

**Untersuchungen zur Inhibierung der Expression der
Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) nach
Infektion mit *Toxoplasma gondii***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Andrea Nadja Gais
aus Langen

Göttingen 2008

D 7

Referent: Prof. Dr. U. Groß

Korreferent: Prof. Dr. J. Stülke

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Groß möchte ich an erster Stelle für die Überlassung des interessanten Themas und die konstruktive Betreuung danken. Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. Carsten Lüder für die intensive praktische Betreuung und dauernde Ansprechbarkeit bei Problemen danken. Auch die netten Gespräche und Anekdoten an den Abenden einiger gemeinsam besuchter Kongresse werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Für die Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. J. Stülke.

Mein großer Dank geht an die Mitglieder der Toxoplasmose-Arbeitsgruppe (besonders Tine Lang, Tobias Fleige, Karin Rönnebäumer und Nicole Beinert), und an die „Pilze“ (besonders Pia Schmidt, Oliver Bader und Valeska Simon), sowie an Alexander Pairan, ohne die ich mich in Göttingen sehr einsam gefühlt hätte und die auch spät abends bei Federweißer und Zwiebelkuchen, einem schönen Cocktail oder beim Sport nicht müde wurden über die Arbeit zu diskutieren und so für ein herzliches Arbeitsklima sorgten.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken. Besonders bei meinem Mann Marcus, der mich immer unterstützt und ermutigt hat, insbesondere nach erfolglosen Versuchen. Ohne seine Unterstützung hätte ich Dissertation und Baby nie unter einen Hut bekommen. Bei meiner Schwiegermutter und meiner Schwester möchte ich mich für das Babysitten und die vielen Kleinigkeiten bedanken, die sie mir abgenommen haben.

Außerdem möchte ich mich noch bei meinen „Sandkastenfreundinnen“ Sonja Bockemühl, Isabel Schoch und Katharina Zoll für die tausend Kommafehler, überflüssigen Leerzeichen und vergessenen Buchstaben etc. bedanken, die sie in dieser Arbeit gefunden haben. Sabine Bernhard möchte ich für die vielen Tipps bezüglich der Formatierung danken.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 DER PARASIT <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	1
1.2 LEBENSZYKLUS VON <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	2
1.3 KLINISCHE RELEVANZ VON <i>TOXOPLASMA GONDII</i> INFEKTIONEN.....	5
1.4 PARASIT-WIRT-INTERAKTIONEN	6
1.5 POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE	10
1.6 PARP-1 UND DIE PATHOGENESE ENTZÜNDLICHER ERKRANKUNGEN	13
1.7 ZIELSETZUNG.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 <i>Geräte</i>	16
2.1.2 <i>Zellkultur</i>	16
Reagenzien und Additive.....	16
Medien.....	17
Primäre Zellen und Zelllinien.....	17
2.1.3 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	18
2.1.4 <i>Enzyme</i>	21
2.1.5 <i>Kits</i>	21
2.1.6 <i>Molekulargrößenmarker</i>	21
2.1.7 <i>Membranen und Filter</i>	22
2.1.8 <i>Oligonukleotide</i>	22
2.1.9 <i>Antikörper (Ak)</i>	23
2.2 METHODEN.....	25
2.2.1 <i>Zellkultur</i>	25
2.2.1.1 Kultur und Isolierung von <i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten.....	25
2.2.1.2 Kultur der Wirtszelllinien	25
2.2.2 <i>Infektion von Wirtszellen mit T. gondii</i>	28
2.2.3 <i>Stabile Transfektion</i>	29
Klonierung.....	29
Transformation von <i>E. coli</i>	30
Transfektion von RAW 264.7 Makrophagen.....	30

2.2.4	<i>Herstellung von UV-behandelten und Hitze-inaktivierten T. gondii</i>	31
2.2.5	<i>Herstellung von T. gondii-Lysat</i>	32
2.2.6	<i>T. gondii Membranfraktionierung</i>	32
2.2.7	<i>Transwell-System</i>	33
2.2.8	<i>Präparation von Gesamtproteinextrakten infizierter und nicht-infizierter Wirtszellen</i>	34
2.2.9	<i>Zellfreies in vitro System</i>	35
2.2.10	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)</i>	35
2.2.11	<i>Silberfärbung</i>	36
2.2.12	<i>Western Blot und Immunfärbung</i>	37
2.2.13	<i>Immunfluoreszenzfärbung (IFT) und Mikroskopie</i>	39
2.2.14	<i>Höchst-Färbung</i>	41
2.2.15	<i>Zell-ELISA zum Nachweis von PARP-Aktivität</i>	42
2.2.16	<i>PARP-1 Aktivitätsdetektion auf Einzelzellebene</i>	43
2.2.17	<i>RNA Isolierung</i>	44
2.2.18	<i>Reverse Transkription</i>	44
2.2.19	<i>DNA Isolierung</i>	44
2.2.20	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	45
2.2.21	<i>Agarose Gelelektrophorese</i>	46
2.2.22	<i>Quantitative RT-PCR mittels LightCycler</i>	46
2.2.23	<i>Caspase 3/7 Aktivitätstest</i>	47
2.2.24	<i>β-Galaktosidase-Assay</i>	48
2.2.25	<i>Statistik</i>	49
3.	ERGEBNISSE	50
3.1	VERMINDERUNG DER PARP-1-PROTEINLEVEL DURCH T. GONDII	50
3.1.1	<i>PARP-1-Inhibierung in RAW 264.7 Zellen</i>	50
3.1.2	<i>PARP-1-Inhibierung nach T. gondii-Infektion von murinen Fibroblasten</i>	53
3.1.3	<i>PARP-1-Inhibierung nach T. gondii-Infektion von humanen Zellen</i>	55
3.2	INHIBIERUNG DER POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG DURCH T. GONDII	56
3.3	T. GONDII-STÄMME UNTERSCHIEDLICHER GENOTYPEN HEMMEN PARP-1	60
3.4	REGULATIONSMECHANISMEN DER PARP-1-INHIBIERUNG DURCH T. GONDII AUF WIRTSZELLEBENE	61
3.4.1	<i>Beteiligung von Wirtszellmolekülen an der Inhibierung der Expression von PARP-1</i>	61
3.4.2	<i>Einfluss von Transkription und Translation der Wirtszelle auf die PARP-1-Inhibierung</i>	63
3.4.1	<i>Inhibierung der Expression von PARP-1 durch T. gondii in Gegenwart von Proteasominhibitoren</i>	65
3.5	VORAUSSETZUNGEN VON T. GONDII FÜR DIE PARP-1-INHIBIERUNG	67
3.6	FRAKTIONIERUNG VON PBS-UNLÖSLICHEN T. GONDII-BESTANDTEILEN	72
3.7	PARP-1-ÜBEREXPRESSION IN RAW 264.7 MONOCYTEN/ MAKROPHAGEN	76
3.8	AUSWIRKUNG DER PARP-1 ÜBEREXPRESSION AUF DAS PARASIT-WIRT-VERHÄLTNIS	82
3.8.1	<i>Invasion und Replikation von T. gondii in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten</i>	82

3.8.2	<i>Einfluss der PARP-1 Überexpression auf die Koaktivatorfunktion von PARP bei NF-κB-vermittelter Genexpression.....</i>	85
3.8.3	<i>Apoptose und deren Veränderung durch T. gondii in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Zellen.....</i>	87
4.	DISKUSSION.....	93
4.1	DIE PARP-1-INHIBIERUNG NACH <i>T. GONDII</i> -INFEKTION IST EIN GENERELLES PHÄNOMEN	94
4.2	DIE INHIBIERUNG DER EXPRESSION VON PARP-1 DURCH <i>T. GONDII</i> IST NICHT VON DER VIRULENZ DES <i>TOXOPLASMA</i> -STAMMES ABHÄNGIG	97
4.3	REGULATION DER PARP-1-INHIBIERUNG DURCH <i>T. GONDII</i> IN WIRTSZELLEN	99
4.4	VORAUSSETZUNGEN SEITENS DES PARASITEN <i>T. GONDII</i> ZUR PARP-1-INHIBIERUNG.....	103
4.5	AUSWIRKUNGEN DER PARP-1 ÜBEREXPRESSION IN WIRTSZELLEN AUF PARASIT-WIRT-INTERAKTIONEN	107
4.5.1	<i>Invasion und Replikation von T. gondii</i>	108
4.5.2	<i>NF-κB regulierte Gene in der infizierten Wirtszelle.....</i>	109
4.5.3	<i>Apoptose in infizierten Wirtszellen.....</i>	114
5.	ZUSAMMENFASSUNG	118
6.	LITERATUR.....	120
	PUBLIKATIONEN.....	141
	CURRICULUM VITAE.....	143

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus des obligat intrazellulären Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Abb. 2: Funktion von PARP-1 bei der DNA-Reparatur	11
Abb. 3: PARP-1-Inhibierung in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	51
Abb. 4: Die PARP-1-Inhibierung in Wirtszellen durch <i>T. gondii</i> ist von der Infektionsdosis abhängig	53
Abb. 5: PARP-1-Inhibierung in unterschiedlichen murinen Zelltypen nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	54
Abb. 6: PARP-1-Inhibierung in unterschiedlichen humanen Zelltypen nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	56
Abb. 7: Inhibierung der PARP-1 Aktivität in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	57
Abb. 8: Das <i>T. gondii</i> Enzym Katalase ist nicht für die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von PARP-1 verantwortlich	59
Abb. 9: Die Inhibierung der Expression von PARP-1 in Wirtszellen durch <i>T. gondii</i> ist unabhängig von der Parasitenvirulenz.....	61
Abb. 10: PARP-1 wird nicht durch ein von infizierten Wirtszellen sekretiertes Molekül inhibiert.....	62
Abb. 11: Die Inhibierung der Expression von PARP-1 nach Infektion mit <i>T. gondii</i> erfolgt unabhängig von Transkription und Translation der Wirtszelle.....	64
Abb. 12: PARP-1 wird nach Infektion mit <i>T. gondii</i> nicht durch Wirtszellproteasomen abgebaut.	66
Abb. 13: Von Wirtszellen durch eine semipermeable Membran getrennte Parasiten vermitteln keine Inhibierung der Expression von PARP-1.....	68
Abb. 14: Effektivität von UV-Behandlung und Hitze-Inaktivierung auf Replikation und Wirtszellinvasion durch <i>T. gondii</i>	69
Abb. 15: <i>T. gondii</i> Tachyzoiten inhibieren unabhängig von Wirtszellinvasion und intrazellulärer Replikation den PARP-1-Proteinlevel.....	70
Abb. 16: Ein peripher assoziiertes Membranprotein von <i>T. gondii</i> ist an der Hemmung von PARP-1 beteiligt. .	73
Abb. 17: Elektrophoretische Analyse der Membranfraktionen S1 bis S3 von <i>T. gondii</i> mittels SDS-PAGE.....	74
Abb. 18: SAG-1 von <i>T. gondii</i> ist nicht an der Inhibierung der Expression von PARP-1 beteiligt.	75
Abb. 19: Nachweis einer zusätzlichen PARP-1-Kopie in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen.....	77
Abb. 20: Überexpression von PARP-1 in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen.	78
Abb. 21: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierender Mutante A12 nach <i>T. gondii</i> -Infektion.	79
Abb. 22: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierender C6 Mutante nach <i>T. gondii</i> -Infektion.	80
Abb. 23: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierenden Mutanten nach <i>T. gondii</i> -Infektion mittels Immunfluoreszenzfärbung	81
Abb. 24: Entwicklung von <i>T. gondii</i> in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten.	83
Abb. 25: Einfluss einer PARP-1 Überexpression in Wirtszellen auf Invasion und Replikation von <i>T. gondii</i>	84
Abb. 26: Expressionsprofile NF- κ B-regulierter Gene.....	86
Abb. 27: Zeitabhängige Inhibierung der Caspase 3/7 Aktivität von PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Klonen A12, C6 und E6 und Wildtypzellen nach <i>T. gondii</i> -Infektion.	88

Abb. 28: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt-Interaktion in apoptotischen Zellen 4 h nach Infektion.	89
Abb. 29: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt-Interaktion in apoptotischen Zellen 24.5 h nach Infektion.....	90
Abb. 30: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt-Interaktion in apoptotischen Zellen. ...	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verdünnung primärer und sekundärer Antikörper für Immunfärbung von Western Blots	39
Tab. 2: Verdünnung primärer und sekundärer Antikörper für IFT	41

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac-DEVD-AMC	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (7-amino-4-methylcoumarin)
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>engl.</i> Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptose induzierender Faktor
Ak	Antikörper
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Blockierpuffer
BL-Puffer	Bindepuffer für DNA-Isolierung
BRCT	(BRCA1-caboxyterminus)-Motiv
BSA	bovines Serum Albumin
CIITA	class II transactivator
ca.	circa
CD4 ⁺	cluster of differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]propansulfatsäure
CO ₂	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
CMV	humanes Cytomegalievirus
CPRG	<i>engl.</i> Chlorophenolred-β-D-galactopyranoside
DAB	Diaminobenzidin
DEVD	Einbuchstabencode für die Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure (Asp-Glu-Val-Asp)
DMEM	Dulbecco's MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EIV	Pferde-Grippe-Virus
ELISA	<i>engl.</i> Enzym-linked-immuno-sorbent-assay
ESM	exkretorische-sekretorische Moleküle
et al.	<i>lat.</i> et alia (= und andere)
FA	Formaldehyd
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HBSS	<i>engl.</i> Hank's buffered Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG	<i>engl.</i> high mobility group
HMW	<i>engl.</i> High molecular weight marker
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICAM-1	<i>engl.</i> Intracellular adhesion molecule-1
IFN- γ	Interferon gamma
IFT	Immunfluoreszenstest
IGFBP4	<i>engl.</i> Insulin-like Growth Factor-binding Protein 4
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO Synthase
I κ B	inhibitorische κ B-Proteine
KCl	Kaliumchlorid

kDA	kilo Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB-Medium	<i>engl.</i> lysogeny broth medium
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mA	Milli Ampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MEM	<i>engl.</i> Minimum Essential Medium
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC Klasse II	<i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex (= Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	<i>engl.</i> Makrophage Inflammatory Protein
mM	milli Molar
mRNA	<i>engl.</i> messenger RNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
Na ₃ VO ₄	Natrium-Orthovanadat
NF-κB	nukleärer (Transkriptions) Faktor κB
n.i.	nicht infiziert
NLR	<i>engl.</i> Nod-like receptors
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NR	nukleärer Rezeptor
N-terminal	Stickstoff-Ende

NTP	Nukleotid-Tri-Phosphat
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARG	Poly(ADP-ribose) Glykohydrolase
PARP-1	Poly(ADP-ribose) Polymerase 1
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH-Wert	<i>lat.</i> pondus Hydrogenii
<i>p.i.</i>	<i>lat.</i> post infectionem (= nach Infektion)
PIC	Proteinase-Inhibitor-Cocktail
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der parasitophoren Vakuole
RNA	<i>engl.</i> ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S1	Überstand 1
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecylsulfate (= Natrium-Dodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>engl.</i> sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Sekunde
SOB Medium	<i>engl.</i> Super optimal broth
SOC Medium	SOC Medium mit Glucose
SOCS	<i>engl.</i> suppressor of cytokine signaling-1
STAT-1	<i>engl.</i> Signal Transducers and Activator of Transcription-1
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethansulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TL-Puffer	Lysepuffer bei DNA-Isolierung
TLR	<i>engl.</i> Toll-like receptor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
u.a.	unter anderem
U	<i>engl.</i> Units (= Einheiten)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtypzellen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 *Der Parasit Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer protozoischer Parasit, der erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux beschrieben wurde und der Erreger der Toxoplasmose ist. *T. gondii* gehört zum Stamm der Apicomplexa, deren Name von einer charakteristischen Struktur am Vorderpol, dem Apikalkomplex, herrührt, und die alle Vertreter dieses Stammes besitzen. Des Weiteren besitzen diese Parasiten neben den üblichen Zellorganellen noch ein besonderes plastid-ähnliches Organell, den Apikoplast (FICHERA und ROOS, 1997; MARECHAL und CESBRON-DELAUW, 2001; SEEBER, 2003). Neben *Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Neospora*, *Sarcocystis* und *Theileria* gehört auch *Plasmodium*, der Erreger der Malaria, zu diesem Stamm. Während die meisten apikomplexen Parasiten durch ihr enges Wirtsspektrum entweder human- (*Plasmodium*) oder tierpathogen (*Eimeria*, *Sarcocystis*, *Neospora*, *Theileria*) sind, kann *T. gondii* jede kernhaltige Zelle einer Vielzahl von warmblütigen Wirbeltieren befallen (WERK, 1985). Dabei ist der Invasionsprozess bei allen Apikomplexen sehr ähnlich und zeichnet sich dadurch aus, dass es ein aktiver Prozess ist (MORISAKI *et al.*, 1995). Angetrieben wird dieser durch das so genannte Glidosome (OPITZ und SOLDATI, 2002). Es besteht unter anderem aus Aktin, Myosin und sezernierten Proteinen des Parasiten (DOBROWOLSKI und SIBLEY, 1996; DOBROWOLSKI *et al.*, 1997; SOLDATI *et al.*, 2001). Bei der Invasion der Apikomplexen in eine Wirtszelle spielen vor allem drei charakteristische Organellen und ihre Proteine eine große Rolle: die Mikronemen, die Rhoptrien und die Dichten Granula (CARRUTHERS und SIBLEY, 1997; DUBREMETZ *et al.*, 1998). Diese drei Organellen finden sich im apikalen Pol aller Parasiten dieses Stammes (DUBREMETZ *et al.*, 1998). Bei der Invasion kommt es zunächst zu einer Anheftung des Parasiten an die Wirtszelloberfläche und zur Ausrichtung des apikalen Pols zur Wirtszelle hin (MITCHELL *et al.*, 2004). Anschließend werden Mikronemen- und Rhoptrienproteine aus dem apikalen Pol sezerniert (CARRUTHERS und SIBLEY, 1997; MORDUE *et al.*, 1999), die einen Proteinkomplex bilden und sich mit der „Moving Junction“, einer Verbindung zwischen Parasit und Wirtszellplasmamembran, verbinden (ALEXANDER *et al.*, 2005). Durch die Einstülpung der Wirtszellmembran kommt es zur Bildung

einer parasitophoren Vakuole um den Parasiten, in deren Membran keine Transmembranproteine der Wirtszelle eingelagert sind (MICHEL *et al.*, 1980; JOINER, 1991; SUSS-TOBY *et al.*, 1996). Weitere Proteine aus den Rhoptrien werden sezerniert und in die parasitophore Vakuole integriert (NICHOLS *et al.*, 1983; JOINER, 1991; BECKERS *et al.*, 1994). Zuletzt werden Proteine aus den Dichten Granula freigesetzt, die durch Bildung eines tubulären Netzwerkes die parasitophore Vakuole ebenfalls modifizieren (SIBLEY *et al.*, 1986; SIBLEY *et al.*, 1995).

Die parasitophore Vakuole verhindert einen direkten Kontakt zwischen Parasit und Wirtszellzytoplasma, allerdings ist ein Austausch kleiner Moleküle durch passive Diffusion über die Vakuolenmembran möglich (SCHWAB *et al.*, 1994). Des Weiteren wird durch die besondere Beschaffenheit der parasitophoren Vakuole eine Verschmelzung mit Lysosomen, Endosomen und anderen Vesikeln der Wirtszelle, sowie die Ansäuerung der parasitophoren Vakuole, verhindert (JONES und HIRSCH, 1972; SIBLEY *et al.*, 1985; JOINER *et al.*, 1990; MORDUE *et al.*, 1999; BEYER *et al.*, 2002). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für das Überleben des Parasiten innerhalb der Wirtszelle.

1.2 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Der Lebenszyklus von *T. gondii* wurde erstmals 1970 vollständig beschrieben (FRENKEL *et al.*, 1970), nachdem neben der bereits bekannten asexuellen Phase auch die sexuelle Phase des Lebenszyklus aufgedeckt wurde (DUBEY *et al.*, 1970; FRENKEL *et al.*, 1970).

Der Lebenszyklus von *T. gondii* läuft zwischen Endwirt, in dem unter anderem der sexuelle Abschnitt des Lebenszyklus stattfindet und Zwischenwirt, in dem nur eine asexuelle Vermehrung stattfindet, ab. Endwirte von *T. gondii* sind Katzen und andere Mitglieder der Familie Felidae. Zwischenwirt können alle warmblütigen Vertebraten, vor allem kleine Säuger, Vögel, Nutztiere und der Mensch, sein (TENTER *et al.*, 2000). Der Lebenszyklus von *T. gondii* schließt sich, wenn Mäuse, andere Kleinsäuger oder Vögel als Zwischenwirte fungieren, die dann von der Katze gefressen werden.

Im Lebenszyklus von *T. gondii* gibt es drei infektiöse Stadien: Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoitien (DUBEY *et al.*, 1998), die während der drei Entwicklungsphasen des Parasiten (Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie)

entstehen und sowohl für den Zwischenwirt, als auch für den Endwirt infektiös sind (TENTER *et al.*, 2000).

