produktion reaktiver Stickstoffverbindungen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farb- und geruchsloses Gas aus der Gruppe der Stickoxide. NO ist ein bioaktives Molekül, das Funktionen in der intrazellulären Signaltransduktion übernimmt und in hohen Konzentrationen direkt an der Immunabwehr intrazellulärer Erreger beteiligt ist [48].

Einen wichtigen antimikrobiellen Mechanismus zur Abwehr einer Infektion mit *T. gondii* in murinen Zellen stellt die Produktion von NO und L-Citrullin aus L-Arginin dar. Dieser Vorgang wird in zahlreichen Zellreihen des angeborenen Immunsystems, z.B. in Monozyten [49] oder Natürlichen Killerzellen [50], durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) katalysiert [51]. Im Gegensatz zu anderen Isoformen von NO-Synthasen (endotheliale NO-Synthase, neuronale NO-Synthase) wird die induzierbare NO-Synthase nicht konstitutiv, sondern erst nach Stimulation mit bestimmten Signalmolekülen exprimiert [52]. Zu den stärksten Stimuli zählen bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF- α oder IL-1 [52].

Der antimikrobielle Effekt der iNOS beruht auf unterschiedlichen Mechanismen:

- Die reaktiven NO-Spezies sind polar und können so Membranen durchdringen. Innerhalb der Zelle können sie direkt mit dem Parasiten in der Parasitophoren Vakuole

interagieren. Reaktive NO-Verbindungen binden an Häm-haltige Enzyme des Parasiten und hemmen bzw. beeinflussen für den Parasiten relevante Stoffwechselfvorgänge [53].

- Die Produktion reaktiver NO-Verbindungen führt zudem zur Depletion von Arginin, einer für den Parasiten essentiellen Aminosäure. Da *T. gondii* Arginin auxotroph ist, führt der Mangel an Arginin zu einem verminderten Parasitenwachstum. Der Argininmangel ist involviert in die Umwandlung von Tachyzoiten zu langsam wachsenden Bradyzoiten [54].

iNOS-defiziente Mäuse können zwar die Parasitenreplikation kontrollieren, erliegen jedoch in der chronischen Phase der Infektion [55]. In humanen Zellen scheint die Produktion von NO hingegen nicht wesentlich an der Immunabwehr einer Infektion mit *T. gondii* beteiligt zu sein [55].

1.7.2 IFN- γ -induzierbare GTPasen

Scharton-Kersten et al. zeigten 1997 anhand von iNOS-*knockout* Mäusen, dass neben der iNOS ein weiterer IFN- γ -induzierbarer Effektormechanismus gegen *T. gondii* existiert [55], der später den IFN- γ -induzierbaren GTPasen (*Immunity Related GTPases, IRG*) zugeschrieben wurde [56]. Es handelt sich hierbei um eine Familie durch IFN- γ induzierbarer Proteine, die an der Abwehr einer Vielzahl von intrazellulären Erregern beteiligt sind [56]. Im Ruhezustand sind sie in unterschiedlichen Organellen, z.B. im Golgi-Apparat, zu finden. Bei einer Infektion mit *T. gondii* akkumulieren sie an der Parasitophoren Vakuole, die daraufhin zerstört wird. Der Parasit wird in das Zytosol der Wirtszelle entlassen und dort mittels lysosomaler Degradation abgebaut [57].

Bei Mäusen sind insgesamt 21 verschiedene *IRG* bekannt. *IRGM-1* und *IRGM-3*-defiziente Mäuse sind beispielsweise anfälliger für eine Infektion mit *T. gondii* und versterben schneller [58].

Während bei Mäusen eine Vielzahl solcher *IRG* bekannt ist, existiert bei Menschen nur ein solches Protein [58]. Dieses wird nicht durch IFN- γ reguliert. Die immunologische Funktion von *IRG* in humanen Zellen ist daher umstritten [59].

1.7.3 Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Einen weiteren antimikrobiellen Effektormechanismus gegen *T. gondii* stellt die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) dar. Dieses Enzym wird nach Stimulation mit IFN- γ in nahezu allen humanen Zellen exprimiert. Es katalysiert dort den Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin [60]. Da *T. gondii* Tryptophan auxotroph ist, führt die Depletion von Tryptophan zu einer Hemmung des Parasitenwachstums [61, 62]. Pfefferkorn et al. zeigten

1984 erstmals, dass eine Stimulation humaner Fibroblasten mit IFN- γ über die Induktion des Abbaus von Tryptophan zu einer Hemmung des Parasitenwachstums führt [61].

Im Gegensatz dazu scheint die antimikrobielle Funktion der IDO in murinen Zellen keine Rolle bei der Parasitenabwehr zu spielen [63].

Die IDO ist auch an der Abwehr gegen Bakterien [60] und Viren [64] beteiligt und übernimmt immunregulatorische Funktionen, wie z.B. die Hemmung der T-Zell-Aktivität [65].

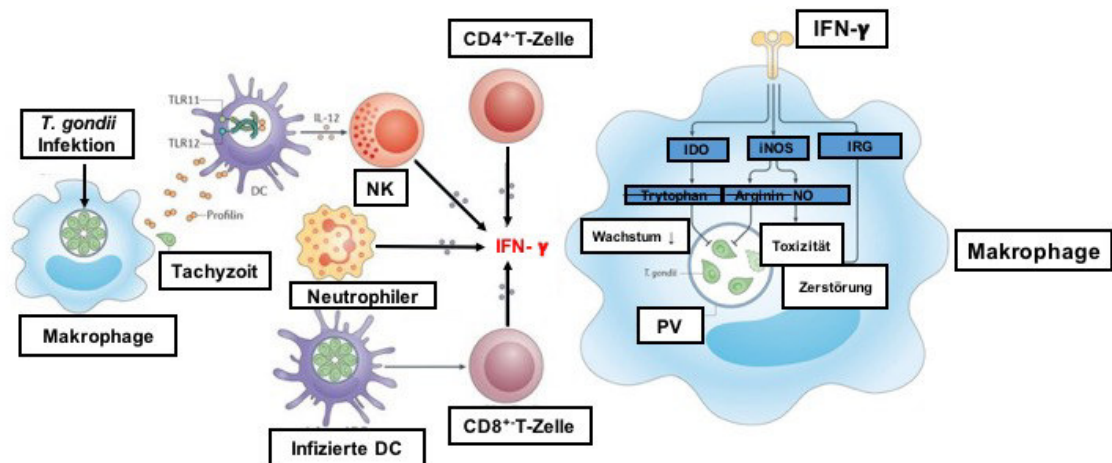


Abb. 3: IFN- γ -vermittelte Abwehrmechanismen gegen *T. gondii*. Modifiziert nach [35]. IFN- γ spielt in humanen Zellen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr einer Infektion mit *T. gondii*. Es ist der wichtigste Effektor zur Induktion unterschiedlicher antiparasitärer Mechanismen. Quellen für dieses Zytokin sind Zellen der angeborenen Abwehr, Makrophagen, Neutrophile, Natürliche Killerzellen (NK) und Dendritische Zellen (DC) sowie Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Die Stimulation mit IFN- γ induziert die Expression antiparasitär wirksamer Proteine. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert den Abbau der für den Parasiten essentiellen Aminosäure Tryptophan. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziert in murinen Zellen große Mengen an toxischen Stickstoffverbindungen. Die Akkumulation der IFN- γ -induzierten GTPasen in murinen Zellen führt zur Zerstörung der Parasitophoren Vakuole und damit letztendlich zur lysosomalen Degradation des Parasiten.

1.8 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Empfindlichkeit unterschiedlicher typischer und atypischer Stämme des obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii* auf IFN- γ -induzierte Effektormechanismen untersucht. Als Wirtszellen dienten hierbei murine mesenchymale Stromazellen (*mMSC*). Diese weisen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Effektormechanismen auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dabei die antiparasitäre Wirkung der iNOS sowie der *IRG* untersucht. Um die Bedeutung dieser Effektormechanismen gegen *T. gondii in vitro* zu analysieren, wurden *mMSC* mit Tachyzoiten unterschiedlicher Isolate von *T. gondii* infiziert. Hierbei sollte analysiert werden, inwieweit Zytokin-stimulierte *mMSC* antiparasitäre Effekte gegen eine *T. gondii* Infektion dieser Zellen vermitteln können. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin (N^GMMA) inkubiert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Zudem wurde exemplarisch die IFN- γ induzierte Rekrutierung der GTPase *Irgb6* zur PV atypischer *T. gondii* Klone mittels spezifischer Färbungen und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Unter inflammatorischen Bedingungen kann es in Geweben lokal zu einer relevanten Hypoxie kommen [66, 67]. Da viele antimikrobielle Effektormoleküle, wie auch die iNOS, Sauerstoff als Substrat benötigen, ist ein Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Enzymaktivität denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch der antimikrobielle Effekt der iNOS unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entwickler	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Fixierer	AGFA, Leverkusen, Deutschland
<i>Fluoromount-G</i>	Southern Biotech, Birmingham, USA
<i>Fetal calf serum (FCS)</i>	Lonza, Rockland, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)</i>	Lonza, Rockland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, entrahmt	Oxoid, Microbiology Products, Hampshire, England
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N-(1-Naphthylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N ^G -Methyl-L-Arginine-Acetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Phosphat Buffered Saline (PBS)</i>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin Streptomycin (PenStrep)	Biochrom, Berlin, Deutschland
<i>Restore™ Western Blot Stripping Buffer</i>	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)</i>	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Szintillationsflüssigkeit	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
<i>Betaplate Scint for Betaplate</i>	

Trypanblau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,05%	<i>Life Technologies</i> GmbH, Carlsbad, USA
<i>Tween 20</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziege-Normal Serum	Daco, Glostrup, Dänemark
Natriumdodecylsulfat (<i>SDS</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Enhanced Chemiluminescence System (ECL)</i>	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

2.1.2 Medien und Puffer

20x MOPS-Puffer	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1 % (w/v) <i>SDS</i> 1 mM EDTA pH 7,7
5x <i>SDS</i> -Probenpuffer	10% <i>SDS</i> 0,4 M Tris / HCl pH 6,8 25% Glycerol 5% β -Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
Einfriermedium	<i>FCS</i> 10 % DMSO
NuPAGE® Transfer Puffer	50 ml NuPAGE® Transfer Puffer (20x) 200 ml Methanol 750 ml Wasser
<i>PBS</i>	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Zellmedium <i>HFF</i>	<i>IMDM</i> + 548 mg/L L-Glutamine +25mM HEPES + 10% <i>FCS</i>
Zellmedium <i>mMSC</i>	<i>IMDM</i> + 548 mg/L L-Glutamine +25mM HEPES + Penicillin Streptomycin + 10% <i>FCS</i>

2.1.3 Geräte

Gerät

Beta-Counter, 1205 Betaplate

Binokular Leica MZ 16

Blottingkammer

Feinwaage Chyo JL 180

Fluoreszenzmikroskop *eclipse* TE2000S

Fluoreszenzreader *Synergy Mx*

Gelkammer Novex *Mini-Cell*

Inkubator BBD 6220

Inkubator Hera *cell* 240

J2-21 Zentrifuge

Magnetrührer IKAMAG RCT

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

pH-Messgerät MP 225

Photometer *Sunrise*

Röntgenfilmkammer

Schüttler 3015

Schüttler 3019

Spannungsgeber *Power Pac* 300

Sterilbank Hera*Safe*

Taumler Polymax 1040

Trockenschrank

Vortexer MS1 *Minishaker*

Waage Precisa 400

Wasserbad Typ 1002

Zeiss LSM 780

Zellerntegerät *Basic 96 Harvester*

Zentrifuge 5417 R

Hersteller

PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim,
Deutschland

Leica, Wetzlar, Deutschland

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Deutschland

Bio-Rad, Hercules, USA

Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Winooski, VT, USA

Invitrogen, Carlsbad, USA

Thermo Scientific, Waltham, USA

Heraeus, Hanau, Deutschland

Beckman, Brea, USA

IKA Works, Wilmington, USA

Thermo Scientific, Waltham, USA

Mettler Toledo, Columbus, USA

Tecan, Männedorf, Schweiz

Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg,
Deutschland

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel,
Deutschland

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel,
Deutschland

Bio-Rad, Hercules, USA

Heraeus, Hanau, Deutschland

Heidolph, Kelheim, Deutschland

Binder, Tuttlingen, Deutschland

IKA Works, Wilmington, USA

Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel,
Deutschland

Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Zinser Analytic Skatron, Frankfurt,
Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Megafuge 1.0
 Zentrifuge Sorvall RC-4
 Zentrifuge Universal 32 R

Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermo Scientific, Waltham, USA
 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

Deckgläser (Ø 13 mm)
ECL Western Blotting Detection Reagents

Einfrierröhrchen
 Glasfaserfilter

Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Hyperfilm *ECL*

Kodak Film BioMax MR
 Nylonmembran Hybond N+

Objektträger
 Pipetten Finnpipette
 Pipettenspitzen *TipOne*®
 Protran Nitrocellulose Transfermembran
 Sterilfilter
 Zählkammer Neubauer *improved*

Zellkulturflaschen (25, 75, 165 cm²)
 Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well)

Zellschaber

Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)

Bezugsquelle

VWR International, West Chester, USA
 Amersham, GE Healthcare,
 Buckinghamshire, UK
 NUNC GmbH, Wiesbaden, Deutschland
 PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim,
 Deutschland
 Hirschmann Techcolor, Eberstadt,
 Deutschland
 Amersham, GE Healthcare,
 Buckinghamshire, UK
 Kodak, Rochester, USA
 Amersham, GE Healthcare,
 Buckinghamshire, UK
 Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Thermo Scientific, Waltham, USA
 StarLab, Hamburg, Deutschland
 Whatman, Dassel, Deutschland
 Millipore, Eschborn, Deutschland
 Marienfeld, Lauda-Königshofen,
 Deutschland
 Corning Incorporated, Tewksbury, USA
 Greiner Bio-One, Frickenhausen,
 Deutschland
 Greiner Bio-One, Frickenhausen,
 Deutschland
 Greiner Bio-One, Frickenhausen,
 Deutschland

2.1.5 Nukleotide

Nukleotid

³H-Uracil (Aktivität 1,23 Mbq/ml)

Bezugsquelle

Amersham, Braunschweig, Deutschland

2.1.6 Zytokine

Zytokin

murines IFN- γ

murines IL-1 β

murines TNF- α

Bezugsquelle

R & D Systems, Minnesota, USA

Pepro Tech, Hamburg, Deutschland

Pepro Tech, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Antikörper

Antikörper

Maus α *T. gondii* SAG 1

α murin *Irgb6*

α murin β -Actin

Verwendung

1:1000 Immunfluoreszenz

1:500

Western Blot

1:500

Western Blot

Bezugsquelle

Abcam, Cambridge, UK

Jonathan Howard, Instituto
Gulbenkian de Ciência,
Oeiras, Portugal

Sigma Aldrich, Taufkirchen,
Deutschland

Antikörper

Ziege anti-Kaninchen

Peroxidase-gekoppelt

Ziege anti-Maus

Peroxidase-gekoppelt

Ziege α Kaninchen

Cy2-gekoppelt

Ziege α Maus Cy3-gekoppelt

Verwendung

1:5000

Western Blot

1:5000

Western Blot

1:1000 Immunfluoreszenz

1:1000 Immunfluoreszenz

Bezugsquelle

dianova, West Grove, USA

dianova, West Grove, USA

dianova, West Grove, USA

dianova, West Grove, USA

2.1.8 Kits

BCA™ Protein Assay Kit

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for
mammalian cells

Thermo Scientific, Waltham, USA

Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.9 Zelllinien

humane Vorhautfibroblasten (*HFF*)
 murine mesenchymale Stromazellen
 (*mMSC*)
 RAW 264.7

ATCC, Wesel, Deutschland
 Dr. Özer Degistirici, Düsseldorf,
 Deutschland
 ATCC, Wesel, Deutschland

2.1.10 Parasitenstämme

Bezeichnung

Toxoplasma gondii Stamm 2-8H
Toxoplasma gondii Stamm 2C10
Toxoplasma gondii Stamm A7
Toxoplasma gondii Stamm B6H6
Toxoplasma gondii Stamm BK
Toxoplasma gondii Stamm BoB

Toxoplasma gondii Stamm C12
Toxoplasma gondii Stamm ME49
Toxoplasma gondii Stamm NED
Toxoplasma gondii Stamm RH

Bezugsquelle

Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 ATCC, Wesel, Deutschland
 im Institut isoliert (Claudia Woite, Walter
 Däubener)
 Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 ATCC, Wesel, Deutschland
 Gereon Schares, Insel Riems, Deutschland
 ATCC, Wesel, Deutschland

2.1.11 Software

Software

GraphPad Prism 7
Microsoft Office Excel 2003
 Magellan™
ImageJ/Fiji

 Zen 2010

Bezugsquelle

GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
 Microsoft, Redmond, USA
 Tecan, Männedorf, Schweiz
 Wayne Rasband, National Institutes of
 Health, Bethesda, USA
 Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Die Kultur aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten

Als Wirtszellen für die Parasiten wurden humane Vorhautfibroblasten verwendet. Diese wurden in entsprechendem Zellmedium in 165 cm²-Zellkulturflaschen (25 ml Füllmenge) kultiviert. Die Zellen wurden gesplittet, sobald sich ein mikroskopisch konfluenten *monolayer* gebildet hatte. Hierzu wurde das Zellmedium abgesaugt und anschließend die Zellkulturflasche zweimal mit *PBS* gewaschen. Mittels Inkubation mit 10 ml 0,5% Trypsin-EDTA für fünf Minuten wurden die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 5 ml Zellmedium wurde die Reaktion beendet. Die Zellsuspension wurde dann in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 350 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in frischem Zellmedium aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 in neue 165 cm²-Zellkulturflaschen überführt und erneut im Brutschrank inkubiert.