Der Endwirt von *T. gondii* infiziert sich durch die Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch des Zwischenwirts (Abb. 1). Diese Zysten sind Magensaft-resistent (JACOBS *et al.*, 1960) und beinhalten Bradyzoiten, die chronische und wenig stoffwechselaktive Form des Parasiten. Die Bradyzoiten vermehren sich im Endwirt

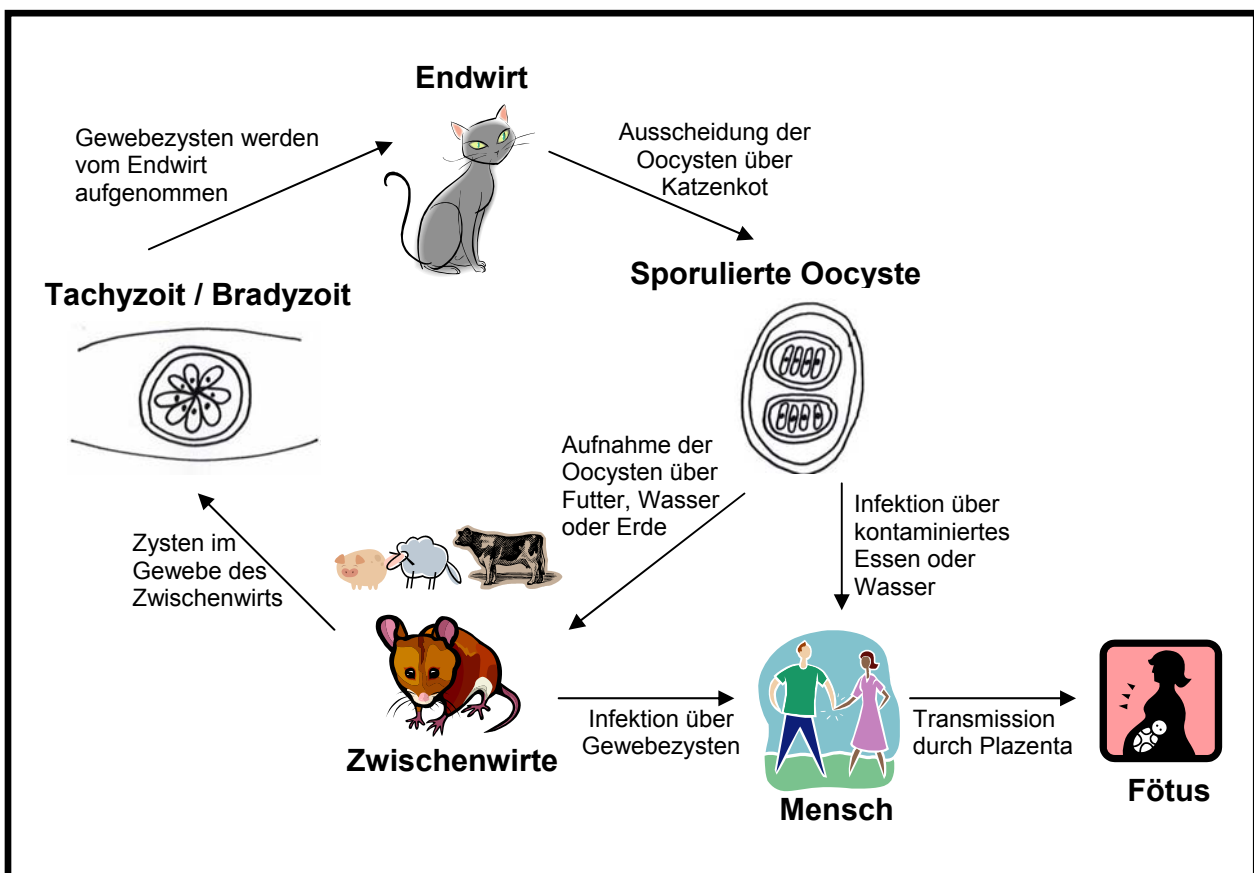


Abb. 1: Lebenszyklus des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii*.

Der Endwirt scheidet unsporulierte Oocysten aus, die anschließend sporulieren und über verschiedene Wege vom Zwischenwirt oder dem Menschen aufgenommen werden. Im Zwischenwirt vermehrt sich der Parasit im Zuge einer akuten Infektion sehr schnell in Form von Tachyzoiten. Reagiert das Immunsystem des Wirtes auf die Infektion, bilden sich bei einer chronischen Infektion stoffwechsellinaktive Bradyzoiten, die Zysten im Gewebe und im Gehirn bilden. Durch die Aufnahme zystenhaltigen Fleisches infiziert sich wiederum der Endwirt, wodurch der Zyklus geschlossen wird. Allein im Endwirt findet die sexuelle Vermehrung des Parasiten statt. Die Infektion des Menschen über nicht ausreichend gegartes Fleisch des Zwischenwirts oder durch mit Oocysten infiziertes Wasser oder Essen kann bei Schwangeren mittels Transmission über die Plazenta zu einer Infektion des Fötus führen. Dies kann mehr oder weniger starke Krankheitsverläufe und sogar den Tod des Fötus bzw. Babys auslösen.

zunächst asexuell durch Endodyogenie, gefolgt von einer Endopolygenie in Dünndarm-Epithelzellen, es entstehen Merozoiten. Daran schließt sich die sexuelle Phase der Gamogonie mit Oocystenbildung im Dünndarm an. Während der Gamogonie entstehen Mikro- und Makrogamonten innerhalb von 3 - 15 Tagen nach dem Verzehr von zystenhaltigem Fleisch (QUINN und MCCRAW, 1972). Mikrogamonten (männliche Form) bilden wiederum 10 – 21 Mikrogameten, die je zwei Flagellen besitzen (DUBEY *et al.*, 1998). Mit Hilfe der Flagellen können sie sich fortbewegen und die Makrogamonten (weibliche Form) zur Befruchtung erreichen (FERGUSON *et al.*, 1975). Während der Befruchtung verschmilzt ein Mikrogamet mit einem Makrogameten und aus der Zygote entwickelt sich eine Oocyste. Die Epithelzellen zerplatzen und entlassen die Oocysten ins Darmlumen. Zu Beginn der Sporogonie werden unsporulierte Oocysten über den Kot ausgeschieden und diese sporulieren außerhalb des Wirtes in 1 - 5 Tagen (FERGUSON *et al.*, 1979; DUBEY *et al.*, 1998). Jede Oocyste enthält jeweils zwei Sporozysten, von denen jede wiederum 4 Sporozoiten besitzt (FERGUSON *et al.*, 1979). In dieser Form ist die Oocyste hoch infektiös und kann relativ lange außerhalb eines Wirtes überdauern.

Werden die Oocysten nun vom Zwischenwirt aufgenommen, kommt es zu einer asexuellen Vermehrung der Sporozoiten, der Schizogonie, durch Endodyogenie und es entstehen Tachyzoiten. Diese vermehren sich in der Wirtszelle durch wiederholte asexuelle Teilung (SHEFFIELD und MELTON, 1968). Durch die starke intrazelluläre Vermehrung der Tachyzoiten platzt die Wirtszelle nach einigen Teilungszyklen und die freigesetzten Tachyzoiten können umliegende Wirtszellen infizieren. Während der akuten Infektion kommt es so zur Bildung einer großen Anzahl von Tachyzoiten. Im Zuge einer sich entwickelnden adaptiven Immunantwort ist der Wirt zunehmend in der Lage, die Replikation des Parasiten zu behindern und dies schützt den immunkompetenten Wirt meist vor starken klinischen Symptomen. Tachyzoiten wandeln sich dann in Bradyzoiten um (KNOLL und BOOTHROYD, 1998; BOHNE *et al.*, 1999), die während der chronischen Form der Infektion Zysten vor allem im Gehirn und Muskelgewebe bilden (DUBEY *et al.*, 1998; TENTER *et al.*, 2000). Diese sehr widerstandsfähigen Zysten, mit sehr langsam replizierenden und weitgehend stoffwechsellinaktiven Bradyzoiten, führen zu einer lebenslangen Persistenz des Parasiten (DUBEY *et al.*, 1998).

1.3 Klinische Relevanz von *Toxoplasma gondii* Infektionen

In den späten 30er Jahren wurde die Toxoplasmose erstmals als Krankheit erkannt, die auch beim Menschen auftreten kann (TENTER *et al.*, 2000). Weltweit sind ca. 30 % der Bevölkerung mit *Toxoplasma gondii* infiziert (JACKSON und HUTCHISON, 1989), wobei die Seroprevalenz stark vom jeweiligen Land, den ethnischen Gruppen und dem Alter des Menschen abhängt (JOYNSON and WREGHITT, 2005). Infektionen können hauptsächlich durch den Verzehr von rohem oder ungenügend gegartem, zystenhaltigem Fleisch, durch den Kontakt mit Fäkalien infizierter Katzen, durch transplazentale Übertragung von Tachyzoiten (JACKSON und HUTCHISON, 1989; DUBEY, 1991; DUBEY *et al.*, 1998) oder seltener durch Muttermilch (BONAMETTI *et al.*, 1997) oder unpasteurisierte Milch (RIEMANN *et al.*, 1975) verursacht werden. In immunkompetenten Menschen verläuft eine Infektion mit *T. gondii* meist asymptomatisch, seltener kommt es zu leichten Erkältungssymptomen oder Retinochorioditiden. Schwere Verläufe sind sehr selten (TENTER *et al.*, 2000), aber nicht auszuschließen.

Bei immunsupprimierten Patienten, wie z.B. AIDS-Patienten (LUFT *et al.*, 1984), Patienten nach Organtransplantation (LUFT *et al.*, 1983), oder bei Erstinfektion während der Schwangerschaft kann es jedoch zu besonders schweren Verläufen kommen, die auch zum Tod führen können.

Bei immunsupprimierten Patienten kann die Reaktivierung einer chronisch persistierenden Toxoplasmose oder - in seltenen Fällen - die Neuinfektion zu einer *Toxoplasma*-Enzephalitis mit anschließendem Tod führen (LUFT und REMINGTON, 1992). Bei bis zu 40% der HIV-infizierten Patienten kommt es zu diesem Verlauf und 10 - 30% dieser Patienten sterben daran (LUFT *et al.*, 1984; LUFT und REMINGTON, 1992). Häufig führen zusätzliche Infektionen neben der Toxoplasmose zu schwerwiegenden Komplikationen. Mittlerweile kann die Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose durch dauerhafte Therapie mit entsprechenden Chemotherapeutika weitgehend verhindert werden (TENTER *et al.*, 2000).

Nach einer Erstinfektion der Frau während der Schwangerschaft kann der Parasit durch vertikale Transmission durch die Plazenta auf den Fötus übertragen werden (TENTER *et al.*, 2000). Diese so genannte kongenitale Toxoplasmose kann zu Abort, zu neonatalem Tod oder zu schweren Missbildungen führen. Dabei hängt die Schwere der kongenitalen Toxoplasmose vom Zeitpunkt der Infektion ab: je früher im Verlauf der Schwangerschaft die Infektion erfolgt, desto schwerwiegender sind die

klinischen Folgen. Etwa 10% der pränatalen Infektionen enden mit Abort oder neonatalem Tod, 10 - 23% der Kinder zeigen bei der Geburt schwere Symptome wie Encephalomyelitis, Hydrocephalus, Retinochoroiditis und unspezifische Symptome (FELDMAN, 1968; KOSKINIEMI *et al.*, 1989; LEBECH *et al.*, 1996), und 12 - 16% der infizierten Neugeborenen sterben daran. Kommt es im letzten Trimester der Schwangerschaft zu einer Erstinfektion der Mutter sind die Neugeborenen meist asymptomatisch bei der Geburt, entwickeln aber später Defekte an Augen, Ohren und am Zentralen Nervensystem, wobei etwa ein Drittel dieser Kinder deutliche Beeinträchtigungen aufweist (TENTER *et al.*, 2000).

Neben der Infektion von Menschen stellt die Toxoplasmose in Nutztieren ein weiteres Problem dar. Durch Abort oder neonatalen Tod von Nutztieren, verursacht durch die Aufnahme der Oocysten aus der Umwelt und transplazentale Übertragung (QUINN und McCRAW, 1972; DUBEY und ROMMEL, 1992), kommt es weltweit zu hohen ökonomischen und finanziellen Verlusten, vor allem bei der Schaf-, Ziegen- und Schweinezucht (BUXTON, 1993).

1.4 Parasit-Wirt-Interaktionen

Für *T. gondii* als obligat intrazellulärem und lebenslang persistierendem Parasiten ist es, wie für andere derartige Pathogene, wie Bakterien und andere Parasiten, unerlässlich, die eigene Nährstoffversorgung nach der Invasion des Wirtes sicher zu stellen. *T. gondii* ist z.B. für Arginin und auch für Cholesterol, welches aus Lipoproteinen niedriger Dichte freigesetzt wird, auxotroph und daher auf den Wirt angewiesen (FOX *et al.*, 2004; SEHGAL *et al.*, 2005). Außerdem muss der Parasit bestimmte Abwehrmechanismen der Wirtszelle entweder umgehen oder manipulieren können. Dies ist notwendig um ein Gleichgewicht zu schaffen, dass sowohl das Überleben des Wirtes gewährleistet als auch Überleben, Wachstum und Replikation des Parasiten ermöglicht (LANG *et al.*, 2007). Zu den wichtigen bisher bekannten Immunevasions-Strategien von *T. gondii* gehören: Veränderung der parasitophoren Vakuole in ein geeignetes Wirtszell-Kompartiment, Modulation von Wirtszell-Signalwegen, Beeinträchtigung der Wirtszellapoptose und die Inhibierung von für den Parasiten toxischen Metaboliten.

Durch die besondere Beschaffenheit der parasitophoren Vakuole (PV), die den Parasiten nach der Invasion umgibt, ist *T. gondii* in der Lage, den lysosomalen Verdau durch die Wirtszelle zu verhindern. Hierbei spielen vor allem der Aufbau der Membran der PV (PVM) aus der Wirtszellmembran (SUSS-TOBY *et al.*, 1996) und das Fehlen von Wirtszelltransmembranproteinen eine wichtige Rolle (JOINER *et al.*, 1990; MORDUE *et al.*, 1999). Dadurch wird ein Verschmelzen der PV mit Endosomen und Lysosomen, sowie die Ansäuerung der PV verhindert (SACKS und SHER, 2002), indem die Wirtszelle die PV nicht als Endosom oder Phagosom erkennt und keine Protonenpumpen und Elektronenkanäle einlagert.

Durch die Infektion mit *T. gondii* in Makrophagen kommt es außerdem zu einer starken Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges, was wiederum zu einer reduzierten Menge an IL-12 und einer erniedrigten Produktion von TNF- α führt (DENKERS *et al.*, 2004). Bei einer pro-inflammatorischen Reaktion auf Infektionen spielen zwei Signalkaskaden, die nukleäre Faktor κ B- (NF- κ B) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK) Signalkaskaden zentrale Rollen. Diese aktivieren die Expression von verschiedenen pro-inflammatorischen Genen, wie IL-12, TNF- α , IL-6 und iNOS. *T. gondii* inhibiert direkt die NF- κ B-Signalkaskade, unter anderem indem die Translokation von NF- κ B zum Nukleus verhindert wird (SACKS und SHER, 2002; DENKERS *et al.*, 2004). Auch bei der MAPK-Signalkaskade greift *T. gondii* direkt ein, indem die Aktivierung vor allem der p38 MAPK verhindert wird (DENKERS *et al.*, 2004). Dadurch kommt es während einer *T. gondii*-Infektion zu deutlich verminderten Mengen von IL-12 und TNF- α , zwei wichtigen regulatorischen und Effektorzytokinen einer effektiven Immunantwort gegen intrazelluläre Infektionserreger.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die MHC Klasse II Expression und die Antigen-Präsentation inhibiert (LÜDER *et al.*, 1998; LÜDER *et al.*, 2001b; LÜDER *et al.*, 2003b; LANG C *et al.*, 2006). Bei der Einleitung einer adaptiven Immunantwort als Reaktion auf einen Infektionserreger präsentieren Antigen-präsentierende Zellen, wie z.B. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen, Antigen-Peptide des Erregers auf ihrer Oberfläche. Diese Fremdpeptide sind unter anderem mit MHC Klasse II Molekülen assoziiert und aktivieren CD4⁺ T-Lymphozyten. Die MHC Klasse II-assoziierte Antigenpräsentation kann durch IFN- γ auf einer Reihe von Zelltypen induziert werden. Viren, sowie intrazelluläre Bakterien und Parasiten interagieren auf unterschiedliche Weise mit der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation, um das eigene Überleben und die Replikation im Wirt zu

sichern. Für *T. gondii* konnte gezeigt werden, dass in IFN- γ -stimulierten Makrophagen (LÜDER *et al.*, 2001b; LANG C *et al.*, 2006) und in Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) (LÜDER *et al.*, 2003b) die Expression von MHC Klasse II Molekülen nach einer Infektion mit dem Parasiten stark reduziert ist. Dies führt wiederum zu einer reduzierten CD4⁺ T-Lymphozyten Aktivierung auf Grund der verminderten Antigen-Präsentation (LÜDER *et al.*, 2001b). Je nachdem, ob es sich um lebende Parasiten oder um ein Parasiten-Lysat handelt, sind zwei verschiedene Mechanismen für die Reduzierung der Expression von MHC Klasse II Molekülen verantwortlich (LANG C *et al.*, 2006). Dabei reduziert *T. gondii* die Transkriptionslevel des durch IFN- γ regulierten Transkriptionsfaktor Klasse II Transaktivators (CIITA), dem Hauptregulator der MHC Klasse II Expression (LÜDER *et al.*, 2001b; LÜDER *et al.*, 2003b). Außerdem induziert *T. gondii* die Expression von SOCS (suppressor of cytokine signaling)-1 in Makrophagen, was zu einer Inhibierung der IFN- γ -induzierten STAT-1 Tyrosinphosphorylierung, mRNA Expression von Zielgenen und der Stickoxid (NO) Sekretion führt (ZIMMERMANN *et al.*, 2006). Von 127 Genen, die durch IFN- γ reguliert werden, konnte keines in mit *T. gondii* infizierten Fibroblasten durch IFN- γ aktiviert werden, wie Mikroarray-Analysen zeigten (KIM *et al.*, 2007). Der Parasit hat auf diese Weise gleich mehrere Möglichkeiten das Immunsystem des Wirtes zu modulieren und ein Überleben zu gewährleisten.

T. gondii ist in der Lage, die Apoptose von Wirtszellen auf verschiedenen Ebenen zu inhibieren (GOEBEL *et al.*, 1998; NASH *et al.*, 1998; GOEBEL *et al.*, 1999; GOEBEL *et al.*, 2001; HEUSSLER *et al.*, 2001; LÜDER *et al.*, 2001a; PAYNE *et al.*, 2003; KELLER *et al.*, 2006; SCHAUMBURG *et al.*, 2006; VUTOVA *et al.*, 2007), aber auch zu induzieren (LÜDER *et al.*, 2001a; SCHAUMBURG *et al.*, 2006). Die Art der Apoptosemodulation scheint dabei von verschiedenen Faktoren wie Parasitenvirulenz, Wirtszelltyp, Anfälligkeit des Wirtes u.a. abzuhängen (LANG *et al.*, 2007). Die Apoptose, eine Form des „programmierten Zelltodes“ von Wirtszellen, ist ein wichtiger antimikrobieller Mechanismus, um infizierte Zellen effektiv zu eliminieren und eine Ausbreitung des Pathogens zu verhindern. Darüber hinaus ist die Apoptose ein fundamentaler Mechanismus in Entwicklung und Gewebemöostase von mehrzelligen Organismen. Die Apoptose kann durch drei Hauptwege induziert werden, durch den Granzym B/Perforin Weg, den „Todesrezeptor“ vermittelten Weg und den mitochondrialen Weg (HEUSSLER *et al.*, 2001). Bei allen drei Signalwegen kommt es zur Aktivierung bestimmter Proteasen, den so genannten Caspasen. Diese wiederum

spalten bestimmte Zielproteine (z.B. die Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1)). Die Caspaseaktivierung führt dann letztendlich zur Chromatin-Kondensation, Zellschrumpfung und Abschnürung in apoptotische Vesikel, die von Phagozyten aufgenommen werden (LANG *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass *T. gondii* an mehreren Punkten der Apoptose-Signalwege eingreifen kann. Zunächst interagiert der Parasit bei der Apoptoseinduktion, indem der Todesrezeptor-vermittelte Weg durch Inhibierung der Caspase 8 unterbunden wird (VUTOVA *et al.*, 2007). Beim mitochondrialen Weg greift der Parasit gleich an mehreren Punkten ein: zum einen verursacht *T. gondii* die Inhibierung der Cytochrom-c Freisetzung, wodurch es zu einer verminderten Caspase 3 und 9 Spaltung kommt. Außerdem zeigt sich eine Reduktion des PARP-1-Proteinlevels sowohl in apoptotischen und infizierten Zellen, als auch in nicht-apoptotischen infizierten Zellen (GOEBEL *et al.*, 2001). Zum anderen inhibiert der Parasit die Cytochrom-c vermittelte Aktivierung der Caspase 3/7 (KELLER *et al.*, 2006). Auch ist die Effektor kinase B des Phosphoinositid 3-Kinase Signalweges in mit *T. gondii* infizierten Mausemakrophagen *in vitro* und *in vivo* aktiviert und verhindert dadurch die Apoptose in infizierten Zellen (KIM und DENKERS, 2006). Zudem führt eine Infektion mit *T. gondii* in Mausfibroblasten zu einer Aktivierung von NF- κ B über die nukleäre Translokation der p50 und p65 Untereinheiten von NF- κ B, zu einer Phosphorylierung von I κ B und dessen Konzentration an der PVM und einer Induktion der Expression antiapoptotischer Gene. Dies führt ebenfalls zu einer *T. gondii*-vermittelten Blockade der Apoptose (MOLESTINA *et al.*, 2003).

Ein weiterer antimikrobieller Abwehrmechanismus der Wirtszelle, die induzierbare NO Synthase (iNOS) und die Freisetzung von NO in aktivierten Makrophagen, wird ebenfalls durch *T. gondii* inhibiert (LÜDER *et al.*, 2003a). Die induzierbare NO Synthase produziert nach Aktivierung von Makrophagen mit LPS oder IFN- γ NO und verhindert so Wachstum und Replikation von intrazellulären Pathogenen. *T. gondii* greift auf transkriptioneller Ebene in diesen Prozess ein, indem mRNA Level und Proteinlevel von iNOS reduziert werden (LÜDER *et al.*, 2003a). Dadurch ist der NO-Gehalt in der Wirtszelle niedrig genug, um dem Parasiten Überleben und Replikation zu sichern. Allerdings führt das Vorhandensein von NO in der Zelle auch dazu, dass sich der schnell replizierende Tachyzoit in den langsam replizierenden Bradyzoiten umwandelt (BOHNE *et al.*, 1994).

Auch die Freisetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und anderen reaktiven Sauerstoffintermediaten („oxidativ burst“) durch den Wirt als weiterer Abwehrmechanismus umgeht *T. gondii*, da der Parasit eine Katalase und verschiedene Peroxidasen besitzt, die detoxifizierend wirken (DOBROWOLSKI und SIBLEY, 1996; DING *et al.*, 2004).

Diese Modulationen der Abwehrmechanismen des Wirtes durch *T. gondii* stellen eine empfindliche Balance dar, um das Immunsystem des Wirtes soweit zu schwächen, dass das Überleben und die Replikation des Parasiten gewährleistet sind ohne dabei den Wirt zu töten. Auch wird dadurch die enge Adaption von *T. gondii* an seine Wirte deutlich, die letztendlich zu einer lebenslangen Persistenz führt.