Zudem wurden *HFF*-Zellen in 25 cm²-Zellkulturflaschen (5 ml Füllmenge) in *IMDM* mit 10% *FCS* zur Anzucht von Parasiten kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung muriner mesenchymaler Stromazellen

Für den Großteil der Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden *mMSC* als Wirtszellen für *T. gondii* verwendet. Mesenchymale Stromazellen gehören zur Gruppe der nicht-hämatopoetischen Stammzellen und entstammen dem Mesoderm. Sie können sich in zahlreiche Gewebe, z.B. glatte Muskelzellen, differenzieren und exprimieren keine Oberflächenmoleküle hämatopoetischer Stammzellen. In der Zellkultur zeichnen sie sich durch Plastikadhärenz aus [67].

Murine mesenchymale Stromazellen wurden in *IMDM* mit 10% *FCS* und 1% Penicillin/Streptomycin in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden gesplittet, sobald sich ein mikroskopisch konfluenten *monolayer* gebildet hatte. Hierzu wurde das Zellmedium abgesaugt und anschließend die Zellkulturflasche zweimal mit *PBS* gewaschen. Mittels Inkubation mit 10 ml Trypsin-EDTA für ca. fünf Minuten wurden die Zellen von der

Zellkulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 5 ml Zellmedium wurde die Reaktion beendet. Die Zellsuspension wurde nun in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen für fünf Minuten bei 500 g und RT zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in frischem Zellmedium aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Ein Teil (10%) der Zellsuspension wurde zum Ansetzen einer neuen Zellkulturflasche verwendet, die restlichen neun Teile wurden für die Versuche verwendet. Zellen, die für die Versuche verwendet werden sollten, wurden nach einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.1.3 Kultivierung von *T. gondii*

Tachyzoiten von *T. gondii* wurden in *HFF*-Zellen in 25 cm²-Zellkulturflaschen in *IMDM* mit 10% *FCS* kultiviert. Das Kulturmedium der Stämme 2-8H, 2C10, A-7, NED und BoB wurde zusätzlich mit 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Zur Vermehrung der Tachyzoiten wurden *HFF*-Zellen, die einen konfluenten *monolayer* gebildet hatten, mit ca. 10⁶ Tachyzoiten des jeweiligen Stammes infiziert und im Brutschrank inkubiert. Nach vier Tagen, wenn die Wirtszellen vollständig durch die Tachyzoiten lysiert worden waren, konnten diese erneut zur Kultivierung oder für Versuche verwendet werden. Zur Ernte der Tachyzoiten wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 15 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 90 g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Durch diese Zentrifugation wurden die lysierten Wirtszellen pelletiert, die leichteren Tachyzoiten hingegen befanden sich im Überstand. Anschließend wurde der Überstand in ein weiteres 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 g und RT für weitere zehn Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das die *T. gondii* Tachyzoiten enthaltende Pellet nun in 1 ml *RPMI* aufgenommen und nach 1:50-Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen/Tachyzoiten

Zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die verwendeten Zellen und Parasiten wie oben beschrieben geerntet und sedimentiert. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml kaltem Einfriermedium (*FCS* + 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert, in Einfriereröhrchen überführt und rasch bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen und Parasiten wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff bei RT aufgetaut und rasch mit *FCS*-haltigem Zellkulturmedium versetzt. Nach Überführung in 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden sie wie oben beschrieben zentrifugiert und in Zellkulturflaschen bzw. *HFF*-Zellen ausgesät.

2.2.1.5 Stimulation von *mMSC* mit anschließender *T. gondii* Infektion

Zur Infektion mit Tachyzoiten verschiedener Stämme von *T. gondii* wurden 2×10^4 *mMSC* ausgesät. Um die Anhaftung der Zellen an der Oberfläche der 96-*well* Platte zu verbessern, wurde jedes *well* für mindestens 30 Minuten mit je 50 μ l Gelatine vorbehandelt. Vor der Zugabe der Zellsuspension wurde die Gelatine wieder abgesaugt.

Die Zellen wurden über 24 Stunden in An- oder Abwesenheit verschiedener Zytokine inkubiert. Zur Induktion der iNOS wurden die Zellen mit IFN- γ in einer Verdünnungsreihe von 100 bis 0 U/ml sowie TNF- α und IL-1 β in einer jeweiligen Endkonzentration von 100 U/ml stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit IFN- γ stimuliert wurden.

Zusätzlich wurde zu einem Teil der *wells* der spezifische iNOS-Inhibitor N^GMMA in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Wirtszellen mit je 1×10^5 Tachyzoiten verschiedener Stämme infiziert. Die Ernte der *T. gondii* Tachyzoiten erfolgte dabei wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Die 96-*well*-Platten wurden anschließend bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis Vakuolen in den *mMSC* mikroskopisch sichtbar waren. Es erfolgte nun die Quantifizierung der Proliferation der Parasiten.

2.2.1.6 Quantifizierung der Proliferation von *T. gondii*

Die Proliferation von *T. gondii* in *mMSC* wurde anhand der Häufigkeit der Inkorporation von ³H-Uracil in die RNS der Parasiten gemessen. Mittels eines *Beta-Counters* konnte die Häufigkeit der Inkorporation dieses Nukleotids quantifiziert werden.

Sobald Vakuolen in den *mMSC* mikroskopisch sichtbar waren, wurden je 10 μ l 1:30 verdünntes ³H-Uracil pro *well* hinzugefügt. Nach Hinzugabe des Nukleotids wurden die Platten solange im Brutschrank im radioaktiven Sicherheitsbereich inkubiert, bis die Entwicklungsstufe der Tachyzoiten erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Platten bei -20°C eingefroren, um die Parasiten zu lysieren und die radioaktiv markierte RNS freizusetzen. Mithilfe eines Zellerntegerätes wurden die Überstände der mit *T. gondii* infizierten Zellkulturen auf Glasfaserfilter übertragen, die dann bei 100°C für mindestens 30 Minuten im Trockenschrank getrocknet wurden. Nachdem die Filter nun in Plastikhüllen eingeschweißt und mit Szintillationsflüssigkeit benetzt wurden, wurden sie mithilfe von Messkassetten im *Beta-Counter* gezählt. Die als „counts per minute“ (*cpm*) angezeigte Cerenkow-Strahlung entspricht dabei dem radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit.

2.2.1.7 Nachweis von Nitrit-Ionen mittels Griess-Reagenz

Zur Quantifizierung der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase wurde die Akkumulation von Nitritionen und Stickstoff mittels der Griess-Reaktion bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 *mMSC* pro *well* einer 96-*well*-Flachbodenplatte ausgesät (s.o.). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in An- oder Abwesenheit unterschiedlicher Zytokine (IFN- γ ,

TNF- α , IL-1- β) wurden 100 μ l der Versuchsüberstände auf eine unsterile 96-*well*-Flachbodenplatte übertragen und mit 100 μ l Griess-Reagenz (0,1%-N-(naphtylethylendiamin) in Aqua dest. und 2,5% Sulfonamid in 15% HCl im Verhältnis 1:1) versetzt. Im Folgenden wurde die Absorption bei 542 nm am Photometer mithilfe der Software „Magellan“ gemessen. Die Menge des akkumulierten Nitrits wurde anhand einer Kalibrierungskurve, die auf Grundlage einer Standardreihe mit absteigenden Konzentrationen von NaNO₂ erstellt wurde, ermittelt.

2.2.1.8 Antagonisierung der Aktivität der iNOS

Mittels Zugabe eines selektiven iNOS-Inhibitors wurde das Ausmaß des inhibitorischen Effektes der iNOS auf das Parasitenwachstum untersucht. Hierzu wurde N^GMMA in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml verwendet.

2.2.1.9 Immunfluoreszenzanalyse

Zur Analyse der Lokalisation von *Irgb6* in *mMSC* wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierzu wurden sterile Glasplättchen auf Vertiefungen einer 24-*well*-Platte verteilt und mit Gelatine beschichtet. Murine mesenchymale Stromazellen wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben geerntet und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte wurden 3×10^4 Zellen in je 500 μ l Medium ausgesät. Die Platten wurden anschließend für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis eine Anhaftung der Zellen auf den Glasplättchen beobachtet werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden nun für 16 Stunden mit IFN- γ in einer Endkonzentration von 100 U/ml in 500 μ l Medium inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich mit Medium versetzt worden waren.

Am folgenden Tag wurden *T. gondii* Tachyzoiten wie unter 2.2.1.3 beschrieben geerntet und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellkulturen wurden mit 3×10^5 Tachyzoiten pro Vertiefung in 100 μ l Medium versetzt. Die Zellen wurden nun für ca. 2-3 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert und regelmäßig mikroskopiert.

Sobald intrazelluläre Parasiten mikroskopisch sichtbar waren, erfolgte die Färbung der Zellkulturen. Hierzu wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und die Glasplättchen vorsichtig mit *PBS* gewaschen. Zur Fixierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumler. Anschließend wurden die Glasplättchen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur auf dem Taumler mit *PBS* gewaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Permeabilisierung mit 0,02% Saponin für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Hieran schloss sich ein erneuter Waschvorgang mit *PBS* an.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Versuchsansätze mit einer Blockierungslösung (2% Ziegenserum in 1:10 verdünnter Permeabilisierungslösung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Blockierung erfolgte kein Waschvorgang mehr.

Nun wurde eine 1:10 verdünnte Blocklösung hergestellt und mit den Primärantikörpern SAG 1 (1:1000) und *Irgb6* (1:500) versetzt. Die Versuchsansätze wurden über eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Antikörperlösung inkubiert und anschließend dreimal mit *PBS* gewaschen. Es folgte nun die lichtgeschützte Inkubation mit den Fluoreszenzmarkergekoppelten Sekundärantikörpern Cy2 und Cy3 (Endkonzentration 1:1000). Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Versuchsansätze zweimal mit *PBS* gewaschen. Im Folgenden erfolgte eine Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschritt mit *PBS* wurden die Deckgläschen aus den Vertiefungen entnommen und mittels *Fluoromont-G* auf Objektträgern fixiert. Bis zur Analyse wurden diese lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Präparate wurden mit dem Konfokalmikroskop LSM 780 von Zeiss analysiert und fotografiert. Die Bearbeitung der repräsentativen Bilder im Ergebnisteil erfolgte mithilfe der Software „Zen 2010“.

2.2.1.10 Messung der Zellviabilität nativer *mMSC*

Die Messung der Zellvitalität erfolgte mittels einer Färbung mit Calcein-Acetoxy-methylester und Ethidium Homodimer-1. Hierzu wurde das „LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit“ von Invitrogen entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Abbildung 4 stellt das grundlegende Prinzip dieser Färbung dar. Durch die Zellmembran gelangt das nicht-fluoreszierende Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) in die Zelle. Nur lebende Zellen wandeln das nicht-fluoreszierende Calcein-AM mittels intrazellulärer Esterasen in das grün-fluoreszierende Calcein um. In avitalen Zellen kann dieser Prozess jedoch nicht mehr ablaufen, sodass einzig vitale Zellen eine grüne Fluoreszenz emittieren. Ethidium Homodimer-1 hingegen gelangt durch defekte Zellmembranen avitaler Zellen in die Zelle. Durch die Bindung an Nukleinsäuren entsteht dort eine rote Fluoreszenz.

2×10^4 murine *MSC* wurden pro *well* einer sterilen 96-*well*-Flachbodenplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 72 Stunden entweder unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen vorsichtig mit *PBS* gewaschen und anschließend mit 100 µl *PBS* pro *well* versetzt. Als Kontrolle für die Färbung avitaler Zellen dienten Zellen, die für zehn Minuten mit 0,1% Saponin inkubiert wurden. Zur Erfassung der Hintergrundaktivität der Färbelösung wurden zudem *wells*, die nur *PBS* enthielten, gefärbt.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden die Stocklösungen lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufgetaut und zentrifugiert. Die Stocklösungen wurden mit *PBS* so verdünnt,

dass die verwendete Färbelösung 2 μM Calcein-Acetoxy-methylester und 4 μM Ethidium Homodimer-1 enthielt. Die Zellen wurden nun mit je 100 μl Färbelösung pro *well* versetzt und für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde die Fluoreszenz am Fluoreszenzreader *Synergy Mx* (Winooski, VT, USA) entsprechend der Anregungs- und Abstrahlungsmaxima von Calcein (494/517 nm) und Ethidium Homodimer-1 (528/617 nm) gemessen. Von den jeweiligen gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten für Calcein und Ethidium Homodimer-1 wurde die Hintergrundaktivität von *PBS* subtrahiert. Im Anschluss an die Messungen am Fluoreszenzreader wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop *eclipse TE2000S* (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

Die Bearbeitung fluoreszenzmikroskopischer Bilder erfolgte mit der frei verfügbaren Software „*ImageJ/Fiji*“ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

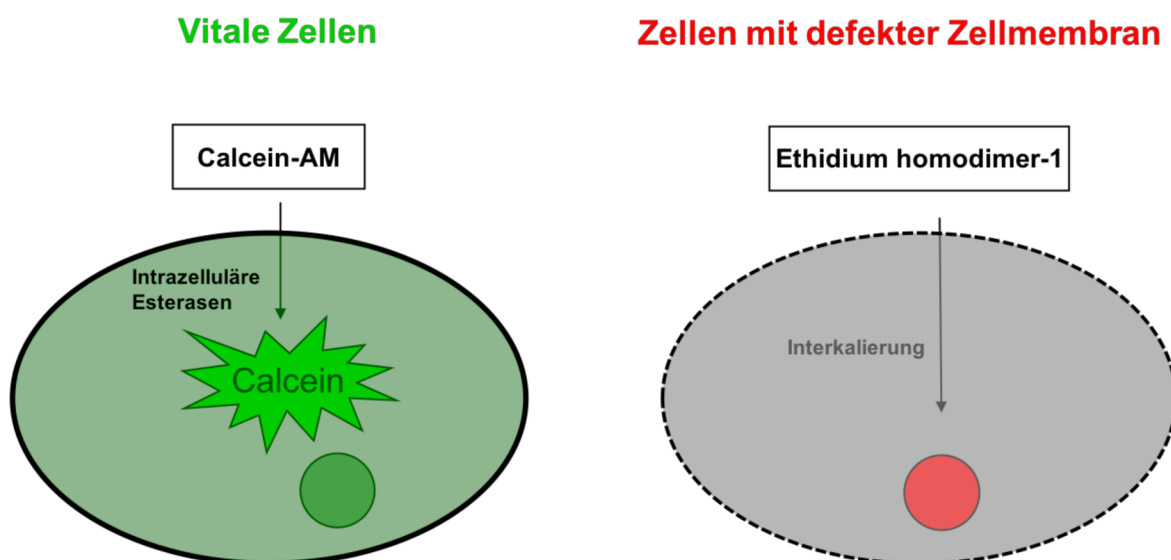


Abb. 4: Prinzip der Färbung mit Calcein und Ethidium homodimer-1. Lebende Zellen wandeln das nicht-fluoreszierende Calcein-AM mittels intrazellulärer Esterasen in das grün-fluoreszierende Calcein um. Ethidium Homodimer-1 gelangt durch defekte Zellmembranen avitaler Zellen in die Zelle und interkaliert in die DNS. Durch die Bindung an Nukleinsäuren entsteht eine rote Fluoreszenz in avitalen Zellen.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse der Expression der *Immunity-related GTPases* wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst $1,5 \times 10^6$ *mMSC* in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät. Zur Induktion der *IRG* wurden die Zellen mit murinem IFN- γ in einer Verdünnungsreihe von 100 bis 0 U/ml stimuliert.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 347 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 300 µl sterilem *PBS* mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde das Pellet lysiert. Die Zelllysate wurde anschließend für 10 Minuten bei 547 g bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in Aliquots zu 100 µl aufgeteilt und bei -80°C dauerhaft aufbewahrt.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific*, Waltham, USA) und wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für den Standard wurde BSA in *PBS* gelöst und in Konzentrationen von 0-2000 µg/ml verdünnt.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels *SDS*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proteine elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. NuPAGE 10% Bis-Tris Gele (*Life Technologies GmbH*, Carlsbad, USA) wurden mit H₂O umpuffert. Nachdem die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurden, wurde die Kammer mit 1% MOPS Puffer befüllt. Die Zelllysate wurden nun im Verhältnis 1:5 mit *SDS*-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 100°C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden je 25 µl Zelllysate in die Probenaschen des Gels pipettiert. Die zu analysierenden Proteine wurden nun über mindestens 60 Minuten bei 160 V und 400 A elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine wurde anhand der Auftrennung des Größenstandards *See Blue® Plus 2 Prestained Standard* (*Life Technologies GmbH*, Carlsbad, USA) bewertet.

2.2.2.4 Western Blot-Analyse

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels *Western Blot*-Analysen dargestellt. Hierzu wurden Chromatographiepapiere (8 x 8 cm) in NuPAGE® Transfer Puffer getränkt. Sechs Chromatographiepapiere wurden in eine *semi dry Blottingkammer* gelegt. Darauf wurden eine Membran aus Nitrocellulose sowie das Gel gelegt. Auf das Gel folgten drei weitere Chromatographiepapiere. Nachdem eventuell vorhandene Luftblasen mithilfe eines Zentrifugenröhrchens entfernt worden waren, wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche auf die Membran übertragen. Nach 90 Minuten war der Transfer der Proteine auf die Membran beendet.

2.2.2.5 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 60 Minuten in 5% Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem 1:500 verdünnten Primärantikörper in 0,5% Milchpulver erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit 0,2% *Tween 20* in *PBS* gewaschen. Nach diesen Waschvorgängen wurde die Membran für 45 Minuten mit dem 1:5000 in 0,5% Milchpulver verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten nun erneut drei Waschvorgänge mit 0,2% *Tween 20* in *PBS*.

Die jeweiligen Sekundärantikörper sind mit Kaninchen Peroxidase-gekoppelt. Zur Detektion der Chemilumineszenzsignale wurde die Membran 5 Minuten lang in *ECL (Enhanced Chemiluminescence System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)* inkubiert. Um die Lichtemissionen sichtbar zu machen, wurde ein Röntgenfilm verwendet, der mithilfe der Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR entwickelt wurde. Mithilfe von Größenstandards wurden die Filme anschließend ausgewertet.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die Darstellung von Diagrammen und sowie die statistische Auswertung erfolgten mit dem Programm „*GraphPad Prism 7*“. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Standard t-Tests für gepaarte bzw. ungepaarte Proben. Dabei wurde das Signifikanzniveau festgelegt auf $p = 0,05$. Alle Daten wurden bei Einzelexperimenten als Mittelwerte \pm Standardfehler aufgeführt, bei einer Zusammenfassung mehrerer Experimente als Mittelwerte \pm *SEM* und bei einzelnen Experimenten als Mittelwerte \pm *SD*.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Zytokin-induzierten Aktivität der iNOS in *mMSC*

Zur Quantifizierung der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase in *mMSC* infolge einer Zytokin-Stimulation wurde die Akkumulation von Nitrit mithilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Abbildung 5 zeigt die Zytokin-vermittelte NO-Produktion in *mMSC*. Bei ausschließlicher Stimulation der *mMSC* mit IFN- γ in einer Verdünnungsreihe von 100 bis 10 U/ml konnte keine signifikante NO-Produktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen werden. Auch bei alleiniger Stimulation mit TNF- α oder IL-1 β in jeweils einer Konzentration von 100 U/ml sowie einer Kombination der genannten Zytokine konnte in Abwesenheit von IFN- γ keine relevante NO-Produktion gemessen werden.

Bei Kostimulation der Zellen mit IFN- γ und IL-1 β wurde eine relevante NO-Produktion nachgewiesen. Wurden die Zellen mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β stimuliert, stieg die NO-Produktion wiederum an. Für alle folgenden Versuche wurde daher eine Kostimulation der *mMSC* mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β durchgeführt.

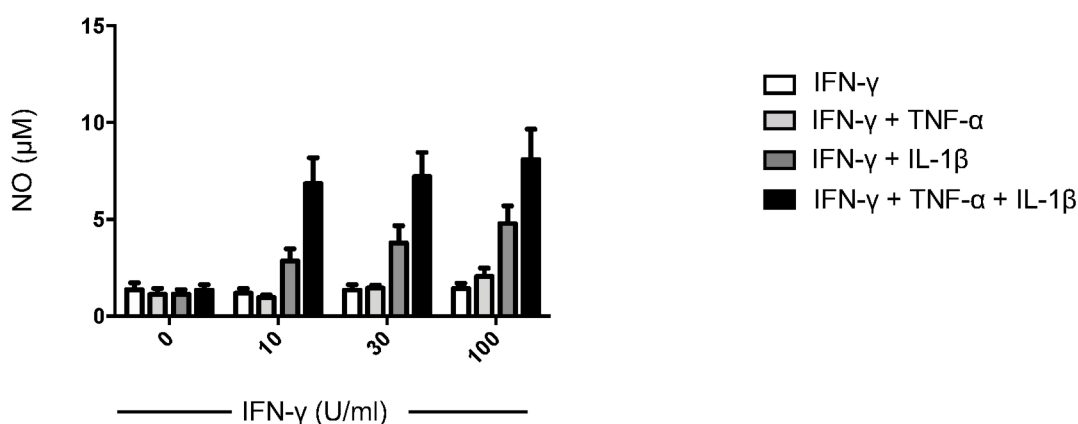


Abb. 5: Zytokin-vermittelte NO-Produktion in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ und TNF- α (hellgraue Balken), IFN- γ und IL-1 β (dunkelgraue Balken) oder IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Versuchsüberstände mit Griess-Reagenz (0,1%-N-(naphthylethylendiamin) in Aqua dest. und 2,5% Sulfonamid in 15% HCl im Verhältnis 1:1) versetzt. Im Folgenden wurde die Absorption bei 542 nm am Photometer gemessen. Die Menge des akkumulierten Nitrits wurde anhand einer Kalibrierungskurve, die auf Grundlage einer Standardreihe mit absteigenden Konzentrationen von NaNO₂ erstellt wurde, ermittelt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen fünf unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

Abbildung 6 zeigt die Aufhebung der Zytokin-vermittelten NO-Produktion in *mMSC* durch den iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin (N^GMMA). Bei alleiniger Stimulation der *mMSC* mit IFN- γ konnte, auch bei Stimulation mit hohen IFN- γ -Konzentrationen bis maximal 100 U/ml, keine signifikante NO-Produktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen werden. Bei Kostimulation der Zellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte hingegen eine NO-Produktion von maximal 20 μ M NO beobachtet werden. Mittels Zugabe des selektiven iNOS-Inhibitors N^GMMA wurde die Enzymaktivität der iNOS antagonisiert. Wurden *mMSC* unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA z.B. mit IFN- γ (0,4 U/ml), TNF- α und IL-1 β kostimuliert, wurde eine Reduktion der NO-Produktion um ca. 90% erreicht.

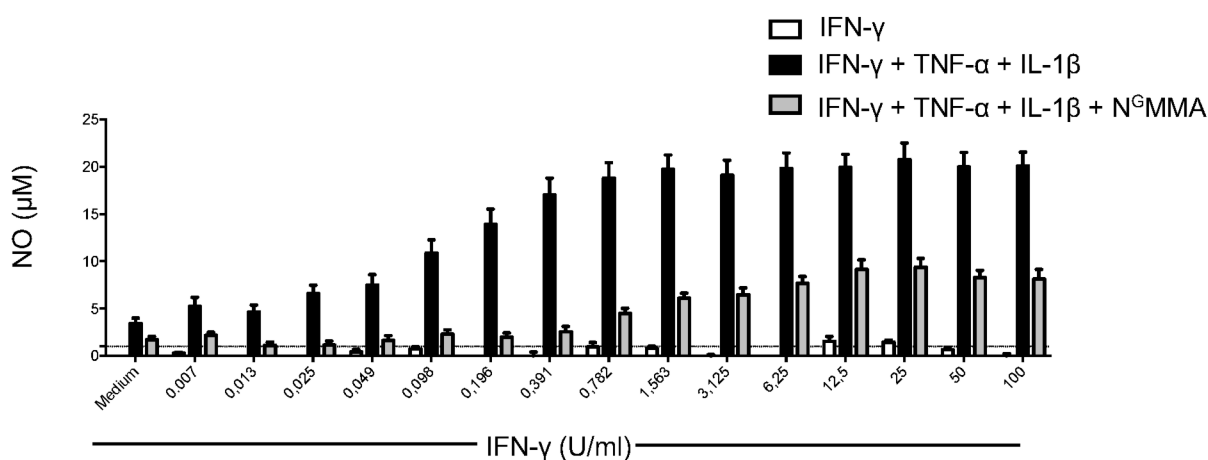


Abb. 6: Hemmung der Zytokin-vermittelten NO-Produktion in *mMSC* durch N^GMMA. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Versuchsüberstände mit Griess-Reagenz (0,1%-N-(naphtylethylendiamin) in Aqua dest. und 2,5% Sulfonamid in 15% HCl im Verhältnis 1:1) versetzt. Im Folgenden wurde die Absorption bei 542 nm am Photometer gemessen. Die Menge des akkumulierten Nitrits wurde anhand einer Kalibrierungskurve, die auf Grundlage einer Standardreihe mit absteigenden Konzentrationen von NaNO₂ erstellt wurde, ermittelt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen 23 unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2 Zytokin-induzierte Hemmung des Wachstums unterschiedlicher *T. gondii* in *mMSC*

Um die Bedeutung antiparasitärer Effektormechanismen gegen *T. gondii in vitro* zu analysieren, wurden *mMSC* mit Tachyzoiten unterschiedlicher Isolate von *T. gondii* infiziert. Hierbei sollte analysiert werden, inwieweit Zytokin-stimulierte *mMSC* antiparasitäre Effekte gegen eine *T. gondii* Infektion dieser Zellen vermitteln können.

Murine *MSC* wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ oder mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^GMMA inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte die Infektion der Wirtszellen. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil quantifiziert.

Die Abbildungen 7-13 zeigen das prozentuale Parasitenwachstum in *mMSC* für den jeweiligen Parasitenstamm. 100% Wachstum ist dabei definiert als diejenige *T. gondii* Proliferation, die in unstimulierten *mMSC* in Abwesenheit von N^GMMA gemessen wurde.

3.2.1 *T. gondii* Typ I – BK

Abbildung 7 zeigt das Wachstum des hoch virulenten *T. gondii* Stamms BK in stimulierten *mMSC*. Bei Stimulation der Wirtszellen mit hohen Konzentrationen von IFN- γ (100 U/ml) konnte keine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums bis auf weniger als 10% des Ausgangswerts.

Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA wurde wiederum ein signifikanter Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet.

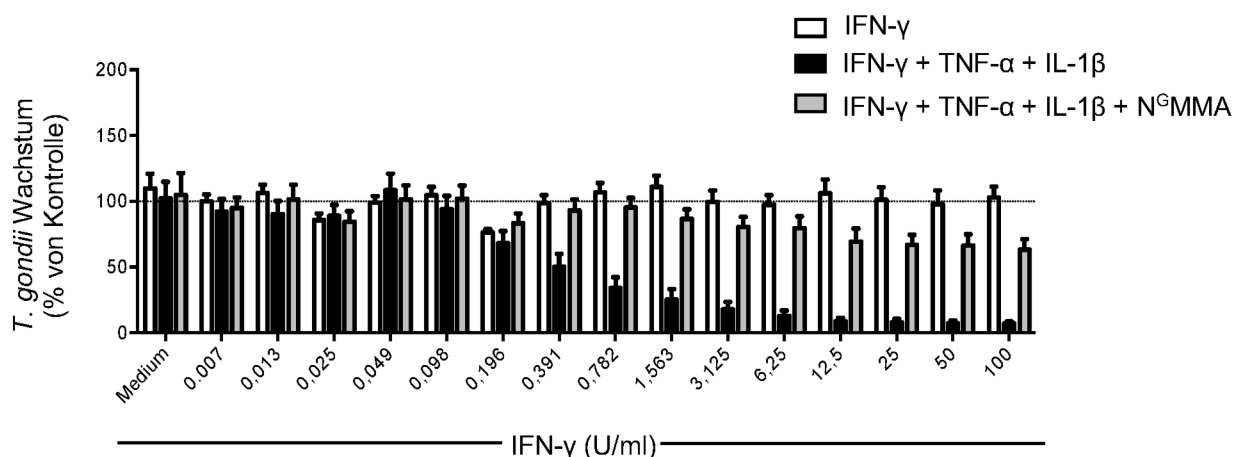


Abb. 7: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* BK Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats BK infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen 13 unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.2 *T. gondii* Typ II – ME49

Abbildung 8 zeigt das Wachstum des mittel virulenten *T. gondii* Stamms ME49 in stimulierten *mMSC*. Bereits bei einer Stimulation der Wirtszellen mit 0,2 U/ml IFN- γ konnte eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Eine Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β führte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN- γ zu einer stärkeren Hemmung des Parasitenwachstums bis auf weniger als 10% des Ausgangswerts. Bei Anwesenheit von N^GMMA und gleichzeitiger Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte kein Anstieg des Parasitenwachstums bis auf das Wachstumsniveau unstimulierter Zellen beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen stieg das prozentuale Parasitenwachstum auf ähnliche Werte wie unter alleiniger Stimulation mit IFN- γ an.

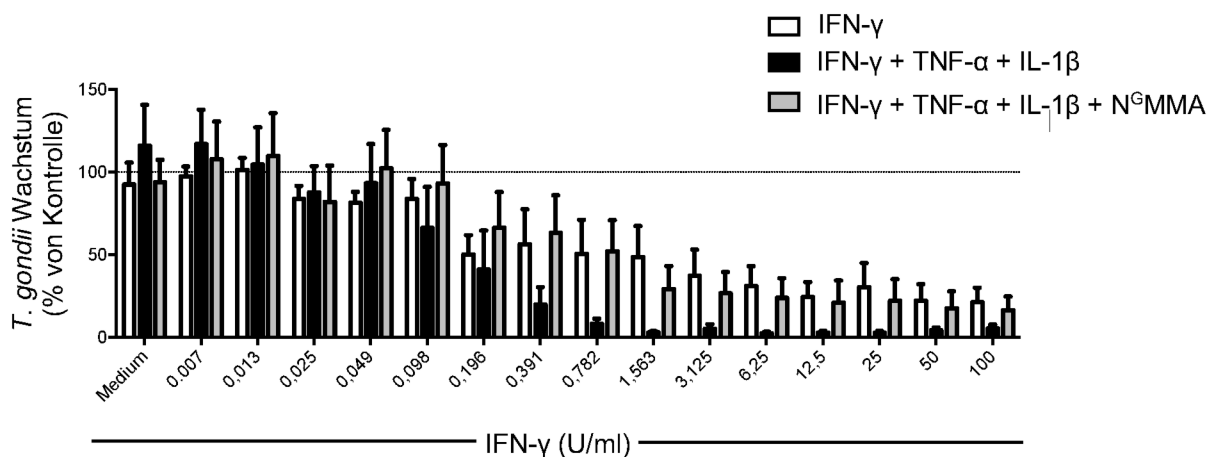


Abb. 8: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* ME49 Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats ME49 infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen sieben unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.3 *T. gondii* Typ III – NED

Abbildung 9 zeigt das Wachstum des niedrig virulenten *T. gondii* Stamms NED in stimulierten *mMSC*. Auch bei diesem Klon konnte bei alleiniger Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β war auch in diesem Fall eine stärkere Hemmung des Parasitenwachstums als bei alleiniger Stimulation mit IFN- γ zu verzeichnen.

In Anwesenheit von N^GMMA konnte nach Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β nur ein leichter Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet werden, der jedoch nicht das Wachstumsniveau unstimulierter Zellen erreichte.

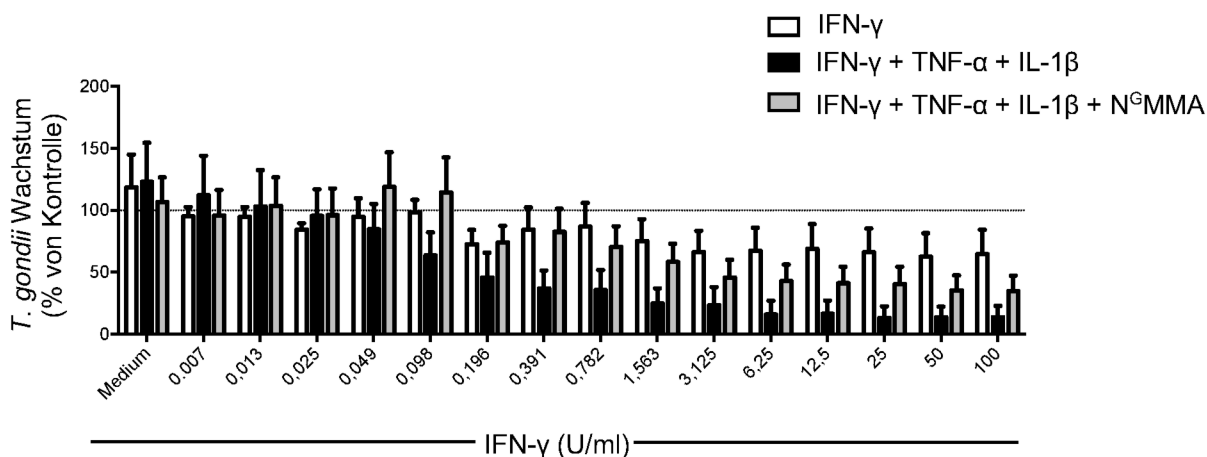


Abb. 9: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* NED Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats NED infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen sechs unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.4 C12

In Abbildung 10 ist das Wachstum des hoch virulenten atypischen *T. gondii* Stamms C12 in stimulierten *mMSC* dargestellt. Wurden die Wirtszellen ausschließlich mit IFN- γ stimuliert, konnte keine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte ab einer Konzentration von 6,25 U/ml IFN- γ eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA wurde wiederum ein signifikanter Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet.