1.5 Poly(ADP-Ribose) Polymerase

Die Poly(ADP-Ribose) Polymerasen (PARP) sind eine Familie von Proteinen, die für die post-translationale Modifizierung von Proteinen verantwortlich sind (AME *et al.*, 2004). Bei dieser Modifizierung handelt es sich um die Bildung von ADP-Ribose Polymeren, die unter Verbrauch von NAD^+ gebildet und auf Glutamat- oder Aspartatreste von verschiedenen Zielproteinen, wie z.B. Histone, Topoisomerasen, HMG (high mobility group)-Proteine und PARP selbst, übertragen werden. Dabei können sich lange, verzweigte poly(ADP-Ribose) Ketten bilden und man spricht von einer poly(ADP-Ribosyl)ierung der Zielproteine (BURKLE *et al.*, 2005). Diese Modifizierung dient als Signal für diverse zelluläre Prozesse. Angehörige der PARP Proteinfamilie finden sich in allen höheren Eukaryonten, mit Ausnahme von Hefe (HERCEG und WANG, 2001). Unter den 18 bisher bekannten Angehörigen dieser Familie (AME *et al.*, 2004) ist PARP-1 das zuerst entdeckte (MULLER *et al.*, 1974) und am besten untersuchte Protein. PARP-1 ist ein nukleäres Protein, welches eine Molekularmasse von 113 kDa besitzt und in großer Menge in der Zelle vorkommt ($0.5 - 5 \times 10^6$ Moleküle / Nukleus) (DURIEZ und SHAH, 1997). Es konnten verschiedene Domänen des Proteins identifiziert und bestimmten Funktionen zugeordnet werden. N-terminal befindet sich eine DNA-bindende Domäne mit zwei Zinkfinger-Motiven. Daran schließen sich die Caspase 3-Spaltungsstelle (DEVD-Motiv) und ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) an. Besonders wichtig ist die Automodifizierungsdomäne mit BRCT (BRCA1-cboxyterminus)-Motiv, welches für Protein-Protein-Interaktionen

wichtig ist. Carboxy-terminal liegt die katalytische Domäne (AME *et al.*, 2004), die bei allen Mitgliedern der PARP-Familie eine hohe Homologie aufweist. Sie ist die einzige Domäne, die in allen PARPs vorkommt. Die Angehörigen der PARP Familie besitzen neben dieser gemeinsamen Domäne aufgrund ihrer unterschiedlichen zellulären Funktionen noch weitere unterschiedliche Domänen (SMITH, 2001), allerdings zeigen einige Familienmitglieder untereinander große Homologien.

PARP-1 spielt eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur nach DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüchen (Abb. 2). Es liegt im Nukleoplasma in inaktiver Form vor und wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert (SMITH, 2001). Auslöser für DNA-Strangbrüche können Strahlung, alkylierende Agentien oder freie Radikale z.B. im Zuge des „oxidativen Bursts“ sein. PARP-1 bindet an die geschädigte DNA über die DNA-bindende Domäne und bildet mit NAD^+ als Substrat, mittels der katalytischen Domäne, ADP-Ribose-Einheiten. Diese führen dann über die Automodifizierungsdomäne zur Modifizierung von PARP-1 selbst. Die poly(ADP-Ribosyl)ierung von PARP-1 dient als Signal für die Aktivierung der DNA Reparaturmaschinerie. Durch die zunehmend hohe negative Ladung löst sich poly(ADP-Ribosyl)iertes PARP-1 von der DNA. Die poly(ADP-Ribose) Glykohydrolase (PARG), der Antagonist von PARP, spaltet die poly(ADP-Ribose) Einheiten anschließend wieder ab.

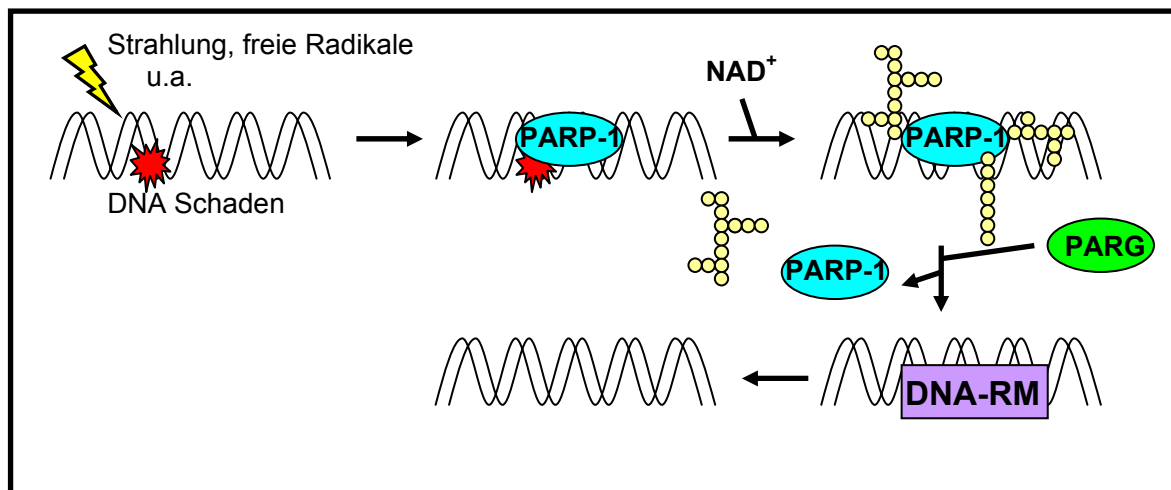


Abb. 2: Funktion von PARP-1 bei der DNA-Reparatur.

PARP-1 wird durch DNA Schäden aktiviert und bildet unter Verbrauch von NAD^+ ADP-Ribose Polymere, die in diesem Fall zur Automodifikation von PARP-1 führen. Dies dient als Signal für DNA Reparaturmechanismen (DNA-RM). PARP-1 löst sich durch die negative Ladung der ADP-Ribose Polymere von der DNA und PARG spaltet die ADP-Ribose Einheiten.

Dieser ganze Prozess läuft innerhalb weniger Minuten ab (HERCEG und WANG, 2001). PARP-1 wurde als erstes Protein beschrieben, welches während der Apoptose durch Effektorcaspasen, z.B. Caspase 3 und 7, gespalten wird (KAUFMANN, 1989; KAUFMANN *et al.*, 1993; HERCEG und WANG, 2001). Die Spaltung von PARP-1 ist dadurch als eine der wichtigsten Indikatoren eines apoptotischen Zelltodes bekannt. PARP-1 wird dabei zu einem frühen Zeitpunkt im Verlauf der Apoptose an der DEVD-Spaltungsstelle in ein 89 kDa und ein 24 kDa Fragment proteolytisch gespalten (KAUFMANN, 1989; KAUFMANN *et al.*, 1993). Auch durch Granzym B und Perforin kann PARP-1 im Verlauf der Apoptose gespalten werden (FROELICH *et al.*, 1996), allerdings mit abweichenden Größen der Fragmente. Es wird vermutet, dass die frühe Caspase-vermittelte Spaltung von PARP-1 während der Apoptose eine Art „Point of no Return“ darstellt, an dem die Zelle die Möglichkeit verliert ihre ursprüngliche Vitalität zurück zu erlangen (DURIEZ und SHAH, 1997). Darüber hinaus wurde auch angenommen, dass die frühe PARP-Spaltung während der Apoptose wichtig ist, um den Verbrauch von NAD^+ und die ATP-Depletierung zu verhindern und so spätere apoptotische Reaktionen zu ermöglichen (SMULSON *et al.*, 2000). Außerdem spielt PARP-1 eine Rolle in einem Caspase-unabhängigen Apoptoseweg. So kommt es durch eine Überaktivierung von PARP-1 zur Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien. AIF induziert im Nukleus Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA und Zytotoxizität (HONG *et al.*, 2004).

Während es sich bei der Apoptose, einer Form des so genannten programmierten Zelltodes, um eine strikt kontrollierte zelluläre Reaktion von endogenen Proteasen handelt, zeichnet sich die Nekrose durch akute zelluläre Verletzungen aus, die eine Lyse der Zelle unter Auslösung einer Entzündungsreaktion hervorruft. Kommt es durch DNA-Schäden zu einer Überaktivierung von PARP-1 und damit auch zu einem starken Verbrauch von NAD^+ und zu ATP-Depletierung (PIEPER *et al.*, 1999; BOULU *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2005), kann die Zelle aufgrund des hohen Energieverlustes nekrotisch werden (SIMS *et al.*, 1983; BERGER, 1985; HERCEG und WANG, 2001).

1.6 PARP-1 und die Pathogenese entzündlicher Erkrankungen

Aufgrund der Bedeutung von PARP-1 für zentrale Prozesse der Zellphysiologie spielt PARP-1 auch bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine wichtige Rolle (ZHANG *et al.*, 1994; SZABO und DAWSON, 1998; HASSA und HOTTIGER, 2002; CLARK und COWDEN, 2003; CLARK *et al.*, 2004; HASSA *et al.*, 2005). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten an Hand von Versuchen mit PARP-1 knockout Mäusen zeigen, dass diese Tiere gegen induzierbare chronische Entzündungskrankheiten, wie z.B. Typ-1 Diabetes, Septischer Schock, Multiorganversagen und Schlaganfall, bei denen NF- κ B als Transkriptionsregulator eine zentrale Rolle spielt, resistent sind (HASSA und HOTTIGER, 2002; HASSA *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte anhand dieser PARP-defizienten Mäuse die Rolle von PARP-1 als Koaktivator der NF- κ B-regulierten Transkription belegt werden, da in ihnen auch die pro-inflammatorischen Moleküle des NF- κ B-Signalweges stark reduziert waren (HASSA *et al.*, 2005). Der Koaktivator der NF- κ B-regulierten Genexpression scheint dabei den entscheidenden Ausschlag zu geben, ob die NF- κ B-Aktivierung zum Überleben der Zelle, zum nekrotischen Zelltod oder zur Apoptose führt. Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher unbekannt, allerdings bildet PARP-1 einen Komplex mit den beiden Untereinheiten p65 und p50 von NF- κ B (HASSA *et al.*, 2005).

Obwohl die Grunderkrankungen sehr verschieden sind, weisen mehrere entzündliche Erkrankungen deutliche pathogenetische Parallelen auf. Dabei kommt es zur Aktivierung von NF- κ B und der Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. IL-12, TNF- α oder IL-6, die die Bildung von freien Sauerstoffradikalen anregen. Dies führt zu DNA-Strangbrüchen, die eine Überexpression von PARP-1 und einen hohen Verbrauch von NAD⁺ und darauf hin eine ATP-Depletion auslösen (SZABO *et al.*, 1996; SZABO und DAWSON, 1998; BOULU *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2005). Die Folgen sind nekrotischer Zelltod und Gewebeschäden, die mit den Krankheitsbildern von septischem Schock, Schlaganfall, Multiorganversagen und Diabetes verbunden sind. PARP-1 greift in die Pathogenese dieser Prozesse an zwei Stellen ein, erstens als Koaktivator von NF- κ B und zweitens durch Auslösung eines hohen Energieverlustes und ATP-Depletierung (HASSA *et al.*, 2005).

Plasmodium, der Erreger der Malaria, gehört ebenso wie *T. gondii* zu den apikomplexen Parasiten. *Plasmodium falciparum* verursacht, vor allem bei Kindern,

die meist lebensbedrohlich verlaufende Malaria tropica, während *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* zu mildereren Krankheitsverläufen führen (KAYSER et al., 2001). Makrophagen und Monozyten setzen TNF- α und andere Cytokine als Antwort auf eine Infektion mit *Plasmodium* frei. Der TNF- α Gehalt im Blut von akut infizierten Patienten korreliert dabei mit dem Schweregrad der Malaria (KAYSER et al., 2001). PARP-1 ist beteiligt an der Pathogenese der zerebralen Malaria und es wird vermutet, dass durch die TNF- α -stimulierte NO-Freisetzung Einzelstrangbrüche der DNA entstehen und dies zur starken Aktivierung von PARP-1 führt (CLARK et al., 2004). Dadurch könnte es zu einem Verlust von NAD⁺ und zur ATP-Depletierung kommen, wodurch Sauerstoff, der durch die eventuell auftretende Anämie während der Malaria tropica nur noch in niedrigen Konzentrationen im Blut vorkommt, nicht effektiv verarbeitet werden kann. Dies könnte unter anderem für schwere Verläufe bei Malaria, bis hin zu Sepsis und Tod, mitverantwortlich sein. Zusätzlich dürfte PARP-1 aufgrund seiner Funktion als Koaktivator auch die NF- κ B-vermittelte Genexpression verstärken und dadurch vermehrt zur Bildung pro-inflammatorischer Cytokine führen, was eine Entzündungsreaktion unter anderem auch im Zentralnervensystem von Malariapatienten zur Folge hätte (CLARK und COWDEN, 2003; CLARK et al., 2004).

1.7 Zielsetzung

Für *T. gondii* als obligat intrazellulären Parasiten, dessen Übertragung von Zwischenwirt auf Endwirt und von Zwischenwirt auf Zwischenwirt von der Etablierung persistierender Infektionen abhängt, ist es von größter Bedeutung, das eigene Überleben und die Vermehrung innerhalb der Wirtszelle zu sichern, ohne dabei die Wirtszelle zu töten (SACKS und SHER, 2002). Eine wichtige Voraussetzung spielen dabei strikt regulierte Parasit-Wirt-Interaktionen, die ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Parasit und Wirt bilden. Neben Veränderungen von Wirtszell-Kompartimenten, Inhibierung von Wirtszell-Signalwegen und Inhibierung der Produktion von toxischen Metaboliten spielt die Interaktion des Parasiten mit verschiedenen Apoptosewegen eine wichtige Rolle (LANG et al., 2007). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die Expression der Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in humanen HL-60 und U937-Zellen, bei denen Apoptose

induziert worden war und auch bei nicht-apoptotischen Zellen, sehr deutlich inhibiert (GOEBEL *et al.*, 2001). PARP-1 besitzt neben Funktionen bei der Apoptose auch wichtige Aufgaben in anderen zellulären Prozessen, wie poly(ADP-Ribosyl)ierung, DNA-Reparatur, Nekrose und Koaktivatorfunktion bei der Transkription verschiedener Gene (SMULSON *et al.*, 2000; HASSA *et al.*, 2005). Daneben wurde PARP-1 auch eine wichtige Rolle im Verlauf entzündlicher Erkrankungen, u.a. Malaria tropica, verursacht durch *Plasmodium falciparum*, zugeschrieben (CLARK *et al.*, 2004).

Da die Inhibierung der PARP-1 Expression durch *T. gondii* sowohl in apoptotischen als auch in nicht-apoptotischen Zellen nachgewiesen wurde (GOEBEL *et al.*, 2001), könnte es sich um einen generellen Mechanismus der Parasit-Wirt-Interaktion handeln. Ziele dieser Arbeit waren deshalb

- die PARP-1 Expression in nicht-apoptotischen Zellen nach Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* eingehend zu charakterisieren,
- Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen eines veränderten PARP-1 Gehaltes nach Parasiten-Infektion auf die Physiologie der Wirtszelle zu bestimmen,
- eine Charakterisierung des Mechanismus der Modulation von PARP-1 durch *T. gondii* vorzunehmen, sowie
- die Auswirkungen der veränderten PARP-1 Expression auf die Parasit-Wirt-Interaktion zu untersuchen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* als möglichen weiteren Mechanismus der Parasit-Wirt-Interaktion könnte dabei neue Einsichten in die Pathogenese der Toxoplasmose liefern.

2. Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Geräte

Fluoreszenzmikroskop	Leica DMR, Leica, Heidelberg
Konfokales Laserscan- Mikroskop	Modell TCS SP2, Leica, Heidelberg
LightCycler	LightCycler®2.0 Real-Time PCR System, Roche, Mannheim
Waagen	Feinwaage: CP 224S, Satorius, Göttingen SAC 62, Satorius, Göttingen
Zellkulturmikroskope	Leica DM IL, Leica, Heidelberg Zeiss Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen
Zentrifugen	Omnifuge 2.0 ORS, Heraeus, Hanau Modell 5417 R, Eppendorf, Hamburg Modell 5417 C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Zellkultur

Alle Zellkulturmedien, -reagenzien und -zusätze stammten von Biochrom (Berlin), falls nicht anders beschrieben.

Reagenzien und Additive

Dulbecco´s Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

EDTA, 1%

FCS (fötale Kälberserum)

G418 Sulfat, 50mg/ml (w/v)

Glukose, 10% (w/v)

HEPES Puffer, 1M

Natriumpyruvat, 100 mM

Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x

Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml - 10.000 µg/ml

Trypanblau, 0.5% in PBS

Trypsin, 0.25%

Medien

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

RPMI 1640 Instantpulver (Instamed T121-10) mit 300 mg/l L-Glutamin, ergänzt mit 2000 mg/l NaHCO₃, eingestellt auf pH 7.2, sterilfiltriert.

DMEM (Dulbecco's MEM)

DMEM Instantpulver (Instamed T 043-10) mit 4.5 g/l Glukose, 580 mg/l L-Glutamin, ergänzt mit 3700 mg/l NaHCO₃, eingestellt auf pH 7.2, sterilfiltriert.

SOC Medium (super optimal broth medium + Glukose):

Zur Transformation von TOP10 *E. coli*:

2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose

Primäre Zellen und Zelllinien

Murine L929 Fibroblasten

Murine Leukämie Monocyten/Makrophagen, RAW 264.7 (TIB 71; ATCC, Rockville MD)

Primäre humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF)

Murine NIH 3T3 Fibroblasten (ECACC, Salisbury, UK)

Humane Jurkat T-Zellen

Humane Monocyten, THP-1

Toxoplasma gondii BK Stamm (Maus-virulent)

Toxoplasma gondii RH Stamm (Maus-virulent)

Toxoplasma gondii NTE Stamm (Maus-avirulent)

Toxoplasma gondii DX Stamm (Maus-avirulent)

Toxoplasma gondii CEP Stamm (Maus-avirulent)

Toxoplasma gondii C56 Stamm (Maus-avirulent)

Toxoplasma gondii PRUhxgprt

Toxoplasma gondii PRUcaf (beide freundlicherweise von D. Soldati, Genf, Schweiz zur Verfügung gestellt)

Toxoplasma gondii P Stamm

Toxoplasma gondii SAG1 defizient (Δ) (beide freundlicherweise von S. Tomavo, Villeneuve d'Ascq, Frankreich, zur Verfügung gestellt)

Toxoplasma gondii RH/HX⁻/UPRT⁻/Sag1/lacZ

Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde von Nunc (Roskilde, Denmark), Corning/Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg) oder Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Ac-DEVD-AMC	Bachem, Heidelberg
Agarose	Roth, Karlsruhe
6-Aminocapronsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ammonium Persulfat (APS)	BioRad, München
3-Aminobenzamide	Alexis Biochemicals, San Diego, Kalifornien, USA
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
6-Biotin-17-NAD	Biozol, Eching
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
1-Butanol	Merck, Darmstadt
Chlorophenolred- β -D- galactopyranoside (CPRG)	Sigma, München
3-[(3-cholamidopropyl)- dimethylammonio]-1- Propan-Sulfonat (CHAPS)	Roth, Karlsruhe
Colchicin	Sigma, München
Digitonin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Einmach-Folie	Deti, Meckesheim

Enhanced Chemiluminescence (ECL)-kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma, München
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Höchst-Farbstoff 33258	Sigma, München
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immersionsöl für Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Isopropanol / 2-Propanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Lactacystin	Calbiochem, München,
Leupeptin	Sigma, München
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MG-132	Calbiochem, München,
Mowiol	Calbiochem, München,
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat (NaDOC)	Sigma, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natrium-Othovanadat	Sigma, München
Natriumthiosulfat	Sigma, München
Nickel-Diaminobenzidine (Nickel-DAB)	Sigma, München
Nonidet P-40	Fluka, Neu-Ulm
Ortho-Phenylendiamin	Sigma, München

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma, München
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma, München
PJ34 [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl]	Calbiochem, Darmstadt
Ponceau S-Lösung	Sigma, München
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt
Propidiumjodid	Sigma, München
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Roche, Mannheim
Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin, BSA)	Sigma, München
RNAse A	Sigma, München
Rothiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma, München
Silbernitrat	Sigma, München
SOC Medium (super optimal broth + Glukose)	Invitrogen, Hilden
Staurosporin	Sigma, München
Temed	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan (=Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Triton X-114	Sigma, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Urea	Calbiochem, München

2.1.4 Enzyme

Pfu DNA Polymerase von *Pyrococcus furiosus* (Promega, Mannheim)

Restriktionsenzyme Hind III und Not I (New England Biolabs, Frankfurt)

Taq Polymerase von *Thermus aquaticus* (Roche, Mannheim)

2.1.5 Kits

DNA Isolierung	E.Z.N.A. [®] Tissue DNA Mini Kit (Peqlab, Erlangen)
Light Cycler PCR	LightCycler FastStart DNA Master ^{Plus} SYBR Green I (Roche, Mannheim)
Transfektionsreagenz	Metafectene TM (Biontex, Martiensried)
Klonierungskit	pcDNA3.1/V5-His [®] TOPO [®] TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
PCR Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Plasmid Isolierung	GenElute TM Plasmid Mini Prep Kit (Sigma, München)
Proteinbestimmung	BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA)
Ligation	Quick Ligation TM Kit (New England Biolabs, Frankfurt)
Reverse Transkription	Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden)
RNA Isolierung	GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma, München)
RNase Inhibitor	RNasin 40 U/μl (Promega, Mannheim)
Mycoplasmentest	Venor GeM, Mycoplasma PCR detection kit (Minerva biolabs, Berlin)

2.1.6 Molekulargrößenmarker

DNA Standard:

GeneRuler 100bp-DNA Leiter: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

GeneRuler 1kb-DNA Leiter: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Protein Standard:

High molecular weight marker (HMW): 212, 170, 116, 76, 53 kDa (Amersham Bioscience, Freiburg)

Prestained protein marker: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5 kDa (New England Biolabs, Frankfurt)

2.1.7 Membranen und Filter

Sterile 0.22µm PES 500 ml Flaschenaufsatz-Filter (Corning/Costar, Bodenheim)

Sterile 0.20 µm Spritzen-Filter (Corning/Costar, Bodenheim)

3.00 µm Isopore, Membranfilter (Millipore, Bedford, USA)

10 kDa Centriprep YM-10 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, USA)

Nitrocellulose Membran, Hybond ECL (Amersham Biosciences, Freiburg)

0.4 µm Transwell Membraneinsätze (Corning/Costar, Bodenheim)

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Darmstadt) hergestellt.