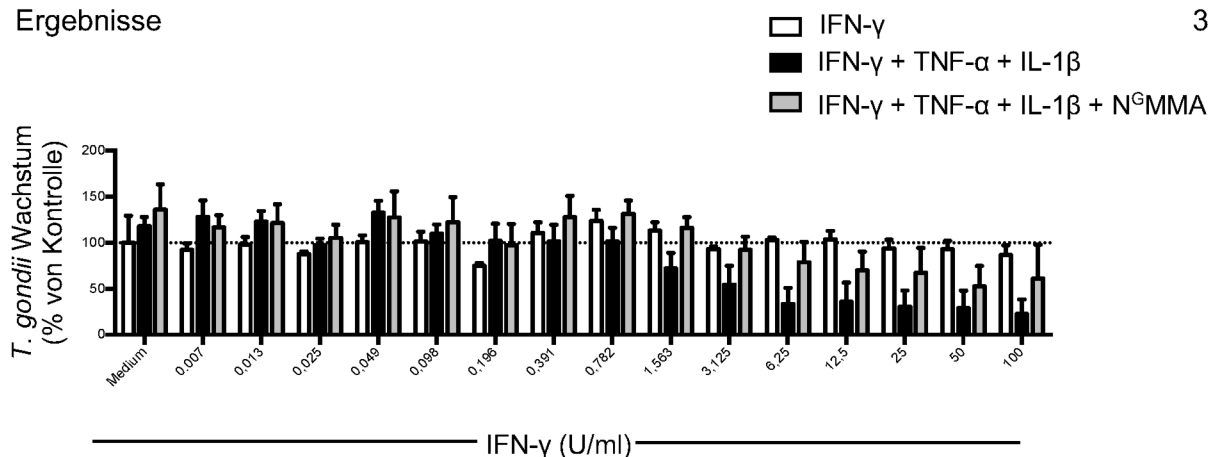


Abb. 10: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* C12 Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats C12 infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.5 BoB

Abbildung 11 stellt das Wachstum des atypischen *T. gondii* Stamms BoB in stimulierten *mMSC* dar. Bei Stimulation der Wirtszellen mit einer maximalen Konzentration von 100 U/ml IFN- γ wurde eine Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet. Durch Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β wurde die Hemmung des Parasitenwachstums verstärkt. Bei Anwesenheit von N^GMMA und gleichzeitiger Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte kein signifikanter Anstieg des Parasitenwachstums bis auf das Niveau der Kontrolle beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen stieg das prozentuale Parasitenwachstum auf vergleichbare Werte wie unter alleiniger Stimulation mit IFN- γ an.

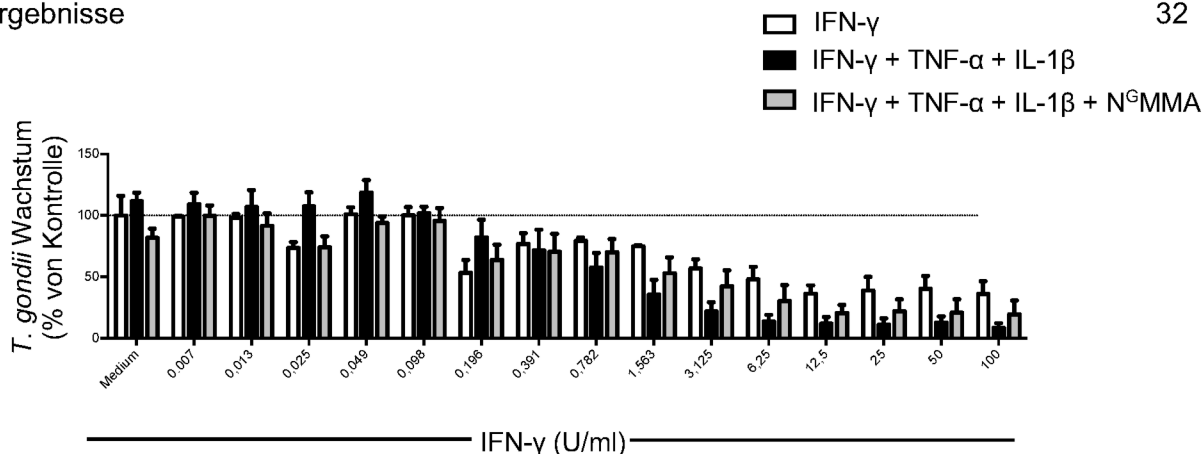


Abb. 11: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* BoB Wachstums in murinen MSC. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats BoB infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.6 B6-H6

Abbildung 12 zeigt das Wachstum des hoch virulenten *T. gondii* Stamms B6-H6 in stimulierten *mMSC*. Bei Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ konnte keine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β war erst ab einer Konzentration von mindestens 50 U/ml IFN- γ eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums zu beobachten. Unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA sowie Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β wurde ein Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet. Unter diesen Bedingungen stieg das prozentuale Parasitenwachstum auf vergleichbare Werte wie unter alleiniger Stimulation mit IFN- γ an.

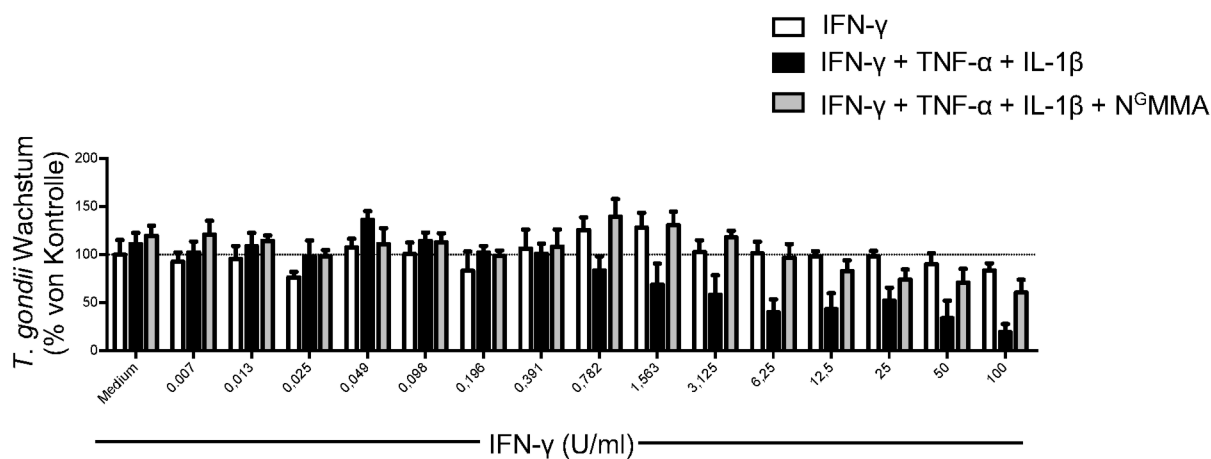


Abb. 12: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* B6-H6 Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats B6-H6 infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen vier unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.7 A-7

In Abbildung 13 wird das Wachstum des niedrig virulenten atypischen *T. gondii* Stamms A-7 in stimulierten *mMSC* gezeigt. Bei Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ in einer maximalen Konzentration von 100 U/ml wurde eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet.

Eine Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β führte zu einer stärkeren Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN- γ . Bei Anwesenheit von N^GMMA und gleichzeitiger Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte ein Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet werden. Das Parasitenwachstum unter diesen Bedingungen unterschied sich jedoch signifikant von denjenigen unter alleiniger Stimulation mit IFN- γ .

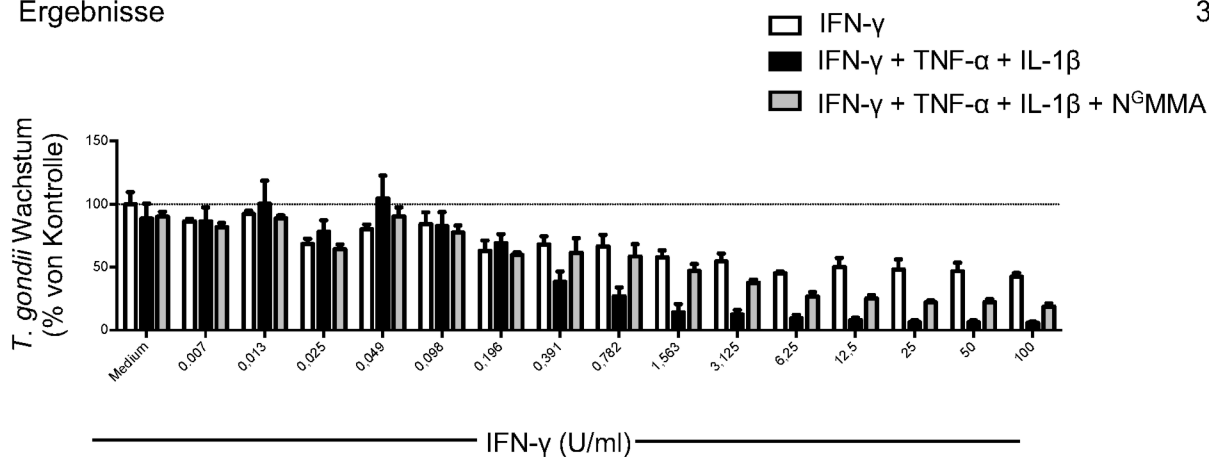


Abb. 13: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* A-7 Wachstums in *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats A-7 infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.2.8 2-H8

Abbildung 14 zeigt das Wachstum des avirulenten *T. gondii* Stamms 2-H8 in stimulierten *mMSC*. Bei Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ konnte keine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β zeigte sich jedoch eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums bis auf weniger als 10% des Ausgangswerts. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA wurde wiederum ein signifikanter Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet.

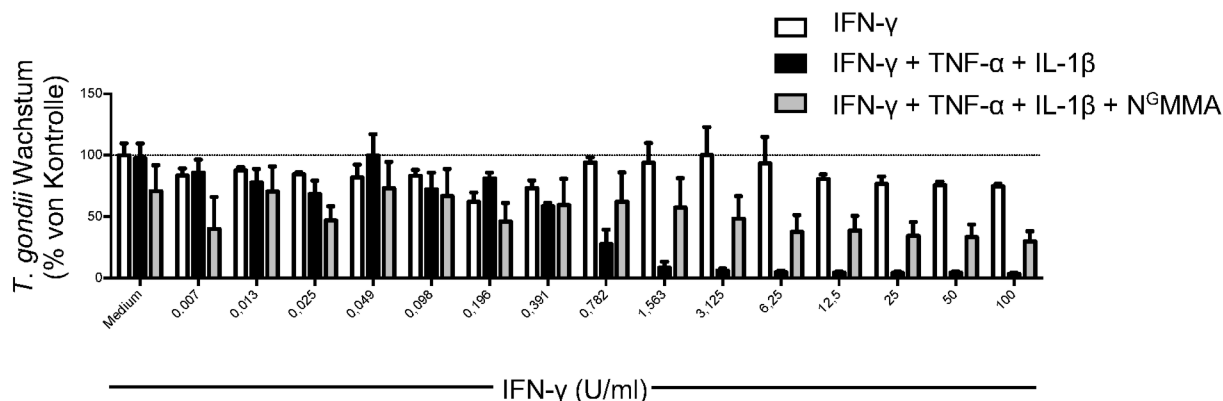


Abb. 14: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* 2-H8 Wachstums in murinen MSC. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats 2-H8 infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich also zeigen, dass *mMSC* nach Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β dazu in der Lage waren, das Wachstum von unterschiedlichen *T. gondii* Klonen *in vitro* zu hemmen. Dies gilt sowohl für die klonalen Stämme Typ I (RH), Typ II (ME49) und Typ III (NED) als auch für alle untersuchten atypischen Stämme.

Durch Supplementation des spezifischen iNOS-Inhibitor N^GMMA ließ sich die Zytokin-induzierte Inhibition des Parasitenwachstums zumindest teilweise wieder aufheben.

3.3 Analyse der Kolo-kalisation von *Irgb6* an die PV atypischer *T. gondii* Stämme

Bei einer Infektion mit *T. gondii* akkumulieren die IRG an der Parasitophoren Vakuole, die daraufhin zerstört wird. Der Parasit wird in das Zytosol der Wirtszelle entlassen und dort mittels lysosomaler Degradation abgebaut. Da gezeigt wurde, dass insbesondere das Wachstum niedrig virulenter *T. gondii* Stämme durch alleinige Stimulation mit IFN- γ gehemmt werden kann, wurde untersucht, ob IFN- γ regulierte Abwehrmoleküle wie GTPasen eine Rolle bei der Abwehr der niedrig virulenten Stämme spielen.

Um den Einfluss der *Immunity-related-GTPases* auf das Parasitenwachstum am Beispiel des Proteins *Irgb6* zu analysieren, wurden zum einen Infektionsversuche mit Zytokin-stimulierten

Wirtszellen durchgeführt. Zum anderen erfolgte der direkte Nachweis des *targetings* von *Irgb6* an die PV mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie.

3.3.1 IFN- γ -abhängige *Irgb6*-Expression in *mMSC*

Zunächst sollte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *mMSC* das Protein *Irgb6* nach entsprechender Zytokinstimulation exprimieren. Hierzu wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen für 16 Stunden mit IFN- γ in einer Konzentration von 100 U/ml inkubiert oder blieben unstimuliert. Aus den Zellysaten wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von murinem β -Aktin. Mithilfe spezifischer Antikörper wurden die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine detektiert.

In Abbildung 15 ist exemplarisch eine *Western Blot*-Analyse dargestellt. Gezeigt werden die Expression von *Irgb6* unter Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ sowie die unstimulierte Kontrolle. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass *mMSC* IFN- γ -abhängig das Protein *Irgb6* exprimieren. In unstimulierten Zellen findet hingegen keine Expression des untersuchten Proteins statt.

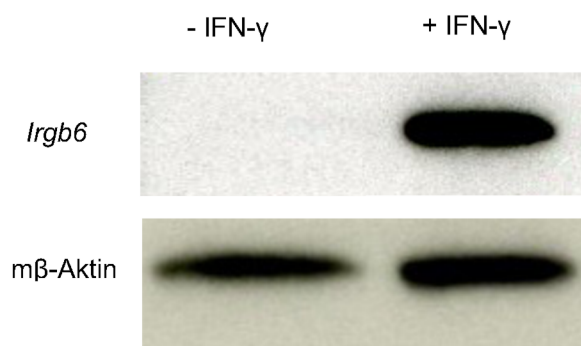


Abb. 15: *Western Blot*-Analyse zur Expression von *Irgb6* in stimulierten und unstimulierten *mMSC*. Murine mesenchymale Stromazellen wurden für 16 Stunden mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert (+ IFN- γ) oder blieben unstimuliert (- IFN- γ). Aus den Zellysaten wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Es wurden 5 μ g Protein je Spur aufgetragen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin (m β -Aktin). Mithilfe spezifischer Antikörper wurden die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine detektiert.

3.3.2 Analyse der Kolo-kalisation von *Irgb6* und *T. gondii* SAG1 in IFN- γ -stimulierten *mMSC*

Im Folgenden wurde die IFN- γ -induzierte Rekrutierung der GTPase *Irgb6* zur PV atypischer *T. gondii* Klone untersucht. Hierzu wurden *mMSC* mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Zellen wurden mit *T. gondii* Typ I, Typ II und Typ III sowie verschiedenen atypischen Klonen infiziert. Mittels spezifischer Färbungen und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Rekrutierung von *Irgb6* zur PV quantifiziert.

Abb. 16, Bildreihe 1 stellt exemplarisch die Rekrutierung von *Irgb6* zur PV eines *T. gondii* Typ II (ME49) dar. Nach Stimulation mit IFN- γ und Infektion mit einem Typ II Parasiten wurde bei der Mehrzahl der intrazellulären Parasiten eine Kolokalisation von *Irgb6* und PV detektiert.

Am Beispiel eines *T. gondii* Typ I (BK) wird in Abb. 16, Bildreihe 2 das Bild einer nicht rekrutierten PV gezeigt. Bei Infektion mit einem Typ I Parasiten konnte in IFN- γ -stimulierten *mMSC* nur eine schwache Kolokalisation von *Irgb6* und PV beobachtet werden.

Zur Quantifizierung der Rekrutierung von *Irgb6* zur PV atypischer *T. gondii* wurden pro Versuch je 100 Vakuolen in IFN- γ -stimulierten *mMSC* auf eine mögliche Kolokalisation hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in Abb. 17 gezeigt. Gezeigt ist derjenige Anteil der Parasitophoren Vakuolen, an denen eine Kolokalisation von *Irgb6* beobachtet wurde.

In der Mehrzahl der von den beiden hoch virulenten *T. gondii* Klonen (RH und BK) gebildeten Vakuolen konnte keine Kolokalisation von *Irgb6* und PV detektiert werden. Lediglich in 3% (RH) bzw. 2% (BK) der Fälle war eine Kolokalisation nachweisbar.

Im Falle der mittel und niedrig virulenten Parasiten ME49 und NED konnte hingegen eine stärkere Kolokalisation von *Irgb6* und PV beobachtet werden: Nach Infektion mit ME49 konnte in 27% der analysierten Vakuolen eine Rekrutierung von *Irgb6* detektiert werden. Bei einer Infektion mit NED wurde in 25% der Vakuolen eine Kolokalisation mit *Irgb6* beobachtet.

Das Lokalisationsverhalten der *T. gondii* Stämme B6-H6 und BoB war vergleichbar mit der Lokalisation von *Irgb6* zur PV eines Typ I Parasiten: Bei der überwiegenden Zahl der analysierten Vakuolen (3% bzw. 5%) konnte keine Rekrutierung von *Irgb6* zur PV detektiert werden. Im Falle des hoch virulenten atypischen *T. gondii* Stamms C12 konnte bei 12% der Vakuolen eine Kolokalisation von *Irgb6* und PV beobachtet werden.

Das Lokalisationsverhalten der niedrig virulenten atypischen *T. gondii* Stämme A-7 und 2-H8 war mit dem Lokalisationsverhalten der mittel bzw. niedrig virulenten Typ II und Typ III Parasiten vergleichbar: Hier konnte in 23% (A-7) bzw. 35% (2-H8) der analysierten Vakuolen eine Rekrutierung von *Irgb6* beobachtet werden.

An der PV hoch virulenter Parasiten (BK, B6-H6, C12) zeigte sich somit keine bzw. nur eine geringe Akkumulation von *Irgb6*. Jedoch waren bis zu 40% der untersuchten Vakuolen mittel (ME49, A-7) und niedrig (NED, 2-H8) virulenter *T. gondii* *Irgb6*-positiv (siehe Abb. 17).

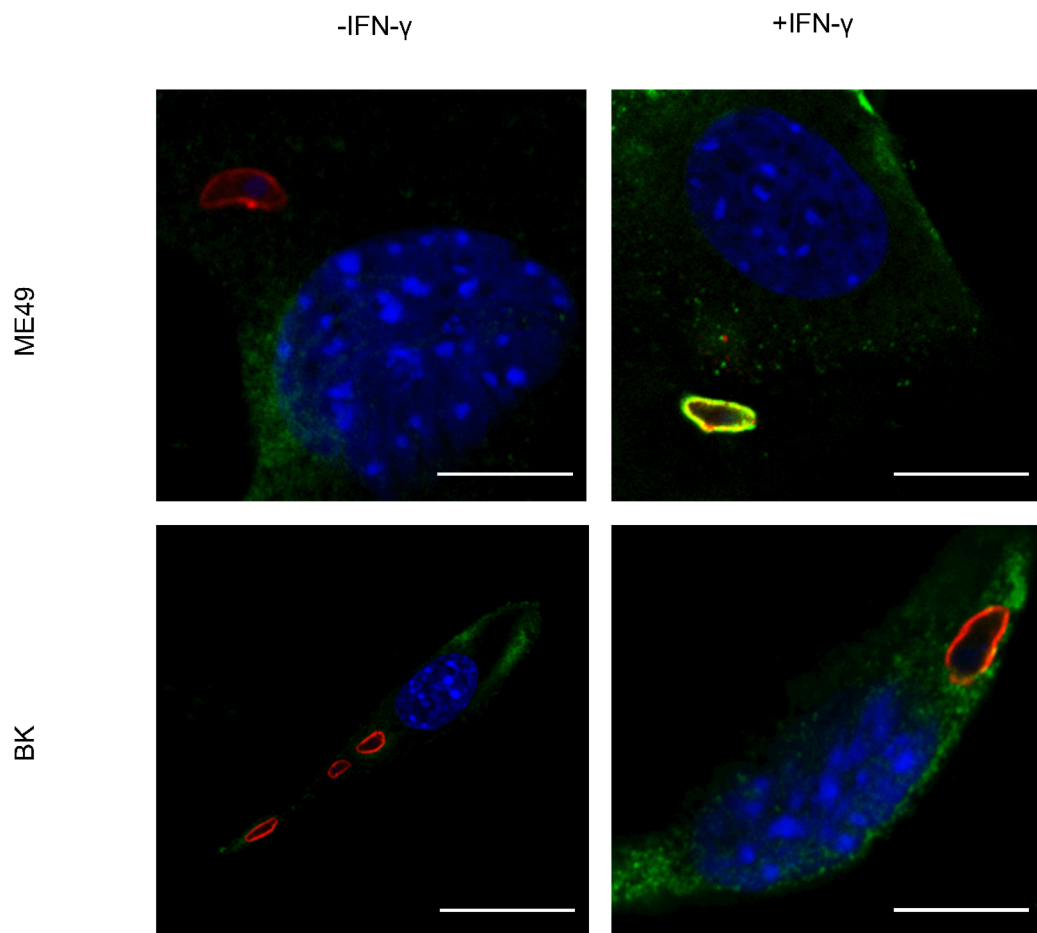


Abb. 16: Lokalisation von *Irgb6* in *mMSC* nach Infektion mit *T. gondii* Typ I und II. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Zellen mit *T. gondii* Typ I (BK) und Typ II (ME49) sowie verschiedenen atypischen Klonen infiziert. Die Zellen wurden nun für ca. 2-3 Stunden im Brutschrank inkubiert und regelmäßig mikroskopiert. Sobald intrazelluläre Parasiten mikroskopisch sichtbar waren, erfolgte die Färbung mit einem *T. gondii* SAG1-spezifischen Antikörper (rot) sowie mit einem *Irgb6*-spezifischen Antikörper (gelb). Die Kolokalisation von *Irgb6* (gelb) und Parasiten (rot) wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Maßstabsbalken repräsentieren jeweils eine Länge von 10 μ m.

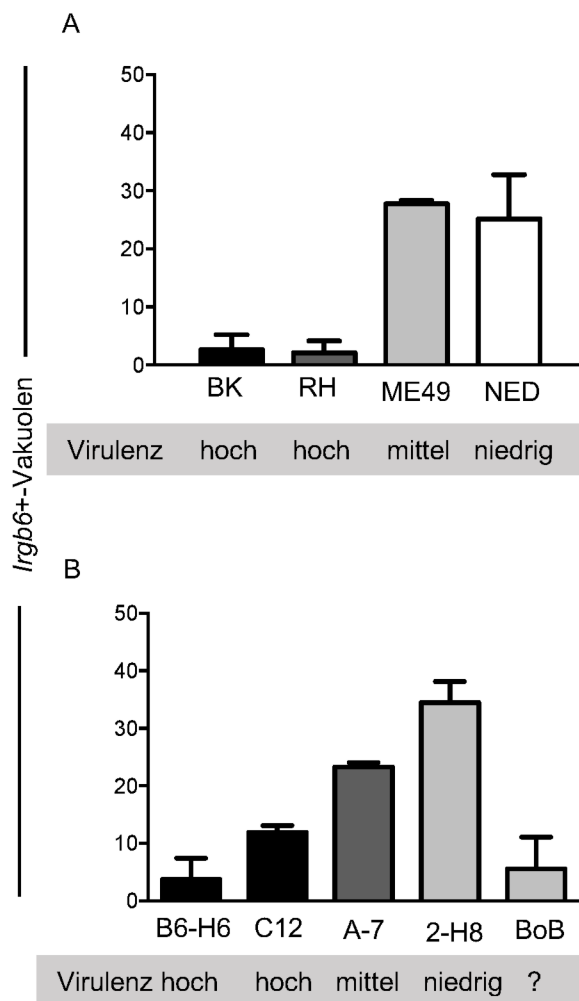


Abb. 17: Quantifizierung der *Irgb6*-Rekrutierung in *mMSC* zur PV unterschiedlicher *T. gondii* Stämme. Murine mesenchymale Stromazellen wurden mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Zellen mit *T. gondii* Typ I (BK, RH), Typ II (ME49), Typ III (NED) sowie verschiedenen atypischen Klonen infiziert. Die Zellen wurden nun für ca. 2-3 Stunden im Brutschrank inkubiert und regelmäßig mikroskopiert. Sobald intrazelluläre Parasiten mikroskopisch sichtbar waren, erfolgte die Färbung mit einem *T. gondii* *SAG1*-spezifischen Antikörper sowie mit einem *Irgb6*-spezifischen Antikörper. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden je 100 Vakuolen des jeweiligen Parasiten auf eine Kolokalisation mit *Irgb6* analysiert. Gezeigt ist derjenige Anteil der parasitophoren Vakuolen, an denen eine Kolokalisation von *Irgb6* beobachtet wurde. Darüber hinaus wird die Virulenz in *balb/c* Mäusen dargestellt. In Teil A sind die Ergebnisse der klonalen *T. gondii* Stämme dargestellt. Teil B stellt die Ergebnisse der atypischen Stämme dar. Die Graphik zeigt die prozentualen Mittelwerte der Zellzahlen \pm SEM, die aus zwei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden.

3.4 Analyse antiparasitärer Effektormechanismen unter Hypoxie

Der Einfluss erniedrigter Sauerstoffkonzentrationen auf die Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wurde bereits beschrieben [68]. Unter inflammatorischen Bedingungen kann es in Geweben lokal zu einer relevanten Hypoxie kommen. Die induzierbare NO-Synthase benötigt als Substrat für die katalysierte Reaktion molekularen Sauerstoff. Hypoxie könnte somit einen Einfluss auf die katalysierte Reaktion haben und somit einen Einfluss auf das Überleben intrazellulärer Parasiten nehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirksamkeit antimikrobieller Mechanismen unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

3.4.1 Einfluss der Hypoxie auf die Zellzahl

Um einen möglichen Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen auf die Proliferation von *mMSC* zu quantifizieren, wurde zunächst die Zellzahl nach einer definierten Zeit bestimmt. Murine *MSC* wurden wie im Methodenteil beschrieben geerntet und gezählt. 1×10^6 *mMSC* wurden anschließend in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät und entweder unter Normoxie (20% O_2) oder unter Hypoxie (1% O_2) kultiviert. In beiden Fällen konnte nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden ein konfluenter *monolayer* beobachtet werden. Die Zellen wurden nun erneut geerntet und gezählt.

Abbildung 18 stellt die jeweiligen Zellzahlen unter Hypoxie und Normoxie gegenüber. Hierbei zeigt sich, dass die Kultivierung von *mMSC* unter hypoxischen Kulturbedingungen mit 1% Sauerstoff innerhalb von 72 Stunden keinen signifikanten ($p = 0,7914$) Einfluss auf die Zellzahl nimmt.

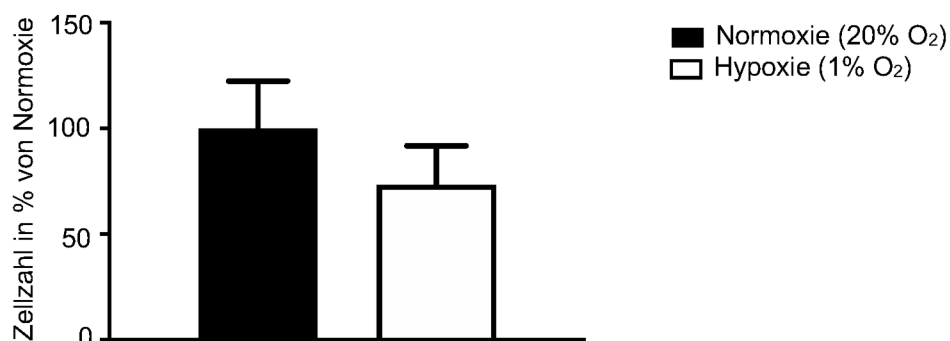


Abb. 18: Proliferation nativer muriner *MSC* unter Normoxie (20% O_2) und Hypoxie (1% O_2). Murine mesenchymale Stromazellen wurden geerntet und gezählt. 1×10^6 Zellen wurden anschließend in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät und entweder unter Normoxie (20% O_2) oder unter Hypoxie (1% O_2) weiterkultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen erneut geerntet und gezählt. Die Graphik zeigt die prozentualen Mittelwerte der Zellzahlen \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.4.2 Einfluss der Hypoxie auf die Zellviabilität

Um den Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen auf die Vitalität und Viabilität der verwendeten Wirtszellen zu analysieren, wurden Färbungen mit Calcein und Ethidium Homodimer-1 durchgeführt. Abbildung 19 stellt die jeweiligen relativen Fluoreszenzeinheiten für Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1 unter Normoxie und Hypoxie nach Subtraktion der Hintergrundaktivität dar. Zudem wird exemplarisch je eine Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Bezüglich der Anteile vitaler und avitaler Zellen zwischen einer Kultivierung unter Normoxie und Hypoxie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,2368$).

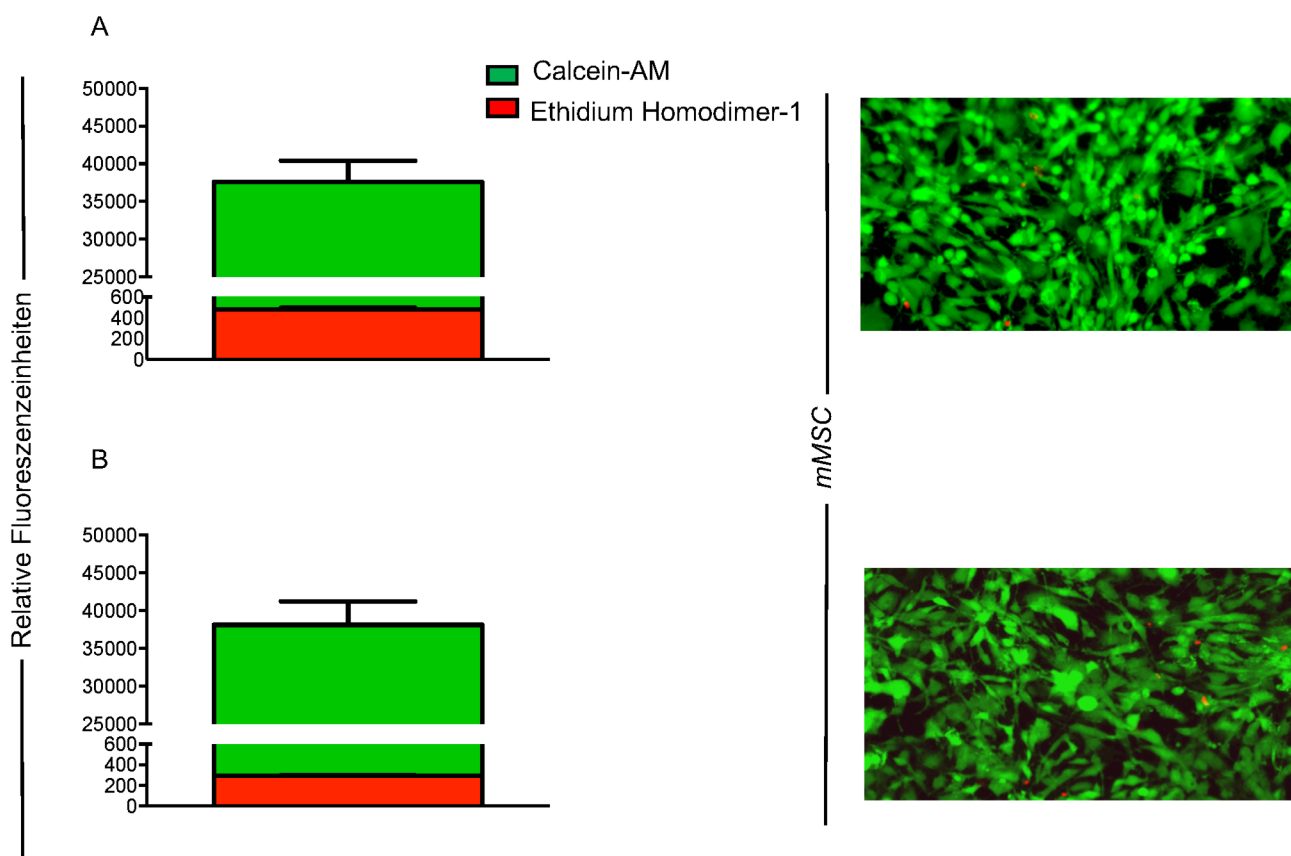


Abb. 19: Zellviabilität nativer muriner MSC unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). Murine MSC wurden auf einer 96-well-Platte ausgesät und entweder unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS versetzt. Die Zellen wurden nun mit einer Färbelösung (2 μ M Calcein-AM und 4 μ M Ethidium Homodimer-1) gefärbt und für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden erfolgte die Fluoreszenzmessung am Fluoreszenzreader Synergy Mx (Winooski, VT, USA) entsprechend der Exzitations- und Emissionsfilter von Calcein-AM (494/517 nm) und Ethidium Homodimer-1 (528/617 nm). Dargestellt sind die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten für Calcein und Ethidium Homodimer-1 unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) nach Subtraktion der Hintergrundaktivität \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen fünf unabhängiger Versuche resultierten. Zudem wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop *eclipse* TE2000S (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) bei einer 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Im rechten Teil der Abbildung wird exemplarisch eine Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop gezeigt.

3.4.3 Aktivität der iNOS unter Hypoxie

Um einen möglichen Einfluss der Hypoxie auf die NO-Produktion muriner mesenchymaler Stromazellen zu quantifizieren, wurde die Akkumulation von Nitriten und Stickstoff mittels der Griess-Reaktion unter Normoxie und Hypoxie verglichen. Murine mesenchymale Stromazellen wurden hierzu mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β stimuliert.

Abbildung 20 zeigt die Zytokin-vermittelte NO-Produktion in *mMSC* unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂).

Bei Kostimulation der Zellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β konnte in der Positivkontrolle eine NO-Produktion von ca. 20 μ M NO beobachtet werden. Wurden *mMSC* jedoch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert konnte unter Stimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β eine maximale NO-Produktion von ca. 10 μ M NO gemessen werden. Unter hypoxischen Kulturbedingungen wurde somit eine signifikant geringere NO-Produktion gemessen.