<u>Oligonukleotide</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>
3'PARP+Stop	tta cca cag gga tgt ctt aaa att gaa ctt gag
3'PARP	cca cag gga tgt ctt aaa att gaa ctt gag ttt
5'Start*neu4*	cca cca tgg cgg agg cct cgg aga
β-actin_for	gag acc cag atc atg ttt gag a
β-actin_rev	tgc tcg aag tct aga gca aca tag
Cyclin-B2up	tat ccg gcg ggc agt ttt aga
Cyclin-B2low	tca ggg gcg gga gga cga t
ICAM-1 forward	gac cca gct ctc agc agt gct gct
ICAM-1 reverse	aca gag tca ctg ctg ttt gtg ctc
IL-6up*2*	gac ttc cat cca gtt gcc ttc ttg
IL-6low*2*	gtt tct gta tct ctc tga agg act c
iNOS forward	tct gga gga gct cct gcc tca t
iNOS reverse	cat ccc ctc tga tgg tgc cat c
MM_HMG2_for	gaa gca tcc cga ctc gtc
MM_HMG2_rev	cca gtt tct tcg cag tat ctc c
MM_IGFBP4_for	gag gag aag ctg gca cgc
MM_IGFBP4_rev	ggc cat atg ctt ctg cag

mmMIP2_for	cat tgg tcc tgc tgc tgc
mmMIP2_rev	gcc ttg cct ttg ttc agt atc ttt
MM_TROPO_for	cca cct act cat cca tcc atc cat
MM_TROPO_rev	gtg aga cat gct ctg taa gag tg
Oligo dT	ttt ttt ttt ttt ttt
PARP-861/for	tga cct gaa gga gct gct cat
PARP-861/rev	atg agc agc tcc ttc agg tca
PARP-1779/for	gaa ctc cta tta caa act gca
PARP-1779/rev	gct gca gtt tgt aat agg agt
PARP-2511/for	ggc cga ggt cat cag gaa
PARP-2511/rev	ttc ctg atg acc tcg gcc
PARP-3054/for	ctc aaa tac ctg ctg aaa ctc aag
PARPup	cca gga cga aga ggc agt aaa gaa
PARPlow	cat ggg gga tca gag tgt aga agc
TNF- α forward	tcg agt gac aag cct gta gcc ca
TNF- α reverse	cag agc aat gac tcc aaa gta gac c
V5-Epitop*2*	ccg agg aga ggg tta ggg at

2.1.9 Antikörper (Ak)

Primäre Antikörper:

Kaninchen anti- <i>Toxoplasma</i> , Serum	Eigenherstellung
Kaninchen anti- <i>T. gondii</i> Katalase	freundlicherweise von D. Soldati, Genf, Schweiz, bereitgestellt
Maus anti-Aktin, Klon C4	freundlicherweise von J. Lessard, Cincinnati, OH, USA, bereitgestellt
Maus anti-PARP, Klon C2-10 (m)	BD Phamingen, Hamburg
Maus anti-SAG1, Klon DG 52	freundlicherweise von F. Seeber, Marburg, Deutschland, bereitgestellt
Maus anti-V5-Epitop (m)	Invitrogen, Karlsruhe
Maus anti-His (m)	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Aktin, Klon I-19 (p)	SantaCruz, Santa Cruz, Californien, USA

Sekundäre Antikörper und Konjugate:

Alle sekundären Antikörper und Konjugate wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

Cy 2-(Carbocyanin-)konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Maus IgG

Cy 2-(Carbocyanin-)konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Kaninchen IgG

Cy 3-(Indocarbocyanin-)konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Kaninchen IgG

Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Kaninchen IgG (H+L)

Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Ziege IgG (H+L)

Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Streptavidin

Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Ziege F(ab')₂ anti-Maus IgG (H+L)

(m): monoklonal; (p): polyklonal; H+L: schwere und leichte Ketten (heavy and light chain)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren wurden die Zellen regelmäßig auf Kontaminationen mit Mycoplasmen mittels des Mycoplasmen PCR Nachweises von Venor GeM getestet. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ mit befeuchteter Atmosphäre kultiviert.

2.2.1.1 Kultur und Isolierung von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

T. gondii Tachyzoiten der maus-avirulenten Stämme NTE (GROSS *et al.*, 1991), C56, CEP und DX sowie der maus-virulenten Stämme RH und BK (PARMLEY *et al.*, 1994) wurden in murinen L929-Fibroblasten als Wirtszellen vermehrt. Wirtszellen und Parasiten wurden in verschiedenen Verhältnissen zueinander in 12-Lochplatten gegeben und in *T. gondii* Medium kultiviert. Dabei handelte es sich um RPMI 1640 Medium, welches zusätzlich mit 1% Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt wurde.

Kurz nach der Lyse eines Großteils der Wirtszellen wurden die Parasiten zweimal pro Woche wieder auf frische Wirtszellen umgesetzt.

Zur Gewinnung frischer Parasiten für Infektionsversuche wurden Tachyzoiten aus L929-Kokulturen, die ca. zu 80% lysiert waren, isoliert. Hierzu wurden kontaminierende Wirtszellen bei 35 x g für 5 min von den Parasiten getrennt und die Toxoplasmen anschließend bei 1.300 x g für 10 min abzentrifugiert. Die Tachyzoiten wurden im Anschluss zweimal mit Medium gewaschen und bei 1.300 x g für 10 min abzentrifugiert. Die Anzahl isolierter Toxoplasmen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.1.2 Kultur der Wirtszelllinien

L929

Bei L929 Zellen handelt es sich um murine Fibroblasten, die zur Kultivierung von *T. gondii* verwendet werden. Die Zellen wurden in 6 Loch-Platten in DMEM Medium, welches mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 3% Hitze-inaktiviertem

FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 1x nicht-essentiellen Aminosäuren komplementiert wurde, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche gesplittet, indem sie mittels eines Zellschabers vom Boden der Platte abgekratzt wurden. Nach dem Resuspendieren der Zellen wurden 6 Tropfen der Zellsuspension pro Loch mit jeweils 5 ml frischem Medium weiter kultiviert.

RAW 264.7

RAW 264.7 Zellen (RASCHE *et al.*, 1978), eine Monozyten/Makrophagen-Tumor-Zelllinie aus BALB/c Mäusen, wurden verwendet, um die veränderten PARP-1-Proteinlevel nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* zu charakterisieren. RAW 264.7 Zellen wurden außerdem mit dem murinen PARP-1-Gen stabil transfiziert, um die Auswirkung von PARP-1-Überexpression auf die Parasit-Wirt-Interaktion zu untersuchen.

Die adhärennten RAW 264.7 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES und zusätzlich mit 2.5 g/l Glukose versetzt wurde. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und 2 - 3 Mal pro Woche gesplittet, indem sie nach einem Medienwechsel mittels eines Zellschabers vom Boden der Flasche abgeschabt und je nach Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:15 in einem entsprechendem Volumen an frischem Medium resuspendiert wurden.

Die mit dem murinen PARP-1-Gen stabil transfizierten RAW 264.7 Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert. Das Kultivierungsmedium enthielt zusätzlich 700 µg/ml G418 (Biochrom, Berlin).

NIH/3T3

Murine NIH/3T3 Fibroblasten wurden verwendet, um die veränderten PARP-1-Proteinlevel nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* im Vergleich zu murinen Makrophagen zu charakterisieren.

NIH/3T3 Fibroblasten wurden in DMEM Medium, welches mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 1x nicht-essentielle Aminosäuren ergänzt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche subkultiviert, in dem sie mit 1% EDTA gewaschen und mit 0.25% Trypsin abgelöst wurden. Die Zellen wurden für 5 min bei 400 x g zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelldichte im Verhältnis

1:2 bis 1:5 in eine neue Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Volumen an frischem Medium überführt.

HFF

HFF, eine primäre Zelllinie humaner Vorhautfibroblasten, wurden auf Grund ihrer Kontaktinhibierung verwendet, um *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten nach dem Auftauen zu vermehren und ein Überwachsen durch Wirtszellen zu verhindern.

Die Zellen wurden in DMEM Medium, welches mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 x nicht-essentielle Aminosäuren versetzt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden zur Subkultivierung mit 1% EDTA gewaschen und mit 0.25% Trypsin abgelöst. Nach dem Zentrifugieren bei 400 x g für 5 min wurden die Fibroblasten in einem entsprechenden Volumen frischen Mediums (1:10 bis 1:20) resuspendiert und in eine frische Zellkulturflasche überführt.

Jurkat-Zellen

Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um eine humane Suspensions-T-Zell-Tumorzelllinie, die als Vergleich zu den murinen Zellen auf ihre PARP-1-Proteinlevel nach *T. gondii*-Infektion getestet wurde.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, welches mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Zur Subkultivierung wurde im Verhältnis 1:5 Zellsuspension entnommen und mit frischem Medium gemischt.

THP-1-Zellen

THP-1-Zellen, eine humane monocytische Tumorzelllinie, wurden ebenfalls verwendet, um im Vergleich zu den murinen Zelllinien ihre PARP-1 Level nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* zu untersuchen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, welches mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.2.2 Infektion von Wirtszellen mit *T. gondii*

Die Wirtszellen wurden für die Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten am Vortag der Infektion in Ø 96 mm-Zellkulturschalen oder in 6, 12 oder 24 Loch-Platten in entsprechendem Medium und Wirtszellanzahl ausgesät. Am Tag der Infektion wurden frisch isolierte Tachyzoiten aus L929-Kokulturen isoliert (siehe 2.2.1.1) und die Wirtszellen im Parasit-Wirt-Verhältnis von 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 12 bzw. 30:1, abhängig von Wirtszelllinie und Versuchsaufbau, infiziert. Die Infektionsdauer betrug meist 1 h, aber auch 2, 4, 8, 11, 12, 24 und 48 h, abhängig vom Versuchsaufbau. Um frühe Effekte einer Toxoplasmosen-Infektion zu untersuchen, betrug die Infektionszeiten von RAW 264.7 Zellen 2,5, 5, 7,5, 10 und 30 min. RAW 264.7 Zellen wurden meist 4:1 bzw. 8:1 infiziert. Für eine Infektionsreihe mit verschiedenen Infektionsraten wurden RAW 264.7 Zellen auch in den Parasit-Wirt-Verhältnissen von 0,5, 1, 2, 4, 8 und 12:1 infiziert. Für Versuche mit Proteasom-Inhibitoren wurden die Zellen 10 min mit 10 µM Lactazystin bzw. 50 nM MG132 vorinkubiert, bevor die Zellen für 1 Stunde (h) mit frisch isolierten Tachyzoiten infiziert oder mit 50 µg *T. gondii*-Lysat (siehe 2.2.5) inkubiert wurden.

NIH/3T3 Zellen wurden, ebenso wie RAW 264.7 Zellen, mit einer Zelldichte von $0,3 \times 10^7$ Zellen pro Ø 96 mm-Zellkulturschale in 10 ml Medium am Vortag der Infektion ausgesät und am nächsten Tag im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für 1 h bis 36 h infiziert.

$0,3 \times 10^7$ Jurkat-Zellen wurden sofort nach dem Überführen in Ø 96 mm-Zellkulturschalen mit *T. gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4, 10 bzw. 30:1 für unterschiedliche Zeiten infiziert.

THP-1 Zellen wurden am Vortag der Infektion mit $0,3 \times 10^7$ Zellen pro Ø 96 mm-Zellkulturschalen in 10 ml Medium, welches mit 5 nM Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) zur Ausdifferenzierung ergänzt wurde, ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst zweimal mit Medium gewaschen und anschließend im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für 1, 4, 24 und 36 h infiziert.

2.2.3 Stabile Transfektion

Klonierung

Um die Auswirkung eines erhöhten PARP-1-Proteinlevels in den Wirtszellen von *T. gondii* auf das Parasit-Wirt-Verhältnis zu untersuchen, wurden PARP-1 überexprimierende RAW 264.7 Makrophagen hergestellt. Dazu wurde das murine PARP-1 Gen in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]TA kloniert und in RAW 264.7 Zellen transfiziert. Hierfür wurden zunächst Primer (5'Start*neu4*; 3'PARP+Stop bzw. 3'PARP) ausgewählt, die den gesamten Leserahmen des murinen PARP-1 Gens (NCBI-Datenbank: BC012041) amplifizieren. Zusätzlich wurde in den 5'Primer eine Kozak Konsensussequenz ((G/A)NNATGG) für eine effektive Translationsinitiation eingefügt, da der Vektor selbst kein ATG Initiationscodon besitzt. Einer der 3'Primer (3'PARP+Stop) enthielt das STOP-Codon des PARP-Genes, so dass das später exprimierte Protein kein His-Tag oder V5-Epitop besaß. Dagegen enthielt der andere 3'Primer (3'PARP) kein Stop-Codon, wodurch das später exprimierte Fusionsprotein sowohl ein Penta-His-Tag als auch ein V5-Epitop als Erkennungssequenz besitzen würde.

Durch PCR (siehe 2.2.20) wurde das murine PARP-1-Gen aus RAW 264.7 Makrophagen/Monocyten mittels Pfu Polymerase amplifiziert. Der pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]TA Expression Kit ermöglichte eine direkte Klonierung des DNA-Fragments in den Vektor, da dieser einzelne überhängende 3'Deoxythymidinreste, sowie eine Topoisomerase besitzt, die kovalent an den Vektor gebunden ist. Da die Pfu Polymerase an das Ende des PCR-Produktes kein einzelnes 3'Deoxyadenosin anhängt, wie es die Taq Polymerase macht, wurde dies in einem separaten Schritt nachgeholt. Dazu wurden poly-A-Schwänze an das PCR-Produkt angehängt. Hierfür wurden die PCR-Produkte zunächst in einem 1% Agarose-Gel (siehe 2.2.21) aufgetrennt und mittels des PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Im Anschluß wurden 1 µl 10xTaq Puffer, 0,2 µl dNTPs, 0,2 µl Taq Polymerase und 8,6 µl des aufgereinigten PCR-Produktes für 40 min bei 72°C inkubiert. Danach wurde das PCR-Produkt direkt mit dem Vektor verbunden. Dazu wurden 4 µl des frischen poly-A-PCR-Produktes mit 1 µl Salzlösung, sowie 1 µl Vektor aus dem pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®]TA Expression Kit für 30 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Anschließend wurde der Klonierungsansatz auf Eis gelagert und direkt zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

Transformation von *E. coli*

Aus den Klonierungsansätzen wurden je 2 µl direkt zu den auf Eis gehaltenen One Shot®TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C durchgeführt und die Zellen sofort wieder auf Eis gelagert. Nachdem je 250 µl vorgewärmtes SOC Medium zu den *E. coli* Zellen zugegeben worden war, wurden die Transformationsansätze für 1 h bei 37°C geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl auf vorgewärmte LB-Platten, die zusätzlich Ampicillin zur Selektion enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Transformation mit Wasser anstelle des Klonierungsansatzes versehen und die Positivkontrolle wurde mit einem dem Kit beiliegenden Vektor anstelle des Klonierungsansatzes durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Kolonien überprüft. Pro Platte wurden 10 Kolonien gepickt, in LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte eine Plasmidisolierung mit dem GenElute™ Plasmid Mini Prep Kit nach Herstellerprotokoll (Sigma, Mannheim). Die isolierten Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Not I verdaut, in einem Agarosegel (siehe 2.2.20) aufgetrennt und unter UV-Licht auf die Anwesenheit des PARP-1-Genes überprüft. Von positiven *E. coli* Kolonien wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem Übernachtskulturen 1:2 mit Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert wurden. Die isolierten Plasmide der positiven *E. coli* Kolonien wurden zur Transfektion von RAW 264.7 Makrophagen verwendet.

Transfektion von RAW 264.7 Makrophagen

Die Transfektion der RAW 264.7 Makrophagen erfolgte mit Hilfe des Metafectene Transfektionsreagenz. Dabei bildet das Reagenz zusammen mit der Plasmid-DNA einen DNA-Lipidkomplex, der sehr effizient in eukaryontische Zellen eingeschleust werden kann. Dazu wurden 0.5×10^5 RAW 264.7 Zellen in 1 ml Medium in 12 Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden 1.5 µg Plasmid-DNA in 50 µl RPMI-Medium ohne Zusätze in einer Vertiefung einer 96 Loch-Platte gemischt und 4.5 µl Metafectene Reagenz in 50 µl RPMI-Medium ohne Zusätze in einer zweiten Vertiefung ebenfalls gemischt. Danach wurde der Metafectene / Medium-Mix zur Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und 15-20 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde der DNA-Lipidkomplex langsam zu den konfluenten RAW 264.7 Zellen getropft, vorsichtig gemischt und im Brutschrank bei 37°C für max. 8 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch normales RAW 264.7 Kulturmedium ersetzt. Nach 48 h wurde wiederum ein Medienwechsel durchgeführt, allerdings mit RAW 264.7 Medium, dem 0.7 µg/ml G418 zur Selektion auf positiv transfizierte Zellen beigefügt worden war. In den folgenden Tagen wurde täglich ein Medienwechsel mit G418-haltigem RAW 264.7 Medium durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachdem sich aus einzelnen positiv transfizierten Zellen Kolonien gebildet hatten, wurde jede Kolonie vorsichtig in eine Vertiefung einer 24 Loch-Platte in G418-haltiges RAW 264.7 Medium überführt. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie isoliert und eine Verdünnung hergestellt, so dass in 100 µl Medium rechnerisch 0.5 bzw. 1 Zelle vorhanden waren. Je eine halbe 96 Loch-Platte pro Verdünnung wurde mit je 100 µl pro Loch bestückt und für mehrere Wochen im Brutschrank inkubiert. Nach mehrmaligem Umsetzen der Zellen und erfolgreicher Anzucht in größeren Kultivierungsgefäßen, wurde sowohl die genomische DNA als auch die RNA isoliert und auf das Vorhandensein der zusätzlichen PARP-1-Kopie bzw. auf deren Transkription überprüft (siehe 2.2.17 - 21).

2.2.4 Herstellung von UV-behandelten und Hitze-inaktivierten *T. gondii*

Um die Auswirkungen von Wirtszellinvasion und intrazellulärer Replikation auf die PARP-1-Inhibierung nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* zu untersuchen, wurden frisch isolierte Parasiten (1×10^8 /ml) mit Hitze (SIBLEY *et al.*, 1985) oder mit UV-Licht (ENDO *et al.*, 1981) behandelt. Um die intrazelluläre Replikation der Parasiten zu verhindern, wurden sie 70 sec in Zellkulturschalen UV-Licht von 254 nm ausgesetzt, wobei die UV-Lampe (NU-4KL Faust, Konrad Benda, Wiesloch) mit einem Abstand von 20 cm über der Zellkulturplatte aufgebaut wurde. Danach wurden die Parasiten zur Infektion von RAW 264.7 Zellen verwendet. Ein Immunfluoreszenztest (siehe unten), der 24 h und 48 h nach Infektion von Wirtszellen durchgeführt wurde, bestätigte die Replikationsinhibierung mittels UV-Licht.

Um die Wirtszellinvasion der Parasiten zu inhibieren, wurde die Parasitensuspension entweder für 30 min bei 60°C in einem Thermomixer (Modell 5436 Eppendorf,

Hamburg) Hitze-behandelt oder abzentrifugiert und das Pellet (1×10^8 Parasiten) mind. 24 h bei -20°C tiefgefroren. Die Parasiten wurden ebenfalls danach für Infektionsversuche verwendet. Auch bestätigte wiederum ein Immunfluoreszenztest die Inhibierung der Wirtszellinvasion.

2.2.5 Herstellung von *T. gondii*-Lysat

Toxoplasmen aus frisch lysierten L929 Kokulturen wurden von kontaminierenden L929 Zellen durch Zentrifugation bei $35 \times g$ für 5 min getrennt. Um die Wirtszellen möglichst vollständig zu entfernen, wurde die Parasitensuspension zusätzlich durch einen Filter mit $3 \mu\text{m}$ Porengröße gegeben. Anschließend wurden die Parasiten bei $1.340 \times g$ für 10 min pelletiert und zweimal in sterilem PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Parasitenpellet in $500 \mu\text{l}$ bis $750 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und jeweils dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Die Parasitensuspension wurde jeweils zweimal auf Eis für 10 min mit Ultraschall (30% Unterbrechungszyklus, Output Stufe 3) (Ultraschallgerät Cell Disruptor B15, Branson Sonifier, Dietzenbach) behandelt und dazwischen 20 min auf Eis ruhen gelassen. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei $20.000 \times g$ für 20 min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, mittels eines $0.20 \mu\text{m}$ Spritzen-Filters steril filtriert und einer Proteinbestimmung mit dem BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerprotokoll unterzogen. Das resultierende Pellet wurde in $500 \mu\text{l}$ sterilem PBS resuspendiert. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

2.2.6 *T. gondii* Membranfraktionierung

1×10^{10} *T. gondii* Tachyzoiten wurden aus frisch lysierten L929 Kokulturen isoliert und zweimal in sterilem PBS gewaschen. Die Parasiten wurden in $500 \mu\text{l}$ PBS mit Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) (1:200) resuspendiert und jeweils dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Die Parasitensuspension wurde bei $20.000 \times g$ für 20 min bei 4°C zentrifugiert und das resultierende Pellet wurde einmal in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in $500 \mu\text{l}$ Carbonatpuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, wobei alle 10 min kräftig gemixt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt

bei 20.000 x g für 20 min bei 4°C wurde der Überstand (= S1) abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Das Pellet wurde wiederum einmal in sterilem PBS gewaschen, in 500 µl 8 M Harnstoff-Extraktionspuffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C geschüttelt. Dann wurde wieder bei 20.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand auf 1 M Harnstoff mit 50 mM Tris/HCl pH 8.0 verdünnt und in einer Centricon Säule (10 kDA Ausschlussporengröße) mittels Zentrifugation auf ca. 600 µl eingengt (= S2). Die Harnstoff-Fraktion wurde ebenfalls bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das Pellet wurde wieder in PBS gewaschen, in 1% Triton X-100 resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Der resultierende Überstand aus der anschließenden Zentrifugation wie oben angegeben (= S3) wurde wie die S1- und S2-Fraktion mittels Zugabe von Trichloressigsäure auf 10% Endkonzentration und Inkubation auf Eis für 30 min gefällt. Die Ansätze wurden wieder bei 20.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, um die präzipitierten Proteine zu pelletieren. Die Pellets wurden jeweils in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das von S3 resultierende Pellet (= P1) wurde ein letztes Mal in PBS gewaschen und ebenfalls eingefroren (PRZYBORSKI *et al.*, 2005). S1 - S3 sowie P1 wurden entweder mit Wirtszellen oder dem nukleären Lysat der Wirtszellen inkubiert oder direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Carbonat-Extraktionspuffer

0,1 M Natriumcarbonat pH 11.0

Triton X-100-Puffer

1% Triton X-100 in ddH₂O

Harnstoff-Extraktionspuffer

8 M Harnstoff

50 mM Tris/HCl pH 8.0

2.2.7 Transwell-System

Um feststellen zu können, ob ein von *T. gondii* sekretiertes Protein für die Inhibierung des PARP-1 Protein Levels verantwortlich ist, wurden 0.4 µm Transwell-Zellkultureinsätze für 6 Loch-Platten (Corning/Costar, Bodenheim) verwendet. Auf den Boden der Platten wurden 1×10^6 RAW 264.7 Zellen in 5 ml Medium über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag wurden *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 auf die Transwell-Membran oder direkt zu den Zellen als Kontrolle

gegeben, oder die Zellen blieben uninfiziert. Durch die Membran wird ein direkter Kontakt der Parasiten mit den Zellen verhindert, es können aber vom Parasiten sekretierte Moleküle durch die Membran diffundieren.