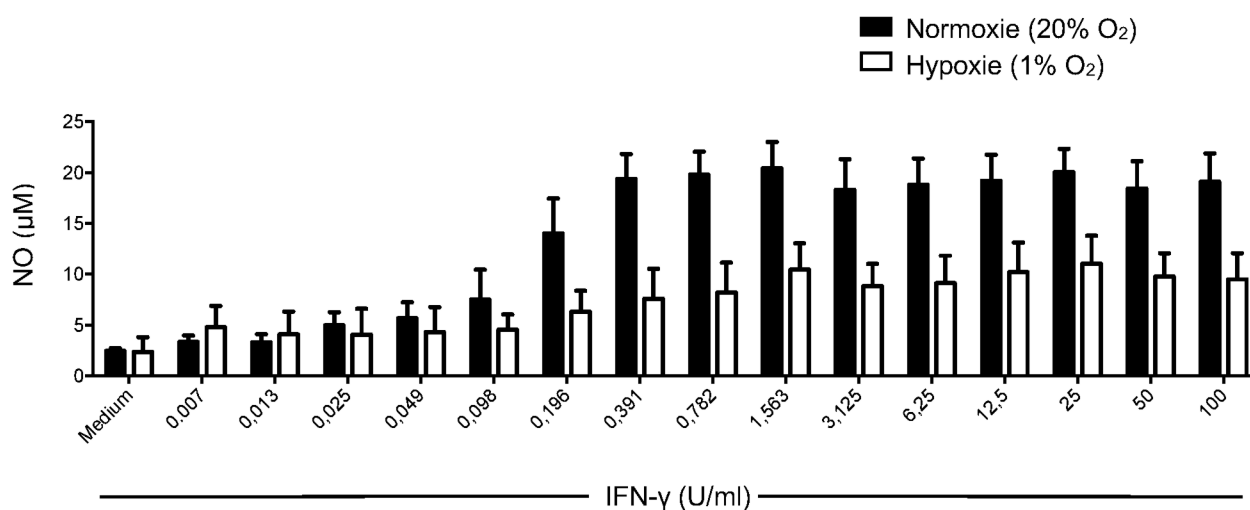


Abb. 20: Zytokin-vermittelte NO-Produktion in murinen MSC unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂).

Murine mesenchymale Stromazellen wurden mit IFN- γ (Titrationen siehe Graphik), TNF- α (100 U/ml) und IL-1 β (100 U/ml) stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde unter hypoxischen Bedingungen kultiviert (weiße Balken), während die Positivkontrolle unter Normoxie kultiviert wurde (schwarze Balken). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Versuchsüberstände mit einem definierten Volumen des Griess-Reagenzes (0,1%-N-(naphtylethylendiamin) in Aqua dest. und 2,5% Sulfonamid in 15% HCl im Verhältnis 1:1) versetzt. Im Folgenden wurde die Absorption bei 542 nm am Photometer gemessen. Die Menge des akkumulierten Nitrits wurde anhand einer Kalibrierungskurve, die auf Grundlage einer Standardreihe mit absteigenden Konzentrationen von NaNO₂ erstellt wurde, ermittelt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

3.4.4 Antiparasitärer Effekt der iNOS unter Hypoxie

Um den antiparasitären Effekt der iNOS unter Hypoxie zu untersuchen, wurden murine *MSC* mit Tachyzoiten des hoch virulenten *T. gondii* Klon BK infiziert und bei 1% O₂ kultiviert. Hierbei sollte analysiert werden, ob Zytokin-stimulierte *MSC* auch unter hypoxischen Bedingungen antiparasitäre Effekte gegen eine *T. gondii* Infektion vermitteln können und inwieweit diese Wirkung auf die NO-Produktion durch die iNOS zurückzuführen ist.

Abbildung 21 zeigt das Wachstum des hoch virulenten *T. gondii* Stamms BK in stimulierten *mMSC* unter Hypoxie. Bei Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ konnte – wie auch unter Normoxie – keine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β war eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums zu beobachten. Diese war vergleichbar mit dem antiparasitären Effekt, der unter Normoxie unter diesen Stimulationsbedingungen beobachtet wurde.

Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β unter Anwesenheit des iNOS-Inhibitors N^GMMA wurde ein Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet. Das Parasitenwachstum unter diesen Bedingungen unterschied sich jedoch signifikant von demjenigen unter alleiniger Stimulation mit IFN- γ .

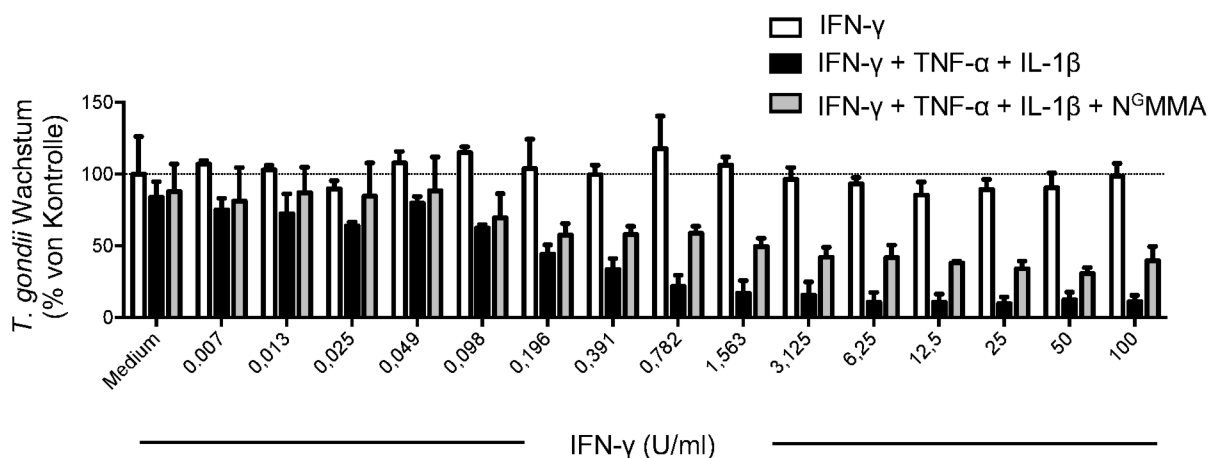


Abb. 21: Zytokin-induzierte Hemmung des *T. gondii* Wachstums in *mMSC* unter Hypoxie (1% O₂). Murine mesenchymale Stromazellen wurden mit IFN- γ (weiße Balken) bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (schwarze Balken) stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert (graue Balken). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 1% O₂ wurden die Zellen mit Tachyzoiten des *T. gondii* Isolats BK infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil (³HU) quantifiziert. Die gepunktete Linie repräsentiert das Parasitenwachstum in unstimulierten Wirtszellen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte des prozentualen Parasitenwachstums \pm SEM, die aus Dreifachbestimmungen drei unabhängiger Versuche ermittelt wurden.

Murine mesenchymale Stromazellen können also das Wachstum von hochvirulenten *T. gondii* auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren, obwohl unter diesen Bedingungen eine geringere Aktivität der iNOS zu beobachten ist.

4. Diskussion

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der weltweit verbreitet ist. Die durchschnittliche Seroprävalenz liegt in Deutschland bei Erwachsenen bei ca. 50% und steigt mit jedem Lebensjahr um ca. 1% an [69]. Während in Europa und Nordamerika hauptsächlich drei klonale Stämme von *T. gondii* vorzufinden sind, dominieren in anderen Teilen der Welt atypische Genotypen, die durch sexuelle Rekombination im Endwirt entstanden sind [21]. Mehrere Arbeiten liefern Hinweise darauf, dass Infektionen mit einem solchen atypischen *T. gondii* Stamm zu schwerwiegenderen Symptomen als bei einer Infektion mit einem klonalen Stamm, z.B. zu einer ausgeprägten okulären Toxoplasmose, führen können [70].

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss antiparasitärer Effektormechanismen auf das Wachstum verschiedener Stämme von *T. gondii*. Zur Analyse der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase sowie der *Immunity-related-GTPases* wurden *In-vitro*-Versuche mit murinen mesenchymalen Stromazellen und genetisch unterschiedlichen Isolaten von *T. gondii* durchgeführt.

4.1 iNOS-Aktivität in *mMSC* nach Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β

Zur Quantifizierung der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase wurde die Akkumulation von Nitriten und Stickstoff mithilfe der Griess-Reaktion [71] bestimmt. Dieser liegt eine Azokopplung von Nitrit an Naphthylethylendiamin zugrunde, welches sich photometrisch bei 540 nm quantifizieren lässt. Um zu beweisen, dass die iNOS die Quelle für die detektierten Stickstoffverbindungen darstellt, wurde der spezifische iNOS-Inhibitor N^GMMA in adäquater Konzentration (100 μ g/ml) zu den Versuchsansätzen hinzugefügt. Unter Hinzugabe dieses Antagonisten wurde die NO-Produktion signifikant gehemmt ($p < 0,0001$). Dennoch wurde in Anwesenheit von N^GMMA durchschnittlich eine NO-Konzentration von 5 μ M gemessen. Möglicherweise existieren weitere Quellen für Nitritverbindungen in murinen MSC, die durch N^GMMA nicht beeinflusst werden.

Vorversuche mit einer anderen murinen Zellreihe, die durch Infektion mit dem Abelson-Maus-Leukämievirus entwickelt wurde (RAW 264.7), wiesen eine NO-Produktion nach alleiniger Stimulation mit IFN- γ nach. Auch für murine Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass diese nach Stimulation mit IFN- γ NO produzieren [72]. Wurden hingegen murine mesenchymale Stromazellen allein mit IFN- γ stimuliert, konnte, wie in den Arbeiten von Meisel et al. [63], auch bei Stimulation mit hohen Dosen (100 U/ml IFN- γ) keine relevante Produktion von NO-Verbindungen induziert werden. Um eine starke NO-Produktion zu induzieren, war eine zusätzliche Kostimulation mit den beiden proinflammatorisch wirksamen Zytokinen IL-1 β und TNF- α erforderlich.

Aus den genannten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Mechanismen, die zur Expression der iNOS führen, nicht in allen murinen Zellen gleich ausgeprägt sind. Im Gegensatz zu anderen Isoformen dieses Enzyms, der endothelialen (eNOS) und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), wird die Aktivität der iNOS über *De-novo*-Synthese des Proteins reguliert [73]. Die molekularen Mechanismen, die zur Expression der iNOS führen, sind abhängig von Zelltyp und Art der Stimulation.

Die Promotorregion des iNOS-Gens beinhaltet unterschiedliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, z.B. für den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* ($NF_{\kappa}B$) [74, 75] oder den *signal transducer and activator of transcription*, *STAT-1* [76]. $NF_{\kappa}B$ liegt unter Ruhebedingungen inaktiv als Komplex im Zytosol vor. Auf einen Stimulus hin wandert freies $NF_{\kappa}B$ in den Zellkern und induziert dort die Transkription der iNOS.

Teng et al. [77] zeigten, dass die iNOS in glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten entweder durch IL-1 β alleine oder IL-1 β in Kombination mit IFN- γ induziert wird. Eine alleinige Stimulation mit IFN- γ führt jedoch nicht zur Expression der iNOS. Die ausschließliche Stimulation mit IL-1 β führt zur Aktivierung des $NF_{\kappa}B$ -Signalweges, wohingegen IFN- γ einen zusätzlichen Effekt über den *STAT-1* vermittelt.

Koide et al. [78] konnten wiederum zeigen, dass nach Stimulation mit TNF- α in glatten Muskelzellen von Ratten vermehrt iNOS *mRNA* nachweisbar ist. Durch Hinzugabe von Cycloheximide, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, konnte die TNF- α -abhängige Expression von iNOS *mRNA* deutlich gehemmt werden. Dies impliziert, dass die TNF- α -abhängige Expression von iNOS *mRNA* über *De-novo*-Synthese eines Proteins vermittelt wird. Da bekannt ist, dass TNF- α auch die Akkumulation von IL-1 β *mRNA* vermittelt [31], erscheint es denkbar, dass TNF- α über die Induktion von IL-1 β einen stimulatorischen Effekt auf die iNOS ausübt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Zusammenspiel verschiedener proinflammatorischer Zytokine erforderlich ist, um die Aktivität der iNOS in murinen mesenchymalen Stromazellen zu induzieren.

4.2 Murine mesenchymale Stromazellen können das Wachstum von *T. gondii* nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen inhibieren

Um den Einfluss antiparasitärer Effektormechanismen gegen *T. gondii* *in vitro* zu analysieren, wurden *mMSC* mit Tachyzoiten unterschiedlicher Isolate von *T. gondii* infiziert. Hierbei sollte analysiert werden, ob Zytokin-stimulierte *mMSC* antiparasitäre Effekte gegen eine *T. gondii* Infektion dieser Zellen vermitteln können.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass *mMSC* nach Kostimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ , TNF- α und IL-1 β) dazu in der Lage waren, das Wachstum von unterschiedlichen *T. gondii* Klonen *in vitro* zu hemmen. Dies gilt sowohl für die klonalen Stämme Typ I (RH), Typ II (ME49) und Typ III (NED) als auch für alle untersuchten atypischen Stämme.

Durch Supplementation des spezifischen iNOS-Inhibitor N^GMMA ließ sich die Zytokin-induzierte Inhibition des Parasitenwachstums zumindest teilweise wieder aufheben, womit sich die Beteiligung der iNOS an dem antiparasitären Effekt in murinen *MSC* belegen lässt. Dies konnte jedoch nur für die hoch virulenten Stämme BK und C12 deutlich gezeigt werden. Es lässt sich daher vermuten, dass die Aktivität der iNOS in murinen Zellen eine zentrale Rolle für die Wachstumskontrolle hoch virulenter *T. gondii* Isolate spielt, während bei niedrig virulenten Stämmen ein weiterer, nicht iNOS-vermittelter antiparasitärer Effekt zu vermuten ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Wachstum hoch virulenter *T. gondii* Stämme maßgeblich durch die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase gehemmt wird. Dieser inhibitorische Effekt lässt sich durch Zugabe des spezifischen iNOS-Inhibitors N^GMMA weitestgehend antagonisieren.

Der durch IFN- γ , TNF- α und IL-1 β induzierte antiparasitäre Effekt muriner mesenchymaler Stromazellen gegen die mittel und niedrig virulenten Stämme ME49 und NED konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise durch N^GMMA antagonisiert werden. Die Zugabe von N^GMMA konnte auch bei keinem der untersuchten mittel oder niedrig virulenten atypischen Stämme eine vollständige Aufhebung der Wachstumsinhibition bewirken. Dies legt den Schluss nahe, dass in *mMSC* neben der iNOS ein weiterer IFN- γ -induzierter Effektormechanismus existieren muss.

4.3 IFN- γ induziert eine GTPasen-vermittelte Hemmung des Parasitenwachstums gegenüber mittel und niedrig virulenten *T. gondii*

Neben der Produktion von NO durch die induzierbare NO-Synthase sind mindestens zwei weitere IFN- γ -abhängige antiparasitäre Effektormechanismen beschrieben.

Hierzu zählt einerseits der Abbau von Tryptophan durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Die IDO wird jedoch auch nach maximaler Stimulation mit Zytokinen in murinen *MSC* nicht exprimiert [63].

Einen wichtigen Effektormechanismus, der durch IFN- γ in murinen Zellen aktiviert wird, stellt die Familie der p47 *Immunity-related-GTPases* (*IRG*) dar. In murinen Zellen sind 21 Gene bekannt, die für verschiedene *IRG* kodieren. Für eine Infektion mit *T. gondii* wurde mehrfach gezeigt, dass sie eine relevante Rolle bei der Parasitenabwehr spielen. Wenige Stunden nach

einer Infektion mit *T. gondii* akkumulieren die *IRG* an der Parasitophoren Vakuole [57]. Das Protein *Irgb6* spielt dabei eine zentrale Rolle, denn es ist das erste *IRG*, das an der PV lokalisiert [79]. Daher wurde in dieser Arbeit der antiparasitäre Effekt von *Irgb6* auf verschiedene typische und atypische Stämme von *T. gondii* untersucht.

Mittels *Western Blot*-Analysen konnte zunächst gezeigt werden, dass *Irgb6* nach Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ in murinen *MSC* induziert wird.

Nach einer alleinigen Stimulation der *mMSC* mit IFN- γ wurde das Wachstum mittel und niedrig virulenter *T. gondii* Isolate gehemmt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Spekker et al. [80]. Das Wachstum hoch virulenter Parasiten wurde durch eine Stimulation mit IFN- γ nicht inhibiert. Die erhobenen Daten bezüglich der Akkumulation von *Irgb6* an der PV bestätigen diese These: An der PV hoch virulenter Parasiten (BK, B6-H6, C12) zeigte sich keine bzw. nur eine geringe Akkumulation von *Irgb6*. Jedoch waren bis zu 40% der untersuchten Vakuolen mittel (ME49, A-7) und niedrig (NED, 2-H8) virulenter *T. gondii* *Irgb6*-positiv. IFN- γ -induzierte GTPasen scheinen bei der Abwehr niedrig und mäßig virulenter Parasiten eine größere Rolle zu spielen. Diese Stamm-spezifische Sensitivität gegenüber *IRG* ist abhängig von bestimmten Virulenzfaktoren, die nicht abschließend entschlüsselt sind.

Ein zentraler Virulenzfaktor von *T. gondii* ist der für die Kinase ROP18 codierende Genlocus. ROP18 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die aktiv an die Oberfläche der Parasitophoren Vakuole gelangt und dort in IFN- γ -stimulierten Zellen die Abtötung des Parasiten verhindert (siehe Abb. 22). *Irgb6* bildet im Ruhezustand an der Zellmembran einen Komplex mit dem Regulatorprotein *Irgm*. Bei Stimulation der Wirtszelle durch IFN- γ rekrutiert es zur Parasitophoren Vakuole (Abb. 22, Teil A) [81]. ROP18 verhindert durch Phosphorylierung von *IRG* diesen Rekrutierungsprozess und schützt so die PV (Abb. 22, Teil B) [82]. *T. gondii* Isolate, die ROP18 nicht exprimieren, werden kurz nach der Invasion *IRG*-vermittelt abgetötet. Während ROP18 in Typ I und II Stämmen stark exprimiert wird, fehlt es in Typ III Stämmen. Ursache hierfür ist die *upstream* der ROP18 kodierenden Sequenz liegende Region (*UPS-ROP18*). Diese *UPS-ROP18* fehlt in Typ I und II [83], sodass ROP18 exprimiert wird.

Ein weiterer Virulenzfaktor ist die Pseudokinase ROP 5, die die Aktivität von ROP18 reguliert. In Typ I und Typ III *T. gondii* verstärkt ROP5 die Aktivierung von ROP18 [84], in Typ II *T. gondii* scheint dies nicht der Fall zu sein.

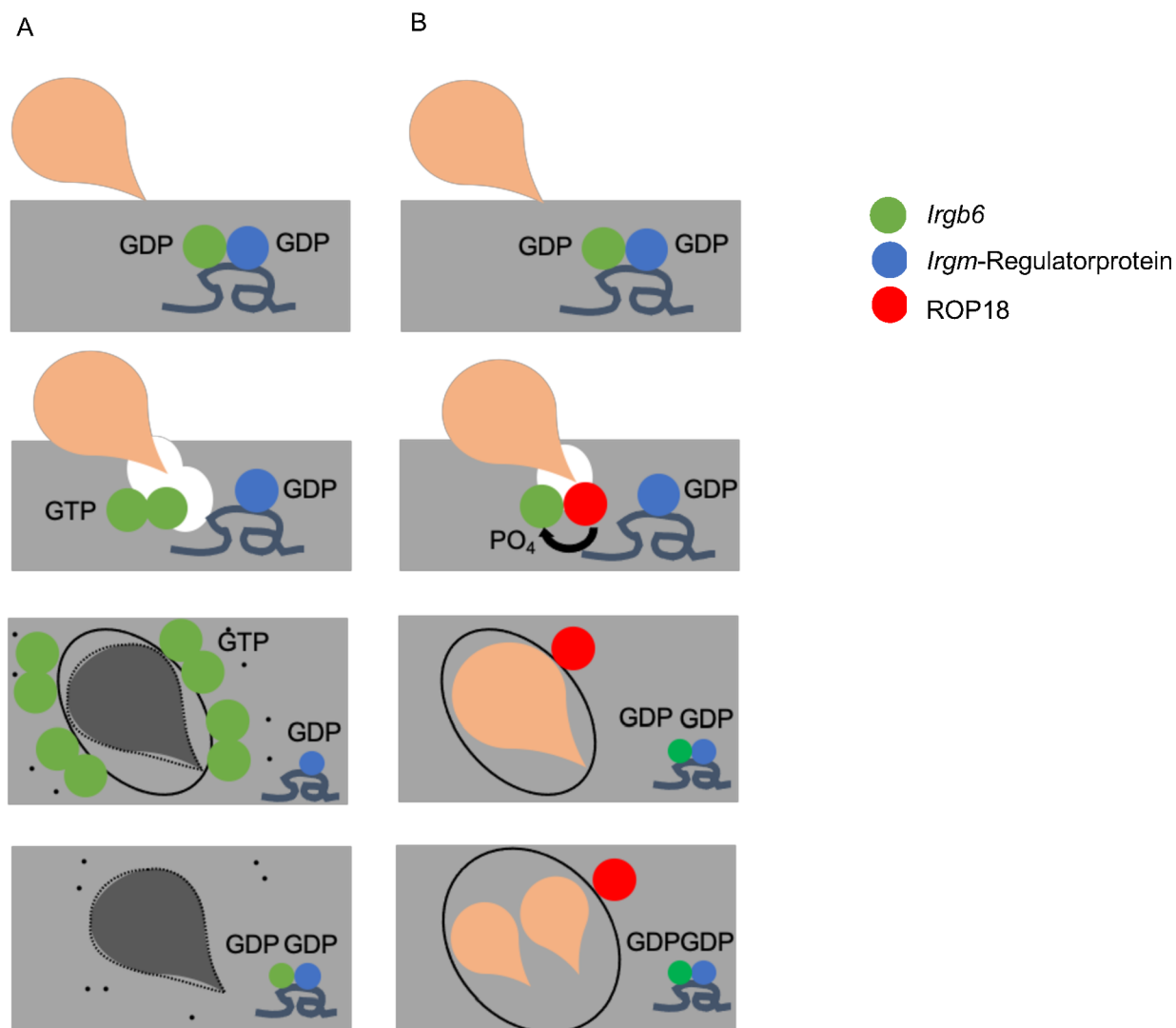


Abb. 22: Schematische Darstellung der protektiven Funktion von ROP18 für die Parasitophore Vakuole. Modifiziert nach [85]. *T. gondii* Typen, die ROP18 nicht exprimieren, werden kurz nach der Invasion abgetötet. *Irgb6* bildet im Ruhezustand einen Komplex an der Endomembran mit dem Regulatorprotein *Irgm*. Bei Stimulation der Wirtszelle durch IFN- γ rekrutiert es zur Parasitophoren Vakuole. Guanosintriphosphat (GTP) wird zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert und es bilden sich Oligomere an der Membran der PV. Letztlich kommt es zur Zerstörung der PV und zum Absterben des Parasiten (Teil A). ROP18 verhindert durch Phosphorylierung (PO_4) von *IRG* diesen Rekrutierungsprozess und schützt so die PV (Teil B).

In Tabelle 1 werden unter anderem die Virulenz der untersuchten Parasiten sowie der Phänotyp von ROP18 dargestellt. Eine Untersuchung zu ROP5 lag für die atypischen *T. gondii* zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit nicht vor.

<i>T. gondii</i> Klon	Virulenz in Balb/c Mäusen	IFN- γ -vermittelter antiparasitärer Effekt	NO-vermittelter antiparasitärer Effekt	Antagonisierung des NO-vermittelten antiparasitären Effektes durch N ^G MMA	Lokalisation von <i>Irgb6</i> an PV	UPS-ROP18
BK	+++	-	+	+	-	Typ I/II
C12	+++	-	+	+	(-)	Typ III
B6-H6	+++	-	+	+	-	Typ I/II
ME49	++	+	+	-	+	Typ I/II
A7	++	+	+	-	+	Typ III
2-H8	-	-	+	+	+	Typ III
NED	-	+	+	-	+	Typ III
BoB	-	+	+	-	-	?

Tabelle 1: Antiparasitäre Effekte gegenüber *T. gondii* in murinen MSC. Murine mesenchymale Stromazellen wurden entweder ausschließlich mit IFN- γ bzw. mit einer Kombination aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β stimuliert. Ein Teil der kostimulierten Zellen wurde zudem mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Uracil quantifiziert. Zudem wurde die Kolokalisation von *Irgb6* an die PV des Parasiten mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Graphik fasst die Ergebnisse dieser Versuche in tabellarischer Form zusammen. Diese sind vereinfacht anhand der Signifikanz der Daten dargestellt (+ = Signifikanz zum Niveau $\alpha = 0,05$, - = keine Signifikanz zum Niveau $\alpha = 0,05$). Neben den Effekten der unterschiedlichen oben genannten Versuchsbedingungen ist auch die Virulenz der verwendeten *T. gondii* Stämme anhand der letalen Dosis für Balb/c Mäuse dargestellt (+++ = LD50 < 10² Tachyzoiten, ++ = LD50 \geq 10² Tachyzoiten, + = LD50 \geq 10⁴ Tachyzoiten).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Kolokalisation (< 10%) von *Irgb6* an die Parasitophore Vakuole des hoch virulenten atypischen Klones B6-H6. Diese Daten lassen sich durch das Fehlen von UPS-ROP18 gut erklären. ROP18 wird hier exprimiert und verhindert auf oben genannte Weise die Anlagerung von IRG an die PV.

Der atypische Klon C-12 zeigt eine hohe Virulenz in Balb/c Mäusen. Wie auch bei anderen hoch virulenten Isolaten (BK, B6-H6) wird das Parasitenwachstum durch alleinige Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ nicht gehemmt. Dementsprechend zeigte sich auch nur eine geringe

Rekrutierung von *Irgb6* an die PV dieses Parasiten (ca. 10%). Für diesen Klon ist jedoch ein Typ III ROP18 beschrieben. Anhand des Vorhandenseins eines *UPS*-ROP18 lässt sich in diesem Fall keine Vorhersage über die Virulenz des Parasiten sowie die Empfindlichkeit gegenüber IFN- γ -induzierten GTPasen treffen. Möglicherweise existieren weitere Virulenzfaktoren, die das niedrige Expressionslevel von ROP18 kompensieren. Untersuchungen zu weiteren Virulenzfaktoren liegen für diesen Stamm zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

Trotz des Vorhandenseins eines Typ III ROP18 zeigte der atypische Stamm A-7 in Infektionsversuchen keine niedrige, sondern nur eine mittlere Virulenz ($LD_{50} \geq 10^2$ Tachyzoiten). Für das Wachstum dieses Parasiten konnte in dieser Arbeit, wie auch beim mittel virulenten Typ II Stamm ME49, eine Hemmung des Wachstums in IFN- γ -stimulierten murinen mesenchymalen Stromazellen gezeigt werden. In der Immunfluoreszenzanalyse waren zudem ca. 38% *Irgb6*-positive Vakuolen nachweisbar.

Auch der atypische *T. gondii* Stamm 2-H8 zeigte eine Besonderheit: Es handelt sich hierbei um einen niedrig virulenten Klon, der, wie auch der typische niedrig virulente Klon NED, ein Typ III ROP18 zeigt. Interessanterweise ließ sich bei diesem Isolat durch eine alleinige Stimulation der Wirtszellen mit IFN- γ kein antiparasitärer Effekt erzeugen. Es zeigte sich jedoch eine Lokalisation von *Irgb6* an die Parasitophore Vakuole dieses Parasiten. Es bleibt daher unklar, warum sich dieser Effekt nicht in den Daten zum Parasitenwachstum widerspiegelt.

Bei Kostimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β war eine Hemmung des Parasitenwachstums zu beobachten. Unter Hinzugabe von N^GMMA konnte ein leichter Anstieg des Parasitenwachstums beobachtet werden, der jedoch nicht das Niveau der Positivkontrolle erreichte.

Beim atypischen Klon BoB war ein IFN- γ -vermittelter antiparasitärer Effekt auf das Parasitenwachstum nachweisbar. In der Immunfluoreszenz konnte jedoch keine relevante Lokalisation von *Irgb6* an die Parasitophore Vakuole dargestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass im Falle der untersuchten *T. gondii* Stämme keine strikte Korrelation zwischen der Virulenz in Balb/c Mäusen und der Ausprägung von ROP18 und der Sensitivität gegenüber den untersuchten IFN- γ -induzierten Effektormechanismen besteht. Wie im Falle der atypischen Klone A-7 und C-12 scheint die Virulenz nicht anhand des Vorhandenseins von ROP18 Typ vorhergesagt werden zu können. ROP18 scheint nicht der einzige relevante Virulenzfaktor zu sein. Kreuzungen zwischen Typ II und Typ III Stämmen zeigen, dass die Virulenz hoch komplex ist [86]. In zwei Fällen (2-H8 und BoB) widersprachen sich die Daten bezüglich des Parasitenwachstums sowie der Immunfluoreszenz. Das

Verhalten der atypischen Isolate unterscheidet sich somit von dem der untersuchten typischen Stämme.

Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Effektormechanismen könnte klinische Relevanz erlangen, da Studien außerhalb von Europa zeigten, dass *T. gondii* mit atypischen Allelen oft im Zusammenhang mit schwerwiegender Toxoplasmose beobachtet wurden [22].

Herrmann et al. genotypisierten *T. gondii* Isolate in Deutschland. Überraschend war, dass unter 68 Isolaten drei mit atypischen und gemischten Allel-Kombinationen nachgewiesen werden konnten [21].

Eine sexuelle Rekombination scheint also in der Natur häufiger aufzutreten als bisher erwartet. Mehrere dieser atypischen Isolate besaßen eine erhöhte Virulenz für Mäuse.

4.4. Die iNOS ist auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv

Der Einfluss erniedrigter Sauerstoffkonzentrationen auf die Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wurde bereits beschrieben [66, 68, 72]. Unter inflammatorischen Bedingungen kann es in Geweben lokal zu einer relevanten Hypoxie kommen. Dies ist unter anderem auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität im entzündeten Gewebe zurückzuführen. Zudem wird durch die Vermehrung intrazellulärer Pathogene vermehrt Sauerstoff verbraucht [87].

Die induzierbare NO-Synthase benötigt als Substrat für die katalysierte Reaktion molekularen Sauerstoff:



Hypoxie könnte somit Einfluss auf die katalysierte Reaktion und damit auf das Überleben intrazellulärer Parasiten nehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirksamkeit antimikrobieller Mechanismen unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) untersucht. Zunächst erfolgte eine Messung der Nitritproduktion unter hypoxischen Kulturbedingungen. Hierbei konnte eine maximale NO-Produktion von ca. 10 µM gemessen werden. Diese war damit ca. 50% niedriger als unter Normoxie. Die Enzymaktivität der iNOS scheint somit unter Hypoxie vermindert zu sein. Denkbar wäre aber auch, dass die Hypoxie Einfluss auf das Wachstum der Wirtszellen nimmt und es somit konsekutiv zu einer verminderten Nitritproduktion kommt. Um diesen Störfaktor auszuschließen, wurden *mMSC* drei Tage unter Hypoxie kultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie in Bezug auf die Zellzahl. Eine geringere Zellzahl kann daher als Ursache für die verminderte Enzymaktivität unter Hypoxie ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die niedrigere NO-Produktion könnte eine verminderte Vitalität der Zellen und damit eine verminderte Enzymaktivität darstellen, ohne dass dabei die absolute Zellzahl beeinflusst wird. Zur Messung der Zellvitalität wurde eine Färbung mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1 durchgeführt. Calcein-AM diffundiert durch Membranen vitaler Zellen und wird durch intrazelluläre Esterasen in grün-fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Zellen mit defekter Zellmembran nehmen jedoch Ethidium Homodimer-1 auf, welches in die DNS interkaliert und eine rote Fluoreszenz emittiert [88]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass auch die Vitalität der Zellen nicht durch hypoxische Kulturbedingungen beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die iNOS auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv ist, dort jedoch eine geringere NO-Produktion als unter Normoxie zu beobachten ist. Dieser Unterschied lässt sich weder durch eine geringere Proliferationsrate noch durch eine verminderte Vitalität der Zellen unter Hypoxie erklären.

Die verminderte Sauerstoffkonzentration in entzündeten Geweben wird durch die dort aktiven Zellen erfasst, um sich an die Veränderungen anzupassen [89]. Die Sauerstoffmessung erfolgt über die Aktivierung sauerstoffabhängiger Transkriptionsfaktoren wie die *hypoxia-inducible factors 1, 2 and 3 (HIF-1,-2,-3)* [90]. *HIF-1* wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Induktion des Erythropoetin-Gens unter Hypoxie beschrieben [91]. Mittlerweile ist bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle bei der Regulation sauerstoffabhängiger Prozesse spielt [92]. Für primäre Mikrogliazellen von Ratten ist beispielsweise eine *HIF-1*-abhängige Expression der iNOS unter Hypoxie beschrieben [93]. Chen et al. [94] zeigten, dass in Alveolarmakrophagen von Ratten eine verminderte iNOS-Expression unter hypoxischen Kulturbedingungen besteht. Die Aktivität der iNOS unter Hypoxie scheint daher abhängig vom untersuchten Zelltyp zu sein.

Auch für andere antimikrobielle Effektormechanismen, die bei einer Infektion mit *T. gondii* wirksam sind, sind negative Effekte durch eine verminderte Sauerstoffkonzentration beschrieben. Die Degradation von Tryptophan zu Kynurenin durch dieIDO ist beispielsweise unter hypoxischen Kulturbedingungen vermindert [95]. Die verminderte Expression von IDO unter Hypoxie ist für verschiedene Zelllinien, u.a. Tumorzellen (Glioblastomzellen) und native Zellen (*HFF*) beschrieben. Neben der verminderten Aktivität des Enzyms wurde zudem gezeigt, dass der Einfluss der IDO auf das Wachstum von Bakterien, Parasiten und Viren unter Hypoxie deutlich geringer ausgeprägt ist [68].

4.5 Murine mesenchymale Stromazellen können das Wachstum von *T. gondii* auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren

Um den antiparasitären Effekt der iNOS unter Hypoxie zu untersuchen, wurden murine MSC mit Tachyzoiten des hoch virulenten *T. gondii* Klons BK infiziert und bei 1% O₂ kultiviert. Hierbei sollte analysiert werden, ob Zytokin-stimulierte MSC auch unter hypoxischen Bedingungen antiparasitäre Effekte gegen eine *T. gondii* Infektion vermitteln können und inwieweit diese Wirkung auf die NO-Produktion durch die iNOS zurückzuführen ist.

Wie auch unter Normoxie war auch unter Hypoxie keine Hemmung des Wachstums von *T. gondii* Typ I in IFN- γ -stimulierten *mMSC* nachweisbar. Mechanismen wie ROP18, die Typ I *T. gondii* vor einer Abtötung durch die IFN- γ induzierten GTPasen schützen, scheinen auch unter Hypoxie zu greifen.

Bei Kostimulation der Wirtszellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β war eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums zu beobachten. Diese war vergleichbar mit dem antiparasitären Effekt, der unter Normoxie unter diesen Stimulationsbedingungen beobachtet wurde.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass murine mesenchymale Stromazellen das Wachstum von *T. gondii* auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren können, obwohl unter diesen Bedingungen eine geringere Aktivität der iNOS zu beobachten ist. Geringere Mengen NO scheinen somit auszureichen, um das Parasitenwachstum effektiv zu hemmen.