Nach 1 h erfolgte eine Gesamtproteinisolierung aus den RAW 264.7 Zellen (siehe 2.2.8) mit anschließender SDS-PAGE (siehe 2.2.10) und Western Blot Analyse (siehe 2.2.11).

2.2.8 Präparation von Gesamtproteinextrakten infizierter und nicht-infizierter Wirtszellen

Zellen wurden je nach Zelllinie entweder mit Zellschabern vom Boden der Petrischale abgekratzt oder mit EDTA und Trypsin vom Schalenboden gelöst. Nachdem die Zellen bei 400 x g abzentrifugiert worden waren, wurden sie in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und nach Anfärbung eines Aliquots mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 1 ml in einem entsprechenden Volumen Lysepuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 20.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde sofort im Verhältnis 5:1 mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C aufgekocht. Bis zur weiteren Verwendung in SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proben bei -20°C gefroren.

Lysepuffer

1%	Triton X-100
150 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 8.0
50 mM	NaF
5 mM	Natriumpyrophosphat
1 mM	PMSF
10 µM	Leupeptin
5 µg/ml	Aprotinin
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	EDTA, pH 8.0
	in ddH ₂ O

2.2.9 Zellfreies *in vitro* System

Um zu überprüfen, ob *T. gondii* die PARP-1-Proteinlevel auch in Wirtszellextrakten ohne funktionsfähige Transkription und Translation zu inhibieren vermag, wurden die nukleären Proteine aus RAW 264.7 Zellen isoliert (MARINOVICH *et al.*, 1996). Hierfür wurden die Makrophagen mittels eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflaschen abgeschabt, bei 400 x g zentrifugiert und in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, ein Aliquot mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. 3×10^7 RAW 264.7 Zellen wurden dann bei 15.300 x g für 30 sec abzentrifugiert, in 2000 μ l hypotonem Lysepuffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Bevor das Zelllysate für 15 sec stark gemixt wurde, wurden 125 μ l 10% Nonidet P40 zugegeben und anschließend wieder bei 15.300 x g für 30 sec zentrifugiert. Das Pellet, welches die Nuklei enthielt, wurde in 250 μ l Puffer C resuspendiert und für 20 min bei 4°C geschüttelt. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt bei 15.300 x g für 5 min befanden sich im Überstand die nukleären Proteine, die dann mit Parasiten oder dem Parasiten-Lysat inkubiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zelllysate bei -80°C tiefgefroren.

Lysepuffer

10 mM HEPES, pH 7.8

10 mM KCl

2 mM MgCl₂

0,1 mM EDTA

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 :100)

Puffer C

50 mM HEPES, pH 7.8

50 mM KCl

50 mM NaCl

0,1 mM EDTA

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 :100)

10 % (v/v) Glycerin

2.2.10 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Um Proben nach ihrem Gehalt bestimmter Proteine zu vergleichen, wurden sie mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder die Gesamtproteine durch Silberfärbung angefärbt oder spezifische Proteine durch Western Blot Analyse und Immunfärbung mittels Antikörper nachgewiesen.

Zunächst wurde ein 10% Polyacrylamid Trenngel in eine vertikale Mini Protean 3 Gelkammer (BioRad, München) mit einem Abstand von 0.75 mm zwischen den

Glasplatten gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde das Butanol entfernt, die Geloberfläche gründlich mit ddH₂O gewaschen und ein 5% Sammelgel aufgegossen, in das ein Probenkamm für 10 Proben eingesetzt wurde.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99°C aufgeköcht. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels eines Probenpuffers bei 25 mA pro Gel für ungefähr 1 h in einer Gelkammer (Modell Mini-Protean III, BioRad, München). Ein Proteinstandard, der Prestained Protein Marker, wurde zum Größenvergleich in einer Spur des Gels parallel aufgetrennt.

<u>10% Tenngel</u>		<u>5% Sammelgel</u>	
0,94 ml	2 M Tris pH 8.8	0,625 ml	0,5 M pH 6.8
0,1 ml	10% SDS	50 µl	10% SDS
2,26 ml	Aqua bidest.	1,38 ml	Aqua bidest.
1,67 ml	30% Acrylamid	0,42 ml	30% Acrylamid
20 µl	10% APS	10 µl	10% APS
10 µl	TEMED	10 µl	TEMED
		20 µl	Bromphenolblau
 <u>Elektrophoresepuffer</u>		 <u>SDS-Probenpuffer</u>	
25 mM	Tris, pH 8.3	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6.8
192 mM	Glycin	10%	Glycerin
0,1%	SDS	32,5 mM	DTT
		2%	SDS
		0,01%	Bromphenolblau

2.2.11 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach SDS-PAGE diente dazu, das Gesamtproteinprofil anzufärben. Das Polyacrylamidgel wurde dazu nach dem Auftrennen der Proteine in einem Lichtgeschützten Behälter mit Fixierlösung 1 für 60 min bei RT fixiert. Anschließend wurde in Fixierlösung 2 bei RT über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal je 30 min in demineralisiertem Wasser gewaschen. Danach wurde für 1 h bei RT in Silbernitratlösung inkubiert, in Entwicklerlösung bis zum Erscheinen der Banden gebadet und nach max. 4 min mit 0,05 M EDTA abgestoppt. Die Gele

wurden entweder sofort in einer Gel-Dokumentationsanlage (BioDoc II Digital Imaging System, Biometra, Göttingen) fotografiert oder zwischen zwei mit Wasser und einem Tropfen Glycerin befeuchteten Blättern Cellophan-Folie aufgespannt und trocknen gelassen.

Fixierlösung 1

30%	Isopropanol
10%	Essigsäure in dH ₂ O

Fixierlösung 2

0,5 M	Natriumacetat
0,2%	Natriumthiosulfat
0,5%	Glutaraldehyd
30%	Ethanol in dH ₂ O

Silbernitratlösung

0,1%	Silbernitrat
0,02%	Formaldehyd in dH ₂ O

Entwicklerlösung

2,5%	Natriumcarbonat
0,01%	Formaldehyd in dH ₂ O

2.2.12 Western Blot und Immunfärbung

Nachdem Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden sie im Semi Dry Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL) übertragen. Dazu wurde die so genannte „Sandwich-Methode“ angewandt, bei dem die einzelnen Komponenten wie folgt in einem Semi-Dry Elektrobloetter (Sartorius, Göttingen) übereinander geschichtet wurden:

Anode

6 Whatman Filterpapiere, getränkt in 0.3 M Tris-HCl, pH 10.4 und 20 % Methanol

3 Whatman Filterpapiere, getränkt in 25 mM Tris-HCl, pH 10.4 und 20 % Methanol

Nitrozellulosemembran

SDS-PAGE Gel

9 Whatman Filterpapiere, getränkt in 40 mM Aminocaprinsäure, pH 7.6 und 20 %

Methanol

Kathode

Die Proteine wurden mit 0.8 mA pro cm² Gelfläche für 90 min übertragen. Das Anfärben der Membran mit Ponceau S Lösung für 2 min als Kontrolle, ob und wie gut die Proteine auf die Membran transferiert wurden und ob die Gesamtproteinmengen in jeder Spur etwa gleich waren. Die Hintergrundfärbung wurde durch Waschen in destilliertem Wasser entfernt.

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden mittels Immunfärbung wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran für 30 min in Blockierlösung abgesättigt. Nach fünf-minütigem Waschen in Waschlösung wurde für 1,5 h mit Primärantikörper (siehe unten) in Inkubationslösung inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Waschlösung für je 5 min gewaschen und danach mit entsprechendem Sekundärantikörper in Inkubationslösung für 1 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran wieder dreimal in Waschlösung für je 5 min gewaschen und mit der ECL Nachweislösung nach Herstellerangaben inkubiert. Überschüssige Mengen an ECL-Lösung wurden entfernt und die Membran mit einer Plastikfolie ohne Luftblasenbildung abgedeckt. Der Nachweis erfolgte durch Auflegen eines Chemilumineszenz sensitiven Hyperfilm ECL auf die Membran. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mittels der Dokumentationsanlage BioDoc II Digital Imaging System (Biometra, Göttingen) und dem Programm Scan Pack 3. Um Unterschiede in der Proteinbeladung der einzelnen Proben auszugleichen, wurde als interner Standard Aktin angefärbt und die Bandenintensitäten auf Aktin normiert.

Blockierlösung

5% Magermilchpulver
0.2% Tween
0.02% NaN₃
in PBS, pH 7.4

Waschlösung

0.05% Tween-20
in PBS, pH 7.4

Inkubationslösung

5% Magermilchpulver
0.05% Tween-20
in PBS, pH 7.4

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Kaninchen anti- <i>Toxoplasma</i> (Serum)	1:2.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Esel anti- Kaninchen IgG	1:10.000
Kaninchen anti- <i>T.</i> <i>gondii</i> -Katalase	1:500	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Esel anti- Kaninchen IgG	1:10.000
Maus anti-Aktin (Klon C4)	1:10.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Ziege anti-Maus IgG	1:10.000
Maus anti-PARP (Klon C2-10)	1:2.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Ziege anti-Maus IgG	1:10.000
Maus anti-SAG1 (Klon DG52)	1:1.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Ziege anti-Maus IgG	1:10.000
Maus anti-V5-Epitop	1:5.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Ziege anti-Maus IgG	1:10.000
Maus anti-Penta-His IgG	1:1.000	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Ziege anti-Maus IgG	1:10.000
Ziege anti-Aktin (Klon I-19)	1:250	Peroxidase-konjugiertes F(ab') ₂ Esel anti-Ziege IgG	1:10.000

Tab. 1: Verdünnung primärer und sekundärer Antikörper für Immunfärbung von Western Blots

2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung (IFT) und Mikroskopie

Um die Auswirkung der Infektion von RAW 264.7 Zellen mit *Toxoplasma gondii* auf die PARP Proteinmenge auf Einzelzellebene zu untersuchen und um die Wirtszellinvasion bzw. –replikation des Parasiten zu bestimmen, wurde eine Immunfärbung der Zellen mit anschließender mikroskopischer Analyse durchgeführt.

Auf runden Deckgläschen wurden zunächst 1×10^5 RAW 264.7 Zellen in 24 Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit frisch isolierten, vorbehandelten oder unbehandelten *T. gondii* Tachyzoiten (siehe 2.2.1.1) im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1, Inkubation mit *T. gondii*-Lysat (50 µg) (siehe 2.2.5), dem Pellet des *T. gondii*-Lysates oder die Zellen blieben als Kontrolle uninfiziert. Die Infektionszeit variierte je nach Fragestellung des Versuches zwischen 1 h und 48 h. Danach wurden die Zellen zweimal in sterilem PBS gewaschen, für 1 h mit 4% Paraformaldehyd in 0.1 M Natriumcacodylat/HCl, pH 7.4 bei RT fixiert und nochmals zweimal in sterilem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min in 50 mM NH₄Cl in PBS inkubiert und danach einmal in PBS gewaschen. Mittels Inkubation bei RT für 1 h in 1% BSA in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert und durch 0,1 mg/ml Saponin im Blockierungspuffer wurden die Zellen gleichzeitig permeabilisiert. Danach wurden die Deckgläschen für 1 h mit einem oder mehreren Antikörpern (siehe unten) bei RT inkubiert. Hierfür wurden die Deckgläschen mit der Zellseite in je einen Tropfen von 30 µl Antikörper verdünnt in Blockierlösung gelegt. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 mg/ml Saponin in PBS für je 10 min wurden die Deckgläschen für 1 h bei RT mit dem oder den entsprechenden Sekundärantikörpern in Blockierlösung, auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper, inkubiert. Danach wurden die Zellen zuerst dreimal in 0,1 mg/ml Saponin in PBS für je 10 min gewaschen und danach einmal in PBS gewaschen. Um die Infektions- und Replikationsrate des Parasiten in den Wirtszellen bestimmen zu können, wurde die Gesamtzellpopulation bei Bedarf für 5 min in 5 µg/ml Propidiumiodid in PBS inkubiert, wodurch doppelsträngige Nukleinsäuren angefärbt wurden. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 5 min wurden die Deckgläschen kurz in demineralisiertem Wasser gewaschen, mit der Zellseite auf einem Objektträger in einem 10 µl Tropfen Mowiol fixiert und über Nacht bei RT getrocknet. Bis zur Betrachtung mittels eines Leica TCS SP2 Konfokalmikroskops (Leica, Heidelberg) wurden die Deckgläschen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Maus anti-PARP (Klone C2-10) +	1:400	Cy 2-konjugiert Esel F(ab') ₂ anti-Maus IgG +	1:50
Kaninchen anti- <i>Toxoplasma</i> (Serum)	1:2.000	Cy 3-konjugiert Esel F(ab') ₂ anti-Kaninchen IgG	1:800
Kaninchen anti- <i>Toxoplasma</i> (Serum)	1:400	Cy 2-konjugiert Esel F(ab') ₂ anti-Kaninchen IgG +	1:50
		Propidiumiodid-Färbung	5 µg/ml

Tab. 2: Verdünnung primärer und sekundärer Antikörper für IFT

2.2.14 Höchst-Färbung

Mittels des Höchst-Farbstoffes 33258 können auf Einzelzellebene die morphologischen Veränderungen nach Apoptose-Stimulierung, z.B. mit Staurosporin, sichtbar machen. In apoptotischen Zellen zeigen sich dabei deutliche Abschnürungen des Zellkerns durch das stark kondensierte Chromatin, wo hingegen in nicht-apoptotischen Zellen eine gleichmäßige Färbung des Zellkerns nachweisbar ist. Hierfür wurden zunächst auf runden Deckgläschen 1×10^5 RAW 264.7 Zellen in 24 Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit frisch isolierten *T. gondii* Tachyzoiten (siehe 2.2.1.1) im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1, oder die Zellen blieben uninfiziert. 3.5 h vor Ablauf der Infektionsdauer folgte eine Behandlung mit 1 µM Staurosporin oder die Zellen blieben unstimuliert. 4, 11 und 24.5 h p.i. wurden die Deckgläschen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und für 1 h mit 4% Paraformaldehyd in 0.1 M Natriumcacodylat/HCl, pH 7.4 bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen mit 50 ng/ml Höchst-Farbstoff 33258 in PBS mit 0.1 mg/ml Saponin bei 37°C für 1 - 1.5 h inkubiert. Die Deckgläschen wurden kurz mit demineralisiertem Wasser abgespült, in 10 µl Mowiol auf Objektträgern fixiert und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C gelagert.

2.2.15 Zell-ELISA zum Nachweis von PARP-Aktivität

Um neben dem Proteinlevel von PARP-1 auch dessen Aktivität zu messen, wurde unter anderem ein Zell-ELISA eingesetzt (BAKONDI *et al.*, 2002). Dazu wurden 8×10^4 RAW 264.7 Zellen pro Loch in einer 96-Lochplatte mit Flachboden in 200 μ l Medium für 48 h ausgesät. Anschließend erfolgte die Infektion mit *T. gondii* in einem Parasit zu Wirt-Verhältnis von 4:1 oder 8:1 für 1 h oder die Zellen blieben als Kontrolle uninfiziert. Als Kontrolle wurde ein Teil der infizierten oder nicht-infizierten Zellen zum Zeitpunkt 30 min nach Infektion mit 5 μ M PJ34 [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl], einem PARP-Inhibitor, für weitere 30 min inkubiert. Nachdem die Zellen für 20 min mit verschiedenen Konzentrationen (0 μ M, 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) Wasserstoffperoxid stimuliert wurden, wurde das Medium durch PARP Reaktionspuffer, der 6-Biotin-17-NAD enthielt, ersetzt und die Zellen für 30 min bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. Im Folgenden wurde mit eiskaltem 95% Ethanol für 10 min bei -20°C fixiert. Nach 15-minütiger Blockierung endogener Peroxidase mittels 0,5% H₂O₂ in Methanol wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockierpuffer (BP) für 30 min bei RT blockiert. Nachdem einmal für 5 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen worden war, schloss sich eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:1.000 in BP) für 30 min bei RT an. Danach wurde viermal für je 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Zum Nachweis gebundener Peroxidase wurde ortho-Phenylendiaminpuffer direkt vor der Inkubation mit den Zellen mit 5 μ l 30% H₂O₂ auf 10 ml Puffer aktiviert. Nach erkennbarer Farbreaktion wurde mit 2 M H₂SO₄ abgestoppt und in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 490/630 nm die Optische Dichte gemessen.

<u>PARP Reaktionspuffer</u>		<u>Blockierpuffer (BP)</u>	
56 mM	HEPES	0,1%	Triton X-100
28 mM	KCl	1%	BSA
28 mM	NaCl		in PBS
2 mM	MgCl ₂		
0,005%	Digitonin		<u>ortho-Phenylendiaminpuffer</u>
25 μ M	6-Biotin-17-NAD ⁺	15 mM	ortho-Phenylendiamin
	in dH ₂ O, pH 8.0	0,1 M	Na-Citratpuffer, pH 5.0
		5 μ l/10 ml	30% H ₂ O ₂

2.2.16 PARP-1 Aktivitätsdetektion auf Einzelzellebene

Zur Bestimmung der PARP-1 Aktivität auf Einzelzellebene (BAKONDI *et al.*, 2002) wurden 24-Lochplatten mit runden Deckgläschen bestückt und 8×10^4 RAW 264.7 Zellen in 500 μ l Medium ausgesät. Nach 48 h wurde mit *T. gondii* im Parasit zu Wirt-Verhältnis von 4:1 oder 8:1 für 1 h infiziert, oder die Zellen blieben nicht infiziert. Ein Teil der Zellen wurde 30 min später für 30 min mit dem PARP-Inhibitor PJ34 (5 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.15 beschrieben für 20 min mit H_2O_2 (0 μ M, 125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) stimuliert, mit PARP Reaktionspuffer inkubiert und mit Ethanol fixiert. Nach 10 minütiger Inkubation in 10% TCA bei $-20^\circ C$ wurden die Deckgläschen 10 min in PBS gewaschen und dann mit 0.5% H_2O_2 in Methanol für 15 min die endogene Peroxidase blockiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit Blockierpuffer für 30 min bei $37^\circ C$ inkubiert und anschließend zweimal mit 0.1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Anschließend wurde für 30 min bei RT mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin in Blockierungspuffer (1:250) inkubiert und viermal für 5 min mit 0.1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 6 mg Nickel-DAB in 10 ml 50 mM Tris pH 7.6 gelöst und mit 10 μ l 30% H_2O_2 aktiviert. Die Zellen wurden 5 min in Färbelösung inkubiert und die Reaktion mit PBS gestoppt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit einem Leica DMR Mikroskop (Leica, Heidelberg).

<u>PARP Reaktionspuffer</u>		<u>Blockierpuffer (BP)</u>	
56 mM	HEPES	0,1%	Triton X-100
28 mM	KCl	1%	BSA
28 mM	NaCl		in PBS
2 mM	MgCl ₂		
0,005%	Digitonin		
25 μ M	6-Biotin-17-NAD ⁺		
	in dH ₂ O, pH 8.0		
		<u>Färbelösung</u>	
		6 mg	Nickel-DAB
		10 ml	50 mM Tris pH 7.6
		10 μ l	30% H_2O_2

2.2.17 RNA Isolierung

Zur Kontrolle der Genaktivität des stabil transfizierten PARP-1 Gens in RAW 264.7 Zellen, sowie zum direkten Vergleich der Expression von Genen (IL-6, TNF- α , MIP2), für die PARP-1 als Koaktivator beschrieben wurde (HA *et al.*, 2002; HASSA und HOTTIGER, 2002; HASSA *et al.*, 2005), wurden zunächst 1×10^6 RAW 264.7 Wildtyp Zellen oder stabil transfizierte Zellen in 6 Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte je nach Fragestellung entweder direkt die RNA Isolierung mit Hilfe des GenElute Mammalian Total RNA Kits nach Herstellerprotokoll (Sigma). Im Falle des Expressionsvergleichs von Genen, für die PARP-1 als Koaktivator beschrieben wurde, wurden die Zellen vor der RNA-Isolierung für 1 h bzw. 3 h mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) vorstimuliert, oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit frisch isolierten *T. gondii* Tachyzoiten (siehe 2.2.1.1) für 1 h infiziert oder blieben uninfiziert. Nach der Lyse und dem Zerkleinern der Zellfragmente mittels Shreddersäulchen wurde die RNA an die vom Hersteller mitgelieferten Säulchen gebunden, mehrfach gewaschen und in 100 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurden die Proben in einem Photometer (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg) auf ihren RNA-Gehalt gemessen. Dafür wurden je 10 μl der RNA-Proben mit je 90 μl DEPC-Wasser verdünnt (1:10) und bei einer Extinktion von 260/280 nm der RNA-Gehalt der Probe vom Photometer errechnet.

2.2.18 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde durch reverse Transkription mit Hilfe des Qiagen Omniscript reverse transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein Reaktionsmix aus 2 μg RNA, 1 x RT Puffer, 0.5 mM je dNTP, 1 μM oligo-dT Primer, 10 U RNase Inhibitor, 4 U Omniscript Reverse Transcriptase (Endkonzentrationen) in RNase-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 μl pro Probe hergestellt. Anschließend wurden die Ansätze für 1.5 – 2 h bei 37°C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.19 DNA Isolierung

Um genomische DNA (gDNA) aus Monolayer-Zellen zu isolieren wurde der DNA Isolierungskit von PeqLab nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden 0.5×10^7 transfizierte oder Wildtyp RAW 264.7 Zellen in \emptyset 96 mm-Zellkulturschalen in

entsprechendem Medium ausgesät. Einen Tag später wurde das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen mittels 600 µl TL-Puffer vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach Zugabe von 25 µl OBTM Protease wurde kräftig gemixt und für 1 h bei 55°C in einem Eppendorf Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden 660 µl BL-Puffer zugegeben und bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 660 µl absolutem Ethanol wurde die Zellsuspension auf die mitgelieferten Säulchen aufgetragen, um die DNA zu binden und bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA eluiert, indem 200 µl 70°C heißer Elutionspuffer 3 min auf den Säulchen inkubierten. Anschließend wurde bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die gDNA wurde bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.2.20 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet um aus der hergestellten cDNA oder der isolierten gDNA mit Hilfe von spezifischen Primern bestimmte Gensequenzen zu amplifizieren. Dies diente als Nachweis der stabilen Transfektion der RAW 264.7 Zellen oder als Vorversuche für die Expressionsvergleiche der verschiedenen, von PARP-1 regulierten Gene durch quantitative RT-PCR.

Bei jedem PCR-Lauf wurde parallel eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle der cDNA oder der gDNA ddH₂O enthielt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt und bestanden aus folgenden Komponenten:

5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	dNTP (jeweils 10 µM)
0.5 µl	Vorwärts-Primer (50 µM)
0.5 µl	Rückwärts-Primer (50 µM)
0.3 µl	Pfu- bzw. Taq-Polymerase (5 U/µl)
2 – 5 µl	cDNA bzw. gDNA
	dd H ₂ O ad 50 µl

Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für jedes Primer-Paar wurden in Vorversuchen die optimalen Amplifikationsbedingungen wie Annealing-Temperatur und Zyklenzahl ausgetestet.

2.2.21 Agarose Gelelektrophorese

PCR- und Klonierungsprodukte wurden in Agarosegelen elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden jeweils 18 µl Probe mit 10x Probenpuffer auf ein 1% Agarosegel in TAE Puffer, welches mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt worden war, aufgetragen und in TAE Puffer aufgetrennt. Zur genauen Größenbestimmung der PCR- und Klonierungsprodukte wurde eine 100 Basenpaar oder 1.000 Basenpaar (1kbp)-DNA Leiter, abhängig von der erwarteten Bandengröße der Proben, parallel mit aufgetrennt. Die Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und bei Bedarf mit einem BioDoc II Digital Imaging System und dokumentiert.

TAE Puffer

40 mM	Tris
1%	Essigsäure
1 mM	EDTA, pH 8.0

10x Probenpuffer

0.07%	Bromphenolblau
33%	Glycerin
7%	SDS
	in TES

TES

0.05 M	Tris
0.005 M	EDTA
0.05 M	NaCl
	pH 8.0

2.2.22 Quantitative RT-PCR mittels LightCycler

Um die Expression verschiedener NF-κB- regulierter Gene, für die PARP-1 als Koaktivator beschrieben wurde (HASSA und HOTTIGER, 2002) in RAW 264.7 Wildtyp-Zellen sowie in den stabil transfizierten Zellen zu vergleichen, wurde eine quantitative RealTime-PCR im LightCycler durchgeführt. Hierfür wurden die Proben wie unter 2.2.17 und 2.2.18 beschrieben, hergestellt. Die resultierende cDNA wurde entweder 1:10 verdünnt oder unverdünnt eingesetzt. Für die quantitative PCR wurde der LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I-Kit (Roche, Mannheim)

verwendet. Pro Ansatz mit einem Endvolumen von 20 μl wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 9 μl H_2O
- 1 μl Vorwärts-Primer (10 μM)
- 1 μl Rückwärts-Primer (10 μM)
- 4 μl 5x MasterMix
- 15 μl

Dieser Mix wurde nach sorgfältigem Mischen in je eine LightCycler Kapillare gegeben und zuletzt 5 μl cDNA (\approx 500 μg bzw. 50 μg cDNA) hinzu gefügt. Anschließend wurden die Kapillaren 15 sec bei 700 x g zentrifugiert. Die LightCycler Läufe wurden unter zuvor mit normaler PCR (siehe 2.2.20) optimierten Bedingungen durchgeführt. Für eine optimale Auswertung wurde eine relative Quantifikation mit externem Standard durchgeführt. Hierzu wurden von allen Proben 1:10 Verdünnungen hergestellt, die dann zusammen mit der unverdünnten Probe eine Standardkurve bildeten. Die daraus resultierende absolute Konzentration des Zielgenes, die mittels slope- und Intercept-Werten ermittelt worden war, wurde dann mit der Konzentration des Housekeeping-Gens Aktin ins Verhältnis gesetzt. Das resultierende Zielgen / Referenz Verhältnis stellt die Expression des Zielgens normiert mit dem Housekeeping-Gen Aktin dar. Folgende Formeln wurden hierfür verwendet:

$$E = 10^{(-1/\text{Slope})}$$

$$\text{cp} = -\text{slope} + \text{intercep}$$

$$\text{Normierte Expression} = \frac{E_{\text{Zielgen n.i.}}^{\text{cp n.i.}} / E_{\text{Zielgen inf.}}^{\text{cp inf}}}{E_{\text{Aktin n.i.}}^{\text{cp n.i.}} / E_{\text{Aktin inf.}}^{\text{cp inf}}}$$

2.2.23 Caspase 3/7 Aktivitätstest

Da bekannt ist, dass *Toxoplasma gondii* in infizierten Wirtszellen die Apoptose verhindern kann (GOEBEL *et al.*, 1998) und weil PARP-1 Regulationsfunktionen während der Apoptose besitzt, sollte mittels eines Caspase 3/7 Aktivitätstests (KELLER *et al.*, 2006) überprüft werden, ob die mit einer weiteren PARP-Kopie

transfizierten RAW 264.7 Zellen auf Apoptose-Stimuli anders reagieren als Wildtypzellen. Hierfür wurden über Nacht 1×10^6 transfizierte oder Wildtyp RAW 264.7 Zellen in 6 Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit frisch isolierten *T. gondii* Tachyzoiten (siehe 2.2.1.1) im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 infiziert oder nicht infiziert belassen. Nach 0.5, 7.5 und 21 h p.i. wurden die Zellen mit Staurosporin, einem Apoptose-Induktor, für je 3.5 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Platte abgelöst, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und in 1 ml sterilem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert und die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Spaltung des Caspase 3/7 spezifischen Substrates DEVD-AMC wurde anschließend in Triplikaten wie folgt gemessen. Zu 10 µl Zelllysat wurden 90 µl des Spaltungspuffers gegeben und bei 37°C über 1 h alle 5 min in einem Victor V Multifunktionsplattenmessgerät die Spaltung des Substrates anhand der Fluoreszenzzunahme bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm aufgezeichnet. Die Fluoreszenzzunahme über die Zeit war dabei der Substratspaltung und damit der Caspaseaktivität proportional. Für die Auswertung wurde aus dem Mittelwert der Triplikate die absolute Fluoreszenzzunahme bestimmt.

Lysepuffer (NP-40 Puffer)

150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
1 % Nonidet P40
pH 8.0
1:25 Proteinase-Inhibitor-Cocktail

Spaltungspuffer

50 mM NaCl
10 mM HEPES, pH 7.0
40 mM β -Glycerophosphat
2 mM Mg_2Cl
5 mM EGTA
0.1 mg/ml BSA
0.1 % CHAPS
10 µM Ac-DEVD-AMC

2.2.24 β -Galaktosidase-Assay

Der β -Galaktosidase-Assay sollte durch den Einsatz von β -Galaktosidase-transfizierte *T. gondii* (SEEBER und BOOTHROYD, 1996; MCFADDEN *et al.*, 1997) photometrisch zeigen, ob es einen Unterschied in Infektions- und Replikationsrate

zwischen den Wildtyp RAW 264.7 Zellen und den mit PARP-1 transfizierten Zellen gab. Hierzu wurden 1×10^5 RAW 264.7 Zellen (Wildtyp und Transfektanten) in 100 μ l RAW 264.7 Medium in 96 Loch-Platten über Nacht in Triplikaten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 1 h mit frisch isolierten Tachyzoiten des Stammes *Toxoplasma gondii* RH/HXGPRT⁻/Sag1/lacZ infiziert oder verblieben uninfiziert. Anschließend wurde das Medium durch frisches ersetzt. Nach 4, 24 bzw. 48 h wurden die Zellen für 20 min bei RT fixiert. Danach wurde einmal mit HBSS gewaschen und für 15 - 60 min die Reaktionslösung zu den Zellen gegeben. Die Farbreaktion wurde photometrisch bei 37°C durchgeführt, anschließend bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch gemessen.

<u>Fixierlösung (25 ml)</u>		<u>Reaktionslösung (10 ml)</u>	
2.7 ml	37% FA	100 μ l	10% Triton X-100
1.25 ml	5 M NaCl	10 μ l	100 mM CPRG
200 μ l	3 N NaOH	50 μ l	1 M MgCl ₂
20.85 ml	HBSS		ad 10 ml with HBSS

2.2.25 Statistik

Für die statistische Auswertung der Versuche wurden Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts von mind. 3 unabhängigen Versuchen verwendet.

Für die statistische Auswertung der IFTs und der Höchst-Färbungen wurden jeweils mindestens 500 Zellen pro Ansatz gezählt und die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts von mindestens drei unabhängigen Versuchen verwendet.

Bei photometrischen Auswertungen wurden pro Ansatz die Mittelwerte der Mehrfach-Ansätze von 3 unabhängigen Versuchen gemittelt und davon Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

Der Student's t-Test wurde verwendet, um Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen auf statistische Signifikanz zu prüfen. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Verminderung der PARP-1-Proteinlevel durch *T. gondii*

Untersuchungen zur Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii* zeigen, dass der Parasit sowohl in Zellen, die mit einem Apoptose-Stimulus inkubiert werden, als auch in unbehandelten Zellen eine Abnahme des PARP-1-Proteinlevels verursachen (GOEBEL *et al.*, 2001). Um die Bedeutung dieser bisher wenig untersuchten Wirtzellmodulation für die Parasit-Wirt-Interaktion zu untersuchen, sollte zunächst eine genauere Charakterisierung der PARP-1-Inhibierung erfolgen. Nach Infektion mit *T. gondii* Tachyzoiten konnte dabei unter anderem in verschiedenen humanen und murinen Wirtszelllinien eine Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels beobachtet werden.

3.1.1 PARP-1-Inhibierung in RAW 264.7 Zellen

In murinen RAW 264.7 Makrophagen/Monocyten wurden nach Infektion mit Tachyzoiten des Maus-avirulenten *T. gondii* Stammes NTE Gesamtzellextrakte auf den PARP-1-Proteinlevel mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Es zeigte sich eine starke Inhibierung der Expression von PARP-1 um mehr als 90% innerhalb weniger Minuten nach Infektion mit den Parasiten (Abb. 3A). Der verwendete monoklonale PARP-1 Antikörper C2-10 erkennt dabei sowohl das 113 kDa Gesamtprotein PARP-1 als auch ein Spaltprodukt mit der Größe von 89 kDa, das während der Apoptose durch Caspase-vermittelte Proteolyse auftritt. Da nach Infektion von RAW 264.7 Zellen mit *T. gondii* kein Spaltprodukt von PARP-1 mit 89 kDa oder einem anderen Molekulargewicht auftrat (Abb. 3B), konnte eine parasiten-induzierte Spaltung von PARP-1 wie im Verlauf der Apoptose ausgeschlossen werden. Eine Kontrollfärbung des Western Blots mit einem Antikörper gegen Aktin zeigte, dass in allen Spuren der SDS-PAGE die gleichen Mengen an Gesamtprotein aufgetragen worden waren (Abb. 3A und 3B). Semiquantitative Analysen von PARP-1 im Verhältnis zu Aktin ergaben, dass der PARP-1-Gehalt nach 1 h Infektionszeit um etwa 75% reduziert war (Abb. 3B). Da 8 - 12 h nach Infektion der PARP-1-Proteinlevel wieder auf etwa 55% anstieg, handelte es sich insgesamt allerdings um

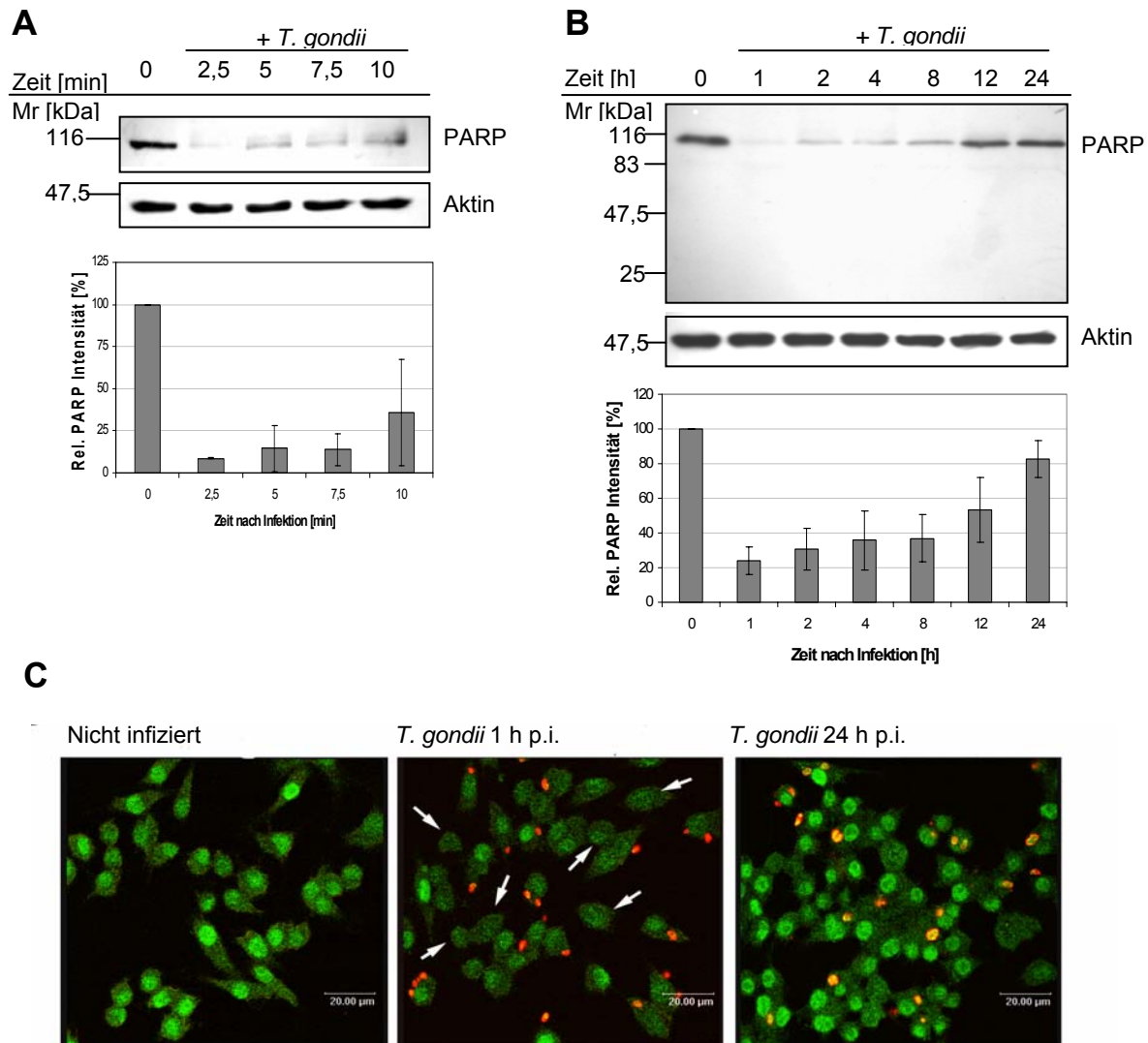


Abb. 3: PARP-1-Inhibierung in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen nach Infektion mit *T. gondii*.

(A) und (B) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für unterschiedliche Zeiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten des NTE Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Ein Gesamtproteinextrakt der RAW 264.7 Zellen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Die Graphen stellen die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker (C) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für unterschiedliche Zeiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten des NTE Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden PARP-1 und *T. gondii* Tachyzoiten mittels spezifischer Primärantikörper und Cy-2-konjugiertem (PARP-1: grüne Fluoreszenz) oder Cy-3-konjugiertem (*T. gondii*: rote Fluoreszenz) Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet. Weiße Pfeile: Nicht infizierte Zellen, die deutlich verminderte PARP-1-Proteinlevel aufweisen sind zum Teil mit einem weißen Pfeil markiert. P.i.: Nach Infektion (post infectionem)

eine transiente Verminderung von PARP-1 nach Infektion mit *T. gondii*. Tatsächlich war nach 24 h Infektion der PARP-1-Proteinlevel nur geringfügig niedriger als in nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 3B).

Diese Ergebnisse konnten auch auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenztest bestätigt und erweitert werden. In einer nicht-infizierten Kultur wurde PARP-1 wie erwartet hauptsächlich im Zellkern exprimiert, während im Zytoplasma nur eine schwache Fluoreszenz auftrat (Abb. 3C). Nach 1 h Infektion mit *T. gondii* war PARP-1 dagegen nur schwach in Zellkernen nachweisbar und es war keine Umverteilung von PARP-1 z.B. ins Zytosol oder in andere Zellkompartimente festzustellen (Abb. 3C). Außerdem zeigte sich, dass nicht nur in parasit-positiven Zellen, sondern auch in parasit-negativen Zellen einer infizierten Kultur PARP-1 inhibiert war (Abb. 3C). 24 h nach Infektion mit *T. gondii* exprimierten RAW 264.7 Zellen dagegen nukleäres PARP-1 wie nicht-infizierte Kontrollzellen (Abb. 3C).

Da die vorhergehenden Experimente gezeigt hatten, dass PARP-1 unabhängig von einer Wirtszellinvasion durch *T. gondii* vermindert wird (Abb. 3C), wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss der Infektionsdosis auf die PARP-1-Proteinlevel untersucht. Dazu wurden RAW 264.7 Wirtszellen für 1 h in unterschiedlichen Parasit-Wirt-Verhältnissen mit Tachyzoiten des Maus-avirulenten *T. gondii* Stammes NTE infiziert. Western Blot Analysen zeigten, dass der Parasit den zellulären Gehalt von PARP-1 in den Wirtszellen dosisabhängig verminderte, da mit zunehmender Parasitenanzahl PARP-1 kontinuierlich abnahm (Abb. 4). Bereits bei einem Parasit zu Wirtszellverhältnis von 0.5:1 wurde PARP-1 um durchschnittlich 20% vermindert, bei einem Parasit zu Wirtszellverhältnis von 4:1 sogar durchschnittlich um 80%. Aufgrund der starken Hemmung von PARP-1 bei einer Infektionsdosis von 4:1 und der relativ geringen weiteren Reduzierung bei höheren Infektionsdosen wurden die folgenden Versuche meist bei einem Parasit zu Wirtszellverhältnis von 4:1 durchgeführt. Zusammenfassend zeigten diese Experimente deutlich, dass eine Infektion mit *T. gondii* *in vitro* dosisabhängig zu einer starken aber transienten Erniedrigung der PARP-1 Level seiner Wirtszellen führte, die unabhängig von einer Wirtszellinvasion stattfand.

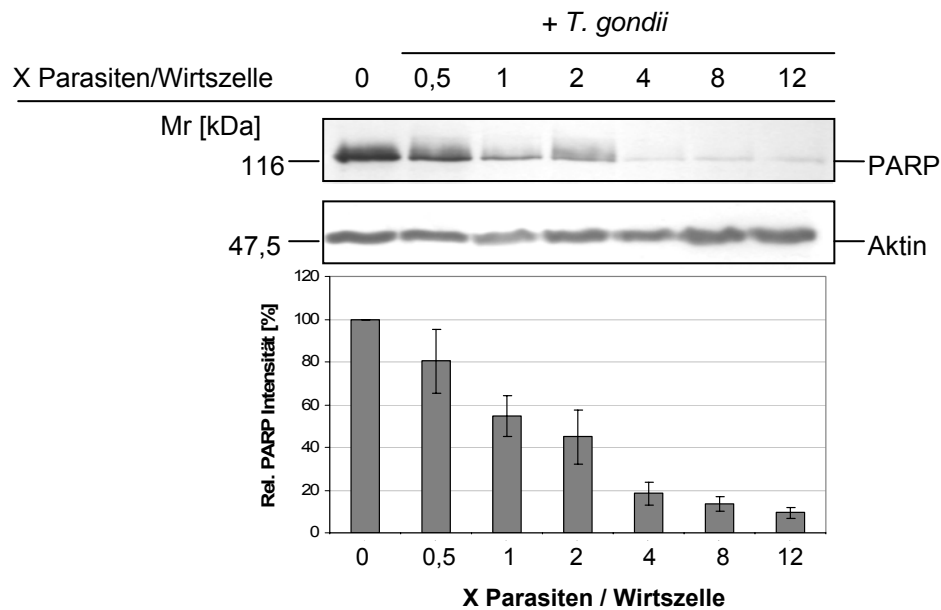


Abb. 4: Die PARP-1-Inhibierung in Wirtszellen durch *T. gondii* ist von der Infektionsdosis abhängig.

RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für 1 h in unterschiedlichen Parasit-Wirt-Verhältnissen mit Tachyzoiten des NTE-Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

3.1.2 PARP-1-Inhibierung nach *T. gondii*-Infektion von murinen Fibroblasten

Neben Monocyten bzw. Makrophagen werden Fibroblasten als wichtiger Wirtszelltyp von *T. gondii* angesehen. Um zu überprüfen, ob eine Infektion mit *T. gondii* den Proteingehalt von PARP-1 auch in diesem Zelltyp reduziert, wurden Gesamtproteinextrakte von murinen NIH/3T3 Fibroblasten mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Dazu wurden NIH/3T3 Fibroblasten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für unterschiedliche Zeiten mit frisch isolierten Tachyzoiten des Maus-avirulenten *T. gondii* Stammes NTE infiziert. Ähnlich wie bei murinen RAW 264.7 Makrophagen/Monocyten (Abb. 5A) war auch bei murinen NIH/3T3 Fibroblasten der PARP-1-Proteinlevel nach Infektion mit *T. gondii* erniedrigt (Abb. 5B). Allerdings unterschied sich der zeitliche Verlauf der PARP-1-Verminderung nach

Infektion zwischen Monocyten/Makrophagen einerseits und Fibroblasten andererseits deutlich. So wurde in murinen Fibroblasten 1 h nach Infektion noch durchschnittlich 65% des PARP-1 Gehaltes nicht-infizierter Kontrollen nachgewiesen (Abb. 5B), wohingegen RAW 264.7 Zellen zu diesem Zeitpunkt nur durchschnittlich etwa 30% der PARP-1 Proteinmenge von Kontrollzellen enthielten (Abb. 5A). Der PARP-1 Gehalt war in NIH/3T3 Fibroblasten 12 h nach Infektion am stärksten gehemmt, als auch in diesem Zelltyp durchschnittlich nur noch etwa 30% des PARP-1-Proteinlevels nicht-infizierter Kontrollen nachgewiesen wurden (Abb. 5B). Mit zunehmender Infektionsdauer stieg der PARP-1-Gehalt dann wie bereits bei Monocyten/Makrophagen beobachtet auch in murinen Fibroblasten wieder deutlich an (Abb. 5B).

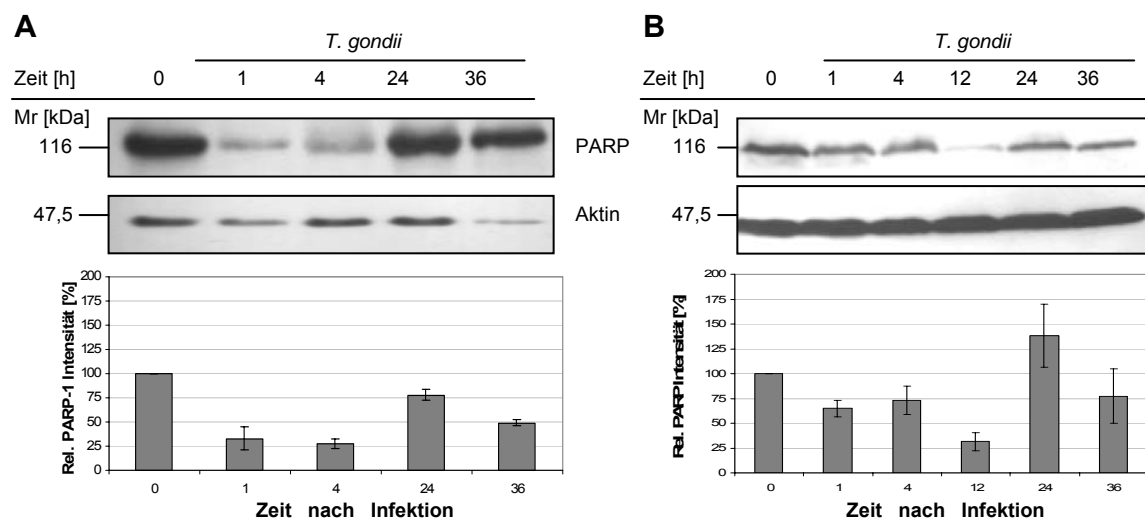


Abb. 5: PARP-1-Inhibierung in unterschiedlichen murinen Zelltypen nach Infektion mit *T. gondii*.

RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (**A**) und NIH 3T3 Fibroblasten (**B**) wurden im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für unterschiedliche Zeiten mit Tachyzoiten des NTE-Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

Grundsätzlich führte *T. gondii* also auch in murinen Fibroblasten zu einer Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels, die sich im zeitlichen Verlauf jedoch von der in Monocyten/Makrophagen unterschied.

3.1.3 PARP-1-Inhibierung nach *T. gondii*-Infektion von humanen Zellen

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Inhibierung des PARP-1 Proteingehaltes um einen spezifischen Effekt bei murinen Zellen oder um ein generelles Phänomen handelt, wurden zwei humane Zelllinien, Jurkat Leukämie-T-Zellen und THP-1-Monocyten mittels Gesamtproteinextraktion, SDS-PAGE und Western Blot auf ihre PARP-1-Proteinlevel nach Infektion mit *T. gondii* überprüft. Da es sich bei humanen Jurkat T-Zellen im Gegensatz zu Monocyten/Makrophagen und Fibroblasten um Suspensionszellen handelt und sie sich weniger gut mit *T. gondii* infizieren lassen, wurden diese Zellen im Parasit-Wirtszell Verhältnis von 30:1 mit frisch isolierten Tachyzoiten des Maus-avirulenten *T. gondii* Stammes NTE infiziert. Die THP-1-Monocyten wurden dagegen wie in den vorangegangenen Versuchen 4:1 mit NTE Tachyzoiten infiziert. In beiden Zelltypen waren die PARP-1-Proteinlevel nach 1 h Infektion mit *T. gondii* um ca. 20% (Abb. 6A) bis 25% (Abb. 6B) reduziert. Während *T. gondii* in Jurkat T-Zellen jedoch 8 h nach Infektion die PARP-1-Menge auf etwa 10% des Gehaltes vor Infektion reduzierte (Abb. 6A), waren die PARP-1-Proteinlevel in THP-1-Zellen maximal auf nur etwa 60% vermindert (Abb. 6B). Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass bei den Infektionsversuchen mit THP-1-Zellen keine Proteinextraktionen 8 h nach Infektion erfolgten, so dass eine stärkere transiente Inhibierung der Expression von PARP-1 zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. In beiden Zelllinien nahmen die PARP-1-Proteinlevel 36 h nach Infektion um etwa 50% ab. Insgesamt zeigte vor allem der zeitliche Verlauf der PARP-1-Inhibierung in Jurkat T-Zellen eine deutliche Heterogenität, was sich auch in den relativ großen Standardfehlern des Mittelwertes zum Zeitpunkt 4 h nach Infektion äußerte. Zusammenfassend zeigten aber auch humane Zelllinien, ebenso wie murine, eine Inhibierung des PARP-1 Proteingehaltes nach Infektion mit *T. gondii*, auch wenn sich die Intensität und der zeitliche Ablauf der Inhibierung deutlich unterschieden.

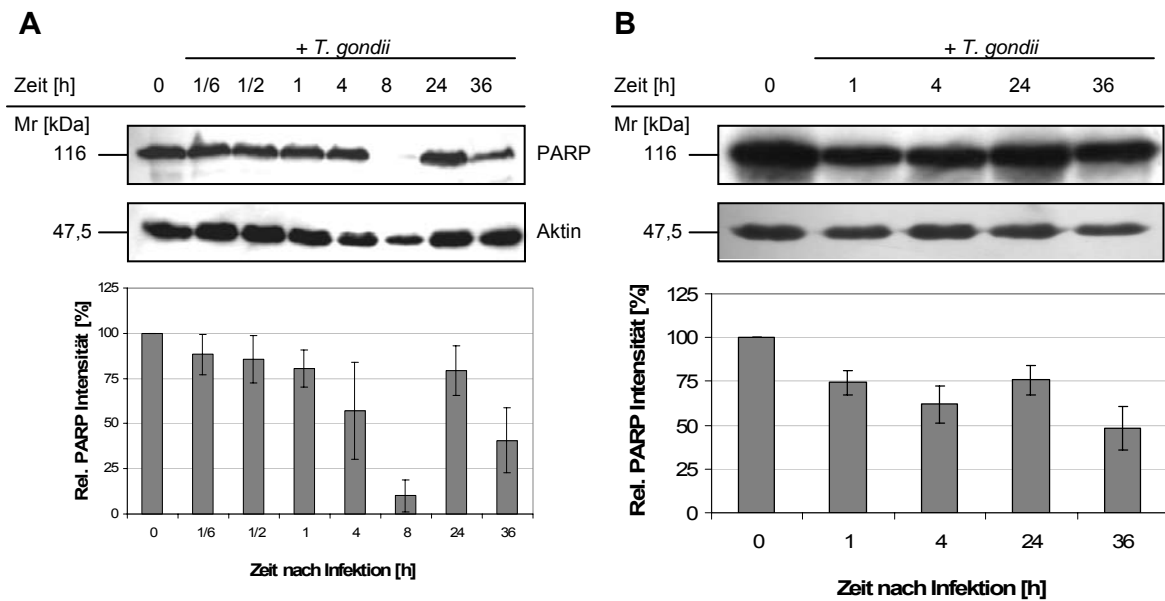


Abb. 6: PARP-1-Inhibierung in unterschiedlichen humanen Zelltypen nach Infektion mit *T. gondii*.

Humane Jurkat T-Zellen (**A**) und humane THP-1-Monocyten (**B**) wurden im Parasit-Wirt-Verhältnis von 30:1 (A) oder 4:1 (B) für unterschiedliche Zeiten mit Tachyzoiten des NTE Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

3.2 Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch *T. gondii*

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob die nach Infektion mit *T. gondii* verminderte PARP-1 Expression auch zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität in RAW 264.7 Makrophagen/Monocyten führt. Dies geschah mittels Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch einen Zell-ELISA und durch PARP-1 Aktivitätsnachweis auf Einzelzellebene (BAKONDI *et al.*, 2002). Hierfür wurden RAW 264.7 Zellen mit frisch isolierten *T. gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirtszell Verhältnis von 4:1 und 8:1 infiziert. PARP-1 wurde mit steigenden Konzentrationen an Wasserstoffperoxid aktiviert und den Zellen gleichzeitig biotinyliertes NAD^+ zur Verfügung gestellt. Die Bildung von biotinylierten ADP-Ribose Polymeren konnte anschließend mittels Peroxidase-konjugiertem Streptavidin und ortho-Phenylendiamin beim Zell-ELISA photometrisch bzw. mittels Peroxidase-Streptavidin

und Nickel-DAB auf Einzelzellebene mikroskopisch nachgewiesen werden. Durch steigende Wasserstoffperoxid-Konzentrationen nahm die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in nicht-infizierten Zellen dosisabhängig zu (Abb. 7B).

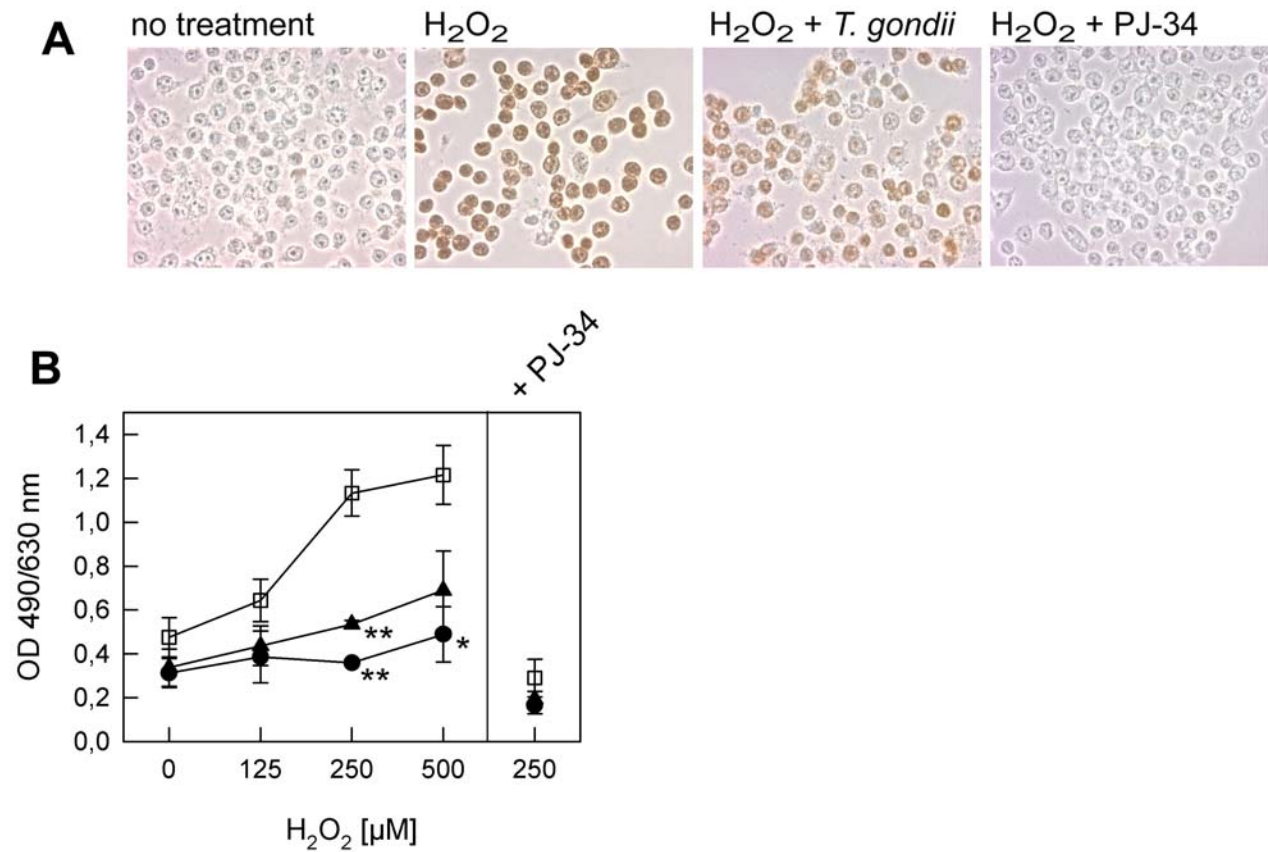


Abb. 7: Inhibition der PARP-1 Aktivität in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen nach Infektion mit *T. gondii*.

(A) Für den Nachweis der PARP-1 Aktivität auf Einzelzellebene wurden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen auf Deckgläschen ausgesät, mit *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis 8:1 infiziert oder nicht-infiziert belassen. Die Zellen wurden mit 500 μM H₂O₂ behandelt. Als Kontrolle wurde die H₂O₂-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Inkubation mit dem PARP-spezifischen Inhibitor PJ34 vermindert. Im Anschluß wurden die Zellen mit biotinyliertem NAD⁺ inkubiert und biotinylierte (ADP-Ribose) Polymere mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin und Nickel-DAB mikroskopisch nachgewiesen. (B) Für den Nachweis der PARP-1 Aktivität durch Zell-ELISA wurden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen in 96-Lochplatten ausgesät, mit *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis 4:1 (schwarze Dreiecke) oder 8:1 (schwarze Kreise) infiziert oder nicht-infiziert (weiße Vierecke) belassen und PARP-1 durch unterschiedliche Konzentrationen H₂O₂ aktiviert. Der Nachweis der biotinylierten (ADP-Ribose) Polymere erfolgte durch Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin und ortho-Phenylendiamin und photometrische Messungen bei 490/630 nm. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (±) des Mittelwertes dar. Die anschließende Statistik erfolgte mittels Students t-test, (** p < 0,01 und * p < 0,05)

In *T. gondii*-infizierten Zellen war die H₂O₂-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen signifikant erniedrigt (Abb. 7A und 7B). Quantitative Analysen mittels Zell-ELISA ergaben, dass die Poly(ADP-Ribosyl)ierung nach Infektion von RAW 264.7 Zellen im Parasit-Wirtszell Verhältnis von 8:1 stärker gehemmt war als in Zellen, die 4:1 infiziert worden waren (Abb. 7B).

Mit PJ34 inkubierte nicht-infizierte Zellen, die mit H₂O₂ behandelt worden waren, zeigten eine komplette Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Abb. 7A und 7B). Da PJ34 ein für PARP spezifischer Inhibitor ist (SORIANO *et al.*, 2001), kann davon ausgegangen werden, dass die hier gemessene Poly(ADP-Ribosyl)ierung ausschließlich auf die Aktivität von PARP-1 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse wurden durch einen PARP-1 Aktivitätsnachweis auf Einzelzellebene bestätigt bzw. erweitert. In nicht-infizierten Zellen war im Zellkern nach Behandlung mit H₂O₂ deutlich eine ADP-Ribosylierung nachweisbar (Abb. 7A). Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung, die PARP-1 vor allem im Zellkern nachwies (Abb. 3C). Nach Infektion mit *T. gondii* war die H₂O₂-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in der überwiegenden Mehrzahl der Zellen deutlich vermindert, so dass auch die PARP-1-Aktivität unabhängig von einer Wirtszellinvasion durch den Parasiten inhibiert zu sein schien. Durch Inkubation nicht-infizierter Zellen mit PJ34 konnte die PARP-1 Aktivität in allen Zellen trotz vorheriger Stimulierung mit H₂O₂ komplett inhibiert werden (Abb. 7A).

T. gondii exprimiert verschiedene Enzyme, unter anderen eine Katalase, die den Parasiten vor dem so genannten „Oxidativen Burst“, einem Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegenüber Pathogenen, effektiv schützt. Das *T. gondii* Enzym Katalase ist dabei in der Lage, von der Wirtszelle abgegebenes H₂O₂ zu detoxifizieren (MURRAY *et al.*, 1980). Aus diesem Grund wurde der Zell-ELISA auch mit Katalase-defizienten Parasiten (DING *et al.*, 2004) durchgeführt. Dies diente zur Bestätigung, dass die Abnahme der enzymatischen Aktivität von PARP-1 nach Infektion mit *T. gondii* nicht durch einen Katalase-vermittelten Abbau des Wasserstoffperoxids durch den Parasiten verursacht wurde. Zunächst wurden Katalase-negative Parasiten des Stammes PRU (PRUcaf), sowie die Katalase-positiven Parasiten des parentalen Stammes PRUhxgprf, auf ihren Katalase-Gehalt mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Während der parentale Stamm PRUhxgprf Katalase deutlich exprimierte, konnte bei PRUcaf keine Katalase nachgewiesen werden (Abb. 8B).

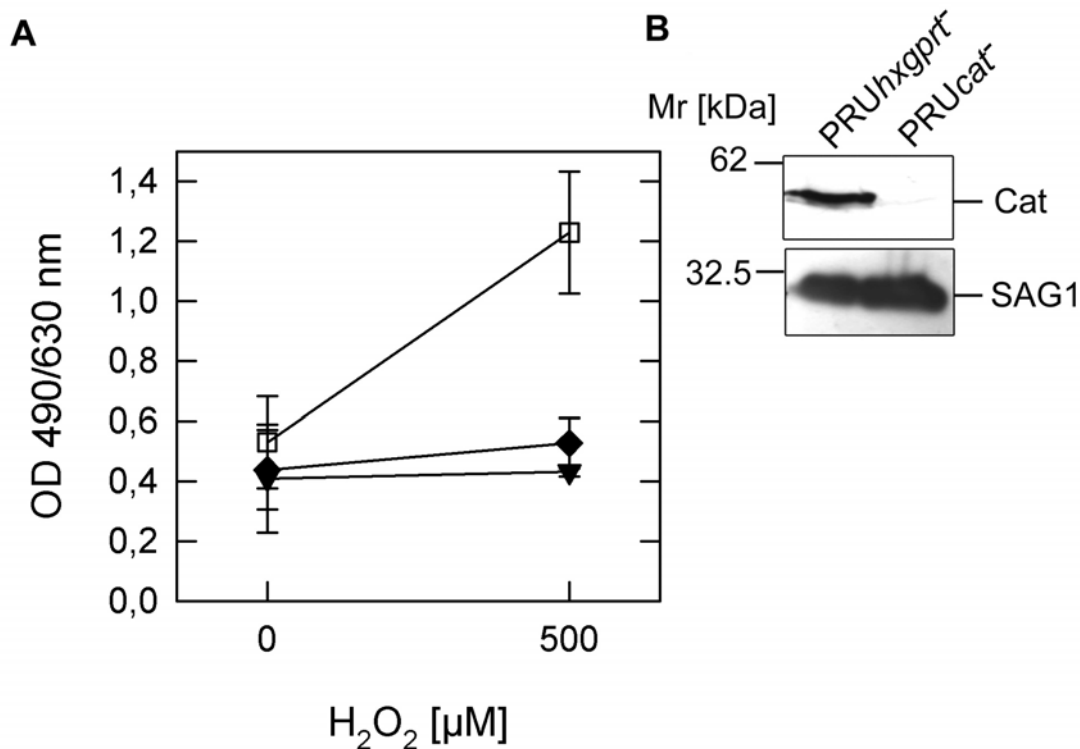


Abb. 8: Das *T. gondii* Enzym Katalase ist nicht für die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von PARP-1 verantwortlich

(A) RAW 264.7 Monozyten/Makrophagen wurden mit dem *T. gondii* Stamm PRUhxgprf (schwarze Rauten) oder PRUcat (schwarze umgekehrte Dreiecke) im Parasit-Wirt-Verhältnis von 8:1 infiziert oder blieben nicht infiziert (weiße Rechtecke). Der Nachweis der biotinylierten (ADP-Ribose) Polymere erfolgte durch Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin und ortho-Phenylendiamin photometrisch bei 490/630 nm. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. **(B)** Zum Nachweis der Katalase-Defizienz von PRUcat wurde 1×10^8 Tachyzoiten von Mutante und Parentalstamm (PRUhxgprf) lysiert, lösliche Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran übertragen. Katalase und SAG1 wurden durch entsprechende Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Mr: Molekulargewichtsmarker

Dagegen konnte das Hauptoberflächenprotein von *T. gondii*, SAG-1, in beiden Parasiten-Stämmen gleichermaßen nachgewiesen werden (Abb. 8B). Im Zell-ELISA war die H₂O₂-induzierte PARP-1-Aktivität sowohl bei Zellen, die mit den Katalase-negativen PRUcat Parasiten infiziert worden waren, als auch bei Zellen, die mit dem parentalen Stamm PRUhxgprf infiziert worden waren, ähnlich stark reduziert. Dagegen führte H₂O₂ in nicht-infizierten Kontrollen zu einer deutlichen PARP-Aktivität (Abb. 8A). Dies bestätigte, dass die Abnahme der enzymatischen Aktivität von PARP-1 nicht auf eine Katalase-vermittelte Detoxifizierung von H₂O₂ durch den

Parasiten zurück zu führen war, sondern parallel mit der Reduktion der PARP-1-Proteinlevel einherging.

3.3 *T. gondii*-Stämme unterschiedlicher Genotypen hemmen

PARP-1

Verschiedene Stämme von *T. gondii* werden unter anderem entsprechend ihrer Virulenz in Mäusen in drei Gruppen unterteilt. Gruppe A enthält *T. gondii* Stämme, die Maus-virulent sind (z.B. die Stämme RH und BK). Die Gruppen B und C enthalten Maus-avirulente Stämme, die sich durch die Abwesenheit (Gruppe B, z.B. NTE und DX) bzw. die Anwesenheit (Gruppe C, z.B. CEP und C56) des Antigens P22 nochmals unterteilen lassen (PARMLEY *et al.*, 1994). Beim apikomplexen Parasiten *Plasmodium* konnte gezeigt werden, dass PARP-1 unter anderem für die Schwere des Verlaufs der Malaria eine wichtige Rolle zu spielen scheint (CLARK *et al.*, 2004). Aus diesem Grund sollten verschiedene *T. gondii* Stämme aus allen drei Gruppen auf ihre Auswirkung auf den PARP-1 Proteingehalt in RAW 264.7 Wirtszellen untersucht werden. Dazu wurden Wirtszellen mit frisch isolierten Tachyzoiten von sechs verschiedenen Parasitenstämmen (RH, BK, NTE, DX, CEP und C56) für 1 h infiziert sowie Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE und Western Blot verglichen. Nach Infektion mit jeweils einem der sechs Stämme zeigte sich eine deutliche Verminderung der PARP-1-Proteinlevel in allen Wirtszellen um 45% bis 75% im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 9). Obwohl Parasitenstämme vom Genotyp C bei diesen Versuchen PARP-1 am stärksten inhibierten, konnten keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die PARP-1 Proteininhibierung zwischen Maus-virulenten und Maus-avirulenten Stämmen festgestellt werden. Die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* scheint demnach nicht mit der Virulenz des Parasiten in Mäusen oder anderen genotypischen Stammunterschieden zu korrelieren.

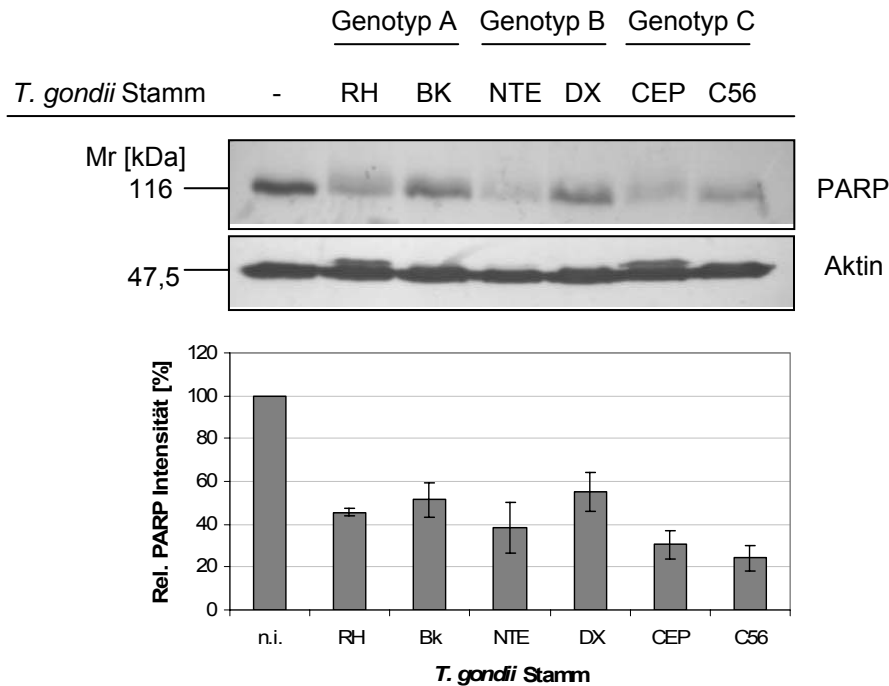


Abb. 9: Die Inhibierung der Expression von PARP-1 in Wirtszellen durch *T. gondii* ist unabhängig von der Parasitenvirulenz.

RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden mit Stämmen der drei Genotypen von *T. gondii* (RH, BK, NTE, DX, CEP und C56) im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

3.4 Regulationsmechanismen der PARP-1-Inhibierung durch

T. gondii auf Wirtszellebene

3.4.1 Beteiligung von Wirtszellmolekülen an der Inhibierung der Expression von PARP-1

Verschiedene Cytokine und Chemokine werden nach einer Infektion des Wirtes mit *T. gondii* als direkte Antwort des Immunsystems ausgeschüttet (FISCHER *et al.*, 1997; DENNEY *et al.*, 1999). Die Inhibierung der PARP-1 Expression könnte daher durch einen indirekten Effekt des Parasiten ausgelöst werden. Möglich wäre zum Beispiel

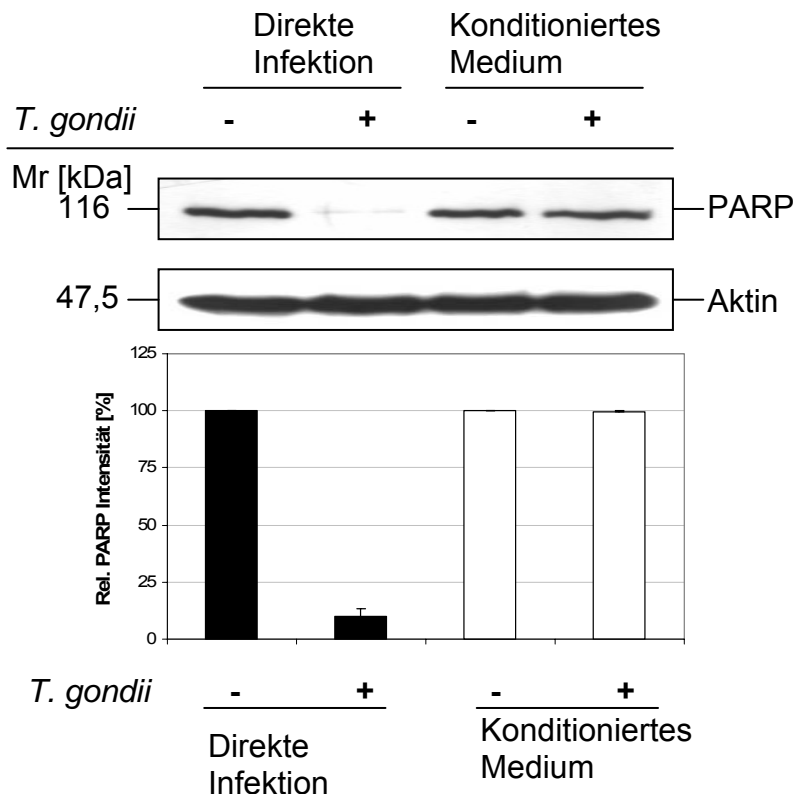


Abb. 10: PARP-1 wird nicht durch ein von infizierten Wirtszellen sekretiertes Molekül inhibiert.

RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden mit 1×10^8 *T. gondii* NTE Tachyzoiten für 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Das konditionierte Medium der Zellen wurde steril filtriert, und anschließend RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen mit den Zellkulturüberständen der infizierten bzw. nicht-infizierten Zellen für 1 h inkubiert (weiße Balken). Parallel wurden als Kontrolle RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen direkt mit 1×10^8 *T. gondii* NTE Tachyzoiten infiziert oder blieben nicht-infiziert (schwarze Balken). Gesamtproteinextrakte der Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin \times 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

die Ausschüttung von Molekülen durch die Wirtszelle als Reaktion auf die Infektion mit *T. gondii*, die PARP-1 hemmen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden RAW 264.7 Zellen mit frisch isolierten Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand steril filtriert, um extrazelluläre Parasiten zu entfernen. Nicht-infizierte RAW 264.7 Zellen wurden danach mit dem *T. gondii*-konditioniertem RAW-Überstand inkubiert. Als Kontrolle wurden RAW 264.7-Zellen mit frisch isolierten Tachyzoiten des *T. gondii*

Stammes NTE 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Nach 1 h wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zellen, die mit *T. gondii*-konditioniertem Zellkulturüberstand inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, die mit nicht-konditioniertem Überstand kultiviert wurden keine Verminderung des PARP-1 Gehaltes (Abb.10). Dagegen führte eine direkte Infektion von Makrophagen/Monocyten mit *T. gondii* wie in den bisherigen Versuchen zu einer deutlichen Reduktion des PARP-1-Proteinlevels um etwa 90% (Abb. 10). Diese Ergebnisse waren ein deutlicher Hinweis, dass die PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* auf eine Interaktion des Parasiten mit seinen Wirtszellen beruhte und nicht indirekt durch ein sekretiertes Wirtszellmolekül als Reaktion auf die Infektion vermittelt wurde.

3.4.2 Einfluss von Transkription und Translation der Wirtszelle auf die PARP-1-Inhibierung

Als obligat intrazellulärer Parasit greift *T. gondii* in physiologische Prozesse der Wirtszelle ein, um das eigene Überleben sowie die Replikation zu gewährleisten (LANG *et al.*, 2007). Der Parasit hat dafür vielfältige Mechanismen entwickelt. Unter anderem ist es *T. gondii* möglich, auf transkriptioneller (GAIL *et al.*, 2001) und auf post-transkriptioneller Ebene (BELLONI *et al.*, 2003) in die Expression von bestimmten Wirtszellproteinen einzugreifen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* für die Phosphorylierung und den Abbau von Wirtszellproteinen verantwortlich ist (BUTCHER *et al.*, 2001). Da *T. gondii* PARP-1 nach Infektion sowohl auf Proteinebene als auch auf Ebene der enzymatischen Aktivität inhibiert, sollte nun untersucht werden, ob der Parasit auf transkriptioneller, translationaler oder posttranslationaler Ebene in die PARP-1 Expression eingreift. Die Transkriptlevel von PARP-1 wurden durch RNA-Isolierung aus unterschiedlich lang infizierten RAW 264.7 Zellen mit anschließender Reverser Transkription und quantitativer „Real-time PCR“ analysiert. Die PARP-1 Expression der nicht-infizierten Kontrolle im Verhältnis zur Expression des Housekeeping Gens Aktin wurde als 1 festgelegt. Nach 1 h Infektion mit *T. gondii* zeigte sich eine Zunahme der PARP-1 mRNA-Level auf 2,2 und nach 4 h auf 3,1 (Abb. 11A). Allerdings war der PARP-1 Proteingehalt 1 h nach Infektion deutlich

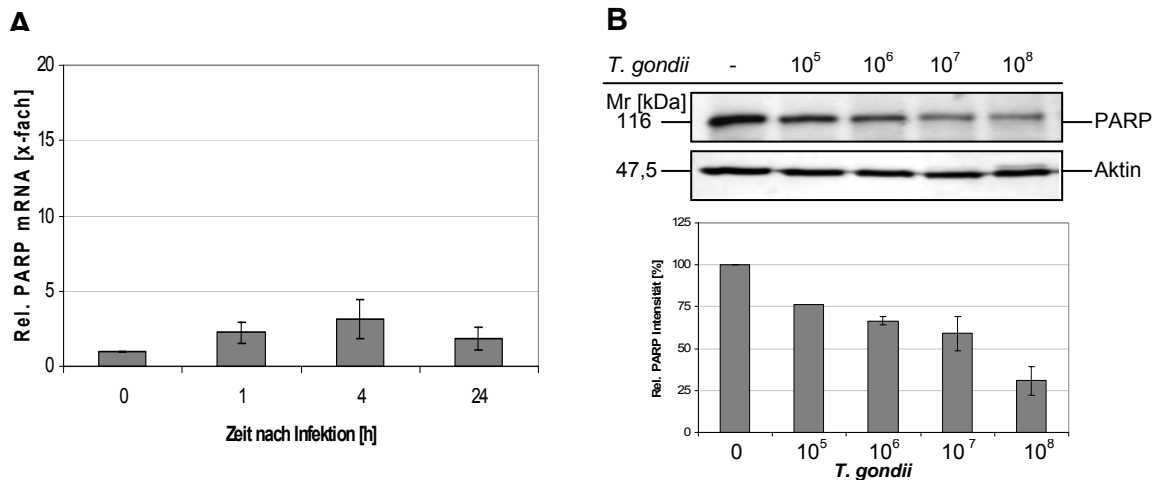


Abb. 11: Die Inhibierung der Expression von PARP-1 nach Infektion mit *T. gondii* erfolgt unabhängig von Transkription und Translation der Wirtszelle.

(A) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden unterschiedlich lange mit Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 infiziert, oder blieben nicht-infiziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, die mRNA revers transkribiert und eine RealTime PCR Analyse mit PARP- und β -Aktin-spezifischen Primern und dem MasterPlus SYBR Green 1 Kit im LightCycler durchgeführt. Anhand der CP-Werte wurden die relativen Veränderungen der PARP-1 cDNA-Mengen im Verhältnis zu den β -Aktin cDNA-Mengen berechnet, wobei die Menge zum Zeitpunkt Null als Eins definiert wurde. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. **(B)** Für das zellfreie *in vitro* System wurden nukleäre Proteine aus RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen isoliert und mit unterschiedlichen Mengen an *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE für 1 h inkubiert. Danach wurden die Parasiten mittels Zentrifugation entfernt, die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin \times 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

reduziert und zeigte im weiteren Verlauf der Infektion eine langsame Zunahme des PARP-1-Proteinlevels, der nach 24 h Infektionszeit auf dem Niveau der nicht-infizierten Kontrolle anlangte (Abb. 3B). Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Inhibierung der PARP-1 Expression nach *T. gondii*-Infektion nicht auf verminderte Transkriptionslevel zurückzuführen war. Um zusätzliche Hinweise auf mögliche zelluläre Regulationsmechanismen der PARP-Inhibierung durch *T. gondii* zu erhalten, wurde auch ein zellfreies *in vitro* System eingesetzt. Hierfür wurden nukleäre Lysate von RAW 264.7 Zellen verwendet, denen sowohl eine funktionierende Translationsmaschinerie als auch intakte Zellmembranen oder membranumhüllte Organellen der Wirtszelle fehlten. So konnte unter anderem ein Einfluss von *T. gondii* auf die Wirtszelltranslation bei der Inhibierung von PARP

untersucht werden. Ein Überleben des Parasiten im nukleären Lysat wurde in Vorversuchen für mehrere Stunden nachgewiesen (nicht gezeigte Ergebnisse). Um den Einfluss von *T. gondii* auf PARP-1 zu bestimmen, wurden nukleäre Lysate mit steigender Parasiten-Menge für 1 h inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Bemerkenswerterweise war der Parasit auch im zellfreien *in vitro* System in der Lage, den PARP-1 Proteingehalt deutlich zu reduzieren (Abb. 11B). So verminderten z.B. 1×10^8 *Toxoplasma* Tachyzoiten den PARP-1-Gehalt des nukleären Lysates um etwas 70% (Abb. 11B). Die Stärke der Reduktion von PARP-1 entspricht in etwa dem Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 in lebenden Zellen (Abb. 4), allerdings handelt es sich im *in vitro* System um ein ursprüngliches Parasit-Wirt-Verhältnis von etwa 16:1. In Abhängigkeit von der Parasitenmenge konnte außerdem wie in intakten RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (Abb. 4) eine dosisabhängige Abnahme des PARP-1-Proteinlevels beobachtet werden (Abb. 11B). Dies zeigte, dass die PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* unabhängig von der Translation der Wirtszelle stattfand.

3.4.1 Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* in Gegenwart von Proteasominhibitoren

Da *T. gondii* PARP-1 unabhängig von Transkription und Translation der Wirtszelle vermindert, sollte nachfolgend geprüft werden, inwieweit das Protein nach Infektion mit *T. gondii* durch Wirtszellproteasomen abgebaut wird. Durch das Proteasom werden mit Ubiquitin markierte Proteine, die entweder nicht mehr benötigt werden oder in ihrer dreidimensionalen Faltung Fehler aufweisen, abgebaut (LECKER *et al.*, 2006). Dazu wurden RAW 264.7 Zellen mit den Proteasom-Inhibitoren MG132 oder Lactacystin vorinkubiert und mit Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE 1 h infiziert. Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Sowohl mit MG132 als auch mit Lactacystin vorinkubierte RAW 264.7 Zellen zeigten eine starke Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels nach Infektion mit *T. gondii* im Vergleich zu nicht-infizierten RAW 264.7 Kontrollzellen (Abb. 12A). So waren in *T. gondii* infizierten Zellen, unabhängig von der Vorinkubation mit Proteasom-Inhibitoren, der PARP-1 Proteingehalt um etwa 60-80% reduziert (Abb. 12A). Allerdings war der PARP-1-Proteinlevel der mit den Proteasom-

Inhibitoren vorinkubierten Proben auch ohne *T. gondii*-Infektion um 20-30% niedriger als in nicht behandelten Kontrollzellen (Abb. 12A). Diese Ergebnisse konnten auch im zellfreien *in vitro* System bestätigt werden (Abb. 12B). Dabei war in infizierten Proben der PARP-1-Proteinlevel zwischen 60% und 90% im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen reduziert, unabhängig von einer Vorinkubation mit Proteasom-Inhibitoren (Abb. 12B). Auch waren die PARP-1 Mengen in mit MG132 und Lactacystin vorinkubierten Zellen, die nicht infiziert worden waren, um 20-25% niedriger als in nicht behandelten Kontrollen (Abb. 12B). Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 nach *Toxoplasma*-Infektion vermutlich unabhängig von der Aktivität der Wirtszellproteasomen stattfand.

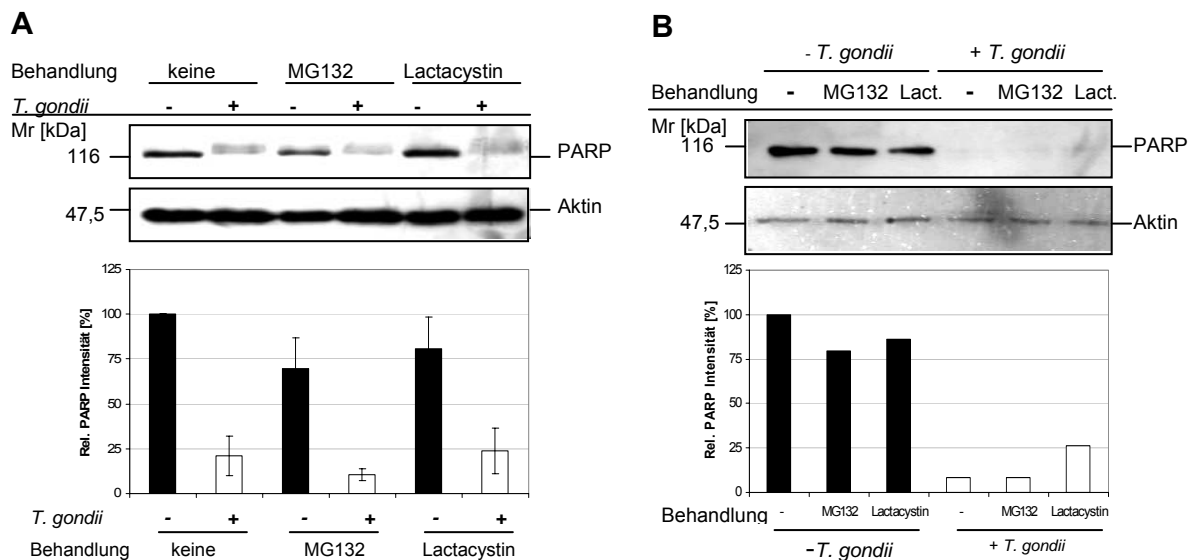


Abb. 12: PARP-1 wird nach Infektion mit *T. gondii* nicht durch Wirtszellproteasomen abgebaut.

(A) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für 10 min mit den Proteasom-Inhibitoren MG132 (50 nM) oder Lactacystin (10 μ M) vorinkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin \times 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker **(B)** Für das zellfreie *in vitro* System wurden nukleäre Proteine aus RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen isoliert, und 10 min mit den Proteasom-Inhibitoren MG132 (50 nM) oder Lactacystin (10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die nukleären Lysate mit je 1×10^8 *T. gondii* NTE Tachyzoiten oder ohne Tachyzoiten für 1 h inkubiert. Die Lysate wurde danach wie unter (A) beschrieben weiterbehandelt. Mr: Molekulargewichtsmarker

3.5 Voraussetzungen von *T. gondii* für die PARP-1-Inhibierung

Zur weiteren Charakterisierung der Mechanismen der Inhibierung der Expression von PARP-1 wurden im Folgenden die Voraussetzungen des Parasiten für diese Wirtszellmodulation untersucht. Da *T. gondii* während der Wirtszellinvasion und während der Bildung der parasitophoren Vakuole eine Reihe von exkretorischen-sekretorischen Molekülen (ESM) sezerniert (CARRUTHERS und SIBLEY, 1997; CARRUTHERS, 1999) und diese Moleküle zum Teil zur Wirtszellmodulation beitragen (DIANA *et al.*, 2005), könnte eines dieser Moleküle auch die Inhibierung der Expression von PARP-1 verursachen. Die ESM werden teilweise auch von extrazellulären Parasiten spontan sezerniert. Zur Überprüfung eines Einflusses von ESM wurde daher ein Transwell-System mit Membraneinsätzen verwendet. RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden dazu entweder direkt mit *T. gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 bzw. 8:1 infiziert, oder die Parasiten wurden im gleichen Verhältnis in das Transwell gegeben, sodass kein direkter Kontakt zwischen Parasit und Wirtszellen zustande kommen konnte. Sekretierte Proteine konnten so durch die Membran des Transwell-Systems gelangen, aber eine Infektion der Wirtszellen wurde verhindert. Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Zellen mit und ohne Transwell-Einsatz mitgeführt. Nach 1 h wurden Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen hergestellt und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Parasiten mit direktem Kontakt zu den Wirtszellen reduzierten den PARP-1 Proteingehalt durchschnittlich um 40-65%, wobei die Inhibierung der Expression von PARP-1 abhängig von der Dosis der Parasiten war (Abb. 13). Parasiten, deren direkter Kontakt zu den Wirtszellen durch die Membran des Transwell-Einsatzes verhindert