Im Gegensatz zur Normoxie führte jedoch die Hinzugabe des iNOS-Antagonisten N^GMMA nicht zu einem signifikanten Anstieg des Parasitenwachstums. In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils das prozentuale Parasitenwachstum gezeigt. 100% Wachstum wurde dabei definiert als diejenige *T. gondii* Proliferation, die in unstimulierten *mMSC* in Abwesenheit von N^GMMA gemessen wurde. Unter Hypoxie konnte insgesamt ein geringeres absolutes Wachstum von *T. gondii* und damit auch eine geringere Inkorporation von radioaktiv markiertem Uracil beobachtet werden. So wird ein etwaiger Anstieg des Parasitenwachstums bei ohnehin niedrigeren Proliferationsraten möglicherweise weniger eindrucklich (siehe unten).

4.6. Kritik und Ausblick

Einen wichtigen Effektormechanismus, der durch IFN- γ in murinen Zellen aktiviert wird, stellt die Familie der *IRG* dar. Das Protein *Irgb6* spielt dabei eine zentrale Rolle, denn es ist das erste *IRG*, das an der PV lokalisiert [79]. Daher wurde in dieser Arbeit der antiparasitäre Effekt von *Irgb6* auf verschiedene typische und atypische Stämme von *T. gondii* untersucht. Untersuchungen zur Kolo-kalisation anderer *IRG* sowie *GBP* an die PV atypischer *T. gondii* Stämme wären sicherlich in Ergänzung zu den bereits erhobenen Daten aufschlussreich.

Nach einer alleinigen Stimulation der *mMSC* mit IFN- γ wurde das Wachstum mittel und niedrig virulenter *T. gondii* Isolate gehemmt. Bereits ab Konzentration von 2 U/ml IFN- γ konnte dabei eine inhibitorische Wirkung auf das Parasitenwachstum dokumentiert werden. Mittels *Western Blot*-Analysen konnte anschließend gezeigt werden, dass das Protein *Irgb6* nach Stimulation mit IFN- γ in murinen *MSC* induziert wird. Hierzu wurden *mMSC* mit IFN- γ in einer Konzentration von 100 U/ml inkubiert oder blieben unstimuliert. Aus den Zelllysaten wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Diese zeigen, dass *mMSC* IFN- γ -abhängig das Protein *Irgb6* exprimieren. Es wäre somit interessant, *Western Blot*-Analysen aus Zelllysaten, die mit aufsteigenden Konzentrationen von IFN- γ von 0 bis 100 U/ml inkubiert wurden, sowie Expressionsanalysen mittels *Real-Time-PCR* durchzuführen.

Es bleibt zudem hinzuzufügen, dass die *GBP* in humanen Zellen nicht exprimiert werden. In humanen Zellen stellt die *IDO* den wichtigsten IFN- γ -induzierten Effektormechanismus dar. Aufschlussreich könnte also eine weitere Analyse des Wachstums atypischer *T. gondii* Isolate in IFN- γ -stimulierten humanen Zellen sein.

Um den antiparasitären Effekt der *iNOS* unter Hypoxie zu untersuchen, wurden murine *MSC* mit Tachyzoiten des hochvirulenten *T. gondii* Klons BK infiziert und bei 1% O_2 kultiviert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *mMSC* das Wachstum von *T. gondii* auch unter hypoxischen Kulturbedingungen inhibieren können, obwohl unter diesen Bedingungen eine geringere Aktivität der *iNOS* zu beobachten ist. Im Gegensatz zur Normoxie führte jedoch die Hinzugabe des *iNOS*-Antagonisten N^G MMA zu keinem signifikanten Anstieg des Parasitenwachstums. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der inhibitorische Effekt von N^G MMA auf die *NO*-Produktion unter Hypoxie weniger stark ausgeprägt war als unter Normoxie. Sinnvoll wäre es an dieser Stelle gewesen, die Konzentration von N^G MMA versuchsweise zu erhöhen, um ggf. auch unter Hypoxie eine Antagonisierung der Hemmung des Parasitenwachstums herbeizuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das prozentuale Parasitenwachstum der unterschiedlichen *T. gondii* Isolate dargestellt. 100% Wachstum wurde dabei definiert als diejenige *T. gondii* Proliferation, die in unstimulierten *mMSC* in Abwesenheit von N^G MMA gemessen wurde. Unter Hypoxie konnte jedoch ein geringeres absolutes Wachstum von *T. gondii* und damit auch eine

geringere Inkorporation von radioaktiv markiertem Uracil beobachtet werden (Rohdaten im Ergebnisteil nicht gezeigt). So wird ein etwaiger Anstieg des Parasitenwachstums bei ohnehin niedrigeren Proliferationsraten möglicherweise weniger deutlich als bei höheren Proliferationsraten. Um eine bessere Vergleichbarkeit des Parasitenwachstums zu erzielen, wäre eine direkte Quantifizierung der Proliferation, z.B. mittels quantitativer *PCR*, möglicherweise besser geeignet bzw. ergänzend sinnvoll.

Es konnte gezeigt werden, dass die iNOS auch unter hypoxischen Bedingungen aktiv ist, dort jedoch eine geringere NO-Produktion als unter Normoxie zu beobachten ist. Dieser Unterschied lässt sich weder durch eine geringere Proliferationsrate noch durch eine verminderte Vitalität der Zellen unter Hypoxie erklären.

Die Aktivität der iNOS unter Hypoxie scheint daher abhängig vom untersuchten Zelltyp zu sein. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen mesenchymalen Stromazellen wäre unter diesem Gesichtspunkt ergänzend zur Analyse der Enzymaktivität eine Untersuchung der Expression der iNOS unter Hypoxie mittels *Western Blot* und quantitativer *PCR* sinnvoll.

5. Literaturverzeichnis

1. Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer, *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 267-99.
2. Frenkel, J.K., *Pursuing toxoplasma*. J Infect Dis, 1970. **122**(6): p. 553-9.
3. Dobrowolski, J. and L.D. Sibley, *The role of the cytoskeleton in host cell invasion by Toxoplasma gondii*. Behring Inst Mitt, 1997(99): p. 90-6.
4. Suss-Toby, E., J. Zimmerberg, and G.E. Ward, *Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8413-8.
5. Robert-Gangneux, F. and M.L. Darde, *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(2): p. 264-96.
6. Schluter, D., et al., *Animals are key to human toxoplasmosis*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(7): p. 917-29.
7. Bowie, W.R., et al., *Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team*. Lancet, 1997. **350**(9072): p. 173-7.
8. Bosch-Driessen, L.E., et al., *Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients*. Ophthalmology, 2002. **109**(5): p. 869-78.
9. Fabiani, S., et al., *Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases*. J Neurol Sci, 2015. **351**(1-2): p. 3-8.
10. Holland, G.N., *Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host*. Int Ophthalmol, 1989. **13**(6): p. 399-402.
11. Chirch, L.M. and B.J. Luft, *Cerebral toxoplasmosis in AIDS*. Handb Clin Neurol, 2007. **85**: p. 147-58.
12. Lindsay, D.S. and J.P. Dubey, *Toxoplasma gondii: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis*. Parasitology, 2011. **138**(14): p. 1829-31.
13. Boumahni, B., et al., *[Maternal toxoplasmosis before conception and chorioretinitis in twin sisters]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2004. **33**(3): p. 248-50.
14. Azevedo, V.F., C.F. Pietrovski, and M. de Almeida Santos, Jr., *[Acute toxoplasmosis infection in a patient with ankylosing spondylitis treated with adalimumab: a case report]*. Reumatismo, 2010. **62**(4): p. 283-5.
15. Azevedo, K.M., et al., *Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(2): p. 186-9.
16. Khan, K. and W. Khan, *Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations*. Parasitol Int, 2018. **67**(6): p. 715-721.
17. Howe, D.K. and L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease*. J Infect Dis, 1995. **172**(6): p. 1561-6.
18. Sibley, L.D. and J.C. Boothroyd, *Virulent strains of Toxoplasma gondii comprise a single clonal lineage*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 82-5.
19. Melo, M.B., K.D. Jensen, and J.P. Saeij, *Toxoplasma gondii effectors are master regulators of the inflammatory response*. Trends Parasitol, 2011. **27**(11): p. 487-95.
20. Dubey, J.P., et al., *Molecular and biological characterization of Toxoplasma gondii isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes*. Parasitology, 2007. **134**(Pt 11): p. 1559-65.
21. Herrmann, D.C., et al., *Toxoplasma gondii sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III*. Vet Res, 2012. **43**: p. 39.
22. Carne, B., et al., *Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of Toxoplasma gondii, French Guiana*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(4): p. 656-8.
23. Sobanski, V., et al., *Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(10): p. 1143-5.

24. Pomares, C. and J.G. Montoya, *Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(10): p. 2448-54.
25. Khan, A., et al., *Genetic analyses of atypical Toxoplasma gondii strains reveal a fourth clonal lineage in North America*. Int J Parasitol, 2011. **41**(6): p. 645-55.
26. Boothroyd, J.C. and L.D. Sibley, *Population biology of Toxoplasma gondii*. Res Immunol, 1993. **144**(1): p. 14-6.
27. Stajner, T., et al., *Atypical strain of Toxoplasma gondii causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(8): p. 2686-90.
28. Lebas, F., et al., *[Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in an previously immunized and immunocompetent woman]*. Arch Pediatr, 2004. **11**(8): p. 926-8.
29. Ajzenberg, D., et al., *Genotype of 86 Toxoplasma gondii isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings*. J Infect Dis, 2002. **186**(5): p. 684-9.
30. Delhaes, L., et al., *Severe congenital toxoplasmosis due to a Toxoplasma gondii strain with an atypical genotype: case report and review*. Prenat Diagn, 2010. **30**(9): p. 902-5.
31. Murphy, K.M., Weaver, Casey, *Janeway Immunologie*. Vol. 9. 2018.
32. Sturge, C.R. and F. Yarovinsky, *Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2014. **82**(8): p. 3090-7.
33. Yarovinsky, F., et al., *TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1626-9.
34. Plattner, F., et al., *Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 77-87.
35. Yarovinsky, F., *Innate immunity to Toxoplasma gondii infection*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 109-21.
36. Debierre-Grockiego, F., et al., *Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1129-37.
37. Scanga, C.A., et al., *Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 5997-6001.
38. Bliss, S.K., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers, *Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4515-21.
39. Dunay, I.R., A. Fuchs, and L.D. Sibley, *Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with Toxoplasma gondii in mice*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1564-70.
40. Alexander, J., et al., *Mechanisms of innate resistance to Toxoplasma gondii infection*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1997. **352**(1359): p. 1355-9.
41. Lutjen, S., et al., *Organ- and disease-stage-specific regulation of Toxoplasma gondii-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5790-801.
42. Khan, I.A., K.H. Ely, and L.H. Kasper, *A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal Toxoplasma gondii infection in mice*. J Immunol, 1991. **147**(10): p. 3501-6.
43. Subauste, C.S., R. de Waal Malefyt, and F. Fuh, *Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1831-40.
44. Gazzinelli, R.T., et al., *Infection of human immunodeficiency virus 1 transgenic mice with Toxoplasma gondii stimulates proviral transcription in macrophages in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1645-55.

45. Pawlowski, N., et al., *The activation mechanism of Irga6, an interferon-inducible GTPase contributing to mouse resistance against Toxoplasma gondii*. BMC Biol, 2011. **9**: p. 7.
46. Nathan, C.F., et al., *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity*. J Exp Med, 1983. **158**(3): p. 670-89.
47. Murray, H.W., et al., *Activation of tissue macrophages from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and interferon-gamma*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2374-7.
48. Moilanen, E. and H. Vapaatalo, *Nitric oxide in inflammation and immune response*. Ann Med, 1995. **27**(3): p. 359-67.
49. Thomassen, M.J. and M.S. Kavuru, *Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1479-90.
50. van der Veen, R.C., *Nitric oxide and T helper cell immunity*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1491-500.
51. Adams, L.B., et al., *Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine*. J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2725-9.
52. Coleman, J.W., *Nitric oxide in immunity and inflammation*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1397-406.
53. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.
54. Fox, B.A., J.P. Gigley, and D.J. Bzik, *Toxoplasma gondii lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation*. Int J Parasitol, 2004. **34**(3): p. 323-31.
55. Scharton-Kersten, T.M., et al., *Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1261-73.
56. Taylor, G.A., C.G. Feng, and A. Sher, *p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 100-9.
57. Martens, S., et al., *Disruption of Toxoplasma gondii parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases*. PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. e24.
58. Bekpen, C., et al., *The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage*. Genome Biol, 2005. **6**(11): p. R92.
59. Bekpen, C., R.J. Xavier, and E.E. Eichler, *Human IRGM gene "to be or not to be"*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(4): p. 437-44.
60. Pantoja, L.G., et al., *Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6478-81.
61. Pfefferkorn, E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 908-12.
62. Pfefferkorn, E.R., S. Rebhun, and M. Eckel, *Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts*. J Interferon Res, 1986. **6**(3): p. 267-79.
63. Meisel, R., et al., *Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Leukemia, 2011. **25**(4): p. 648-54.
64. Adams, O., et al., *Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Microbes Infect, 2004. **6**(9): p. 806-12.
65. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4619-21.
66. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 518-28.

67. Salem, H.K. and C. Thiemermann, *Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status*. Stem Cells, 2010. **28**(3): p. 585-96.
68. Elbers, F., et al., *Negative Impact of Hypoxia on Tryptophan 2,3-Dioxygenase Function*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 1638916.
69. Wilking, H., et al., *Prevalence, incidence estimations, and risk factors of Toxoplasma gondii infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22551.
70. Khan, A., et al., *Genetic divergence of Toxoplasma gondii strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(6): p. 942-9.
71. Griess, P., *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Denedikt "Ueber einige Azoverbindungen"*. , in Ber Deutsch Chem Ges 1879. p. 426-428.
72. Takacs, A.C., I.J. Swierzy, and C.G. Luder, *Interferon-gamma restricts Toxoplasma gondii development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45440.
73. Rodriguez-Pascual, F., et al., *Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26040-9.
74. Kleinert, H., et al., *In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6039-44.
75. Hecker, M., M. Cattaruzza, and A.H. Wagner, *Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells*. Gen Pharmacol, 1999. **32**(1): p. 9-16.
76. Gao, J., et al., *An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1226-30.
77. Teng, X., et al., *Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(1): p. C144-52.
78. Koide, M., et al., *Cytokine-induced expression of an inducible type of nitric oxide synthase gene in cultured vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1993. **318**(3): p. 213-7.
79. Khaminets, A., et al., *Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole*. Cell Microbiol, 2010. **12**(7): p. 939-61.
80. Spekker, K., et al., *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, 2013. **202**(3): p. 197-206.
81. El Hajj, H., et al., *ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog, 2007. **3**(2): p. e14.
82. Steinfeldt, T., et al., *Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent Toxoplasma gondii*. PLoS Biol, 2010. **8**(12): p. e1000576.
83. Khan, A., et al., *Selection at a single locus leads to widespread expansion of Toxoplasma gondii lineages that are virulent in mice*. PLoS Genet, 2009. **5**(3): p. e1000404.
84. Behnke, M.S., et al., *Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9631-6.
85. Fentress, S.J. and L.D. Sibley, *The secreted kinase ROP18 defends Toxoplasma's border*. Bioessays, 2011. **33**(9): p. 693-700.
86. Saeij, J.P., et al., *Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis*. Science, 2006. **314**(5806): p. 1780-3.
87. Eltzschig, H.K. and P. Carmeliet, *Hypoxia and inflammation*. N Engl J Med, 2011. **364**(7): p. 656-65.

88. Probes, M. *LIVE/DEAD*® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*. 2015; Available from: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>.
89. Olson, N. and A. van der Vliet, *Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 125-37.
90. Semenza, G.L., *Life with oxygen*. Science, 2007. **318**(5847): p. 62-4.
91. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
92. Dehne, N. and B. Brune, *HIF-1 in the inflammatory microenvironment*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1791-7.
93. Lu, D.Y., et al., *Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(8): p. 992-1000.
94. Chen, I.C., et al., *Decreased Ambient Oxygen Tension Alters the Expression of Endothelin-1, iNOS and cGMP in Rat Alveolar Macrophages*. Int J Med Sci, 2019. **16**(3): p. 443-449.
95. Schmidt, S.K., et al., *Regulation of IDO activity by oxygen supply: inhibitory effects on antimicrobial and immunoregulatory functions*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63301.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich während meiner Arbeit an dieser Dissertationsschrift begleitet sowie unterstützt haben und mir helfend zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stets engagierte und ausdauernde Betreuung.

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

Ich danke Herrn Dr. med. vet. Gereon Schares, Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems, für die Bereitstellung der atypischen Parasiten sowie Herrn Dr. rer. nat. Özer Degistirici, Klinik für Kinderonkologie,- hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, für die Überlassung der murinen mesenchymalen Stromazellen.

Danken möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich mit Geduld in die Versuchsmethoden eingearbeitet haben, immer ein offenes Ohr für Nachfragen und wenn nötig eine helfende Hand für mich hatten.

Meiner ganzen Familie danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben und mir auf unterschiedliche Weise in jeder Lebenslage beigestanden haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Mann Jan, der großen Anteil an dem Abschluss dieser Arbeit hat. Bei ihm bedanke ich mich für unsere gegenseitige Motivation im Studium und auch später im Berufsleben und vor allem dafür, dass er immer bedingslos das Wesentliche in mir sieht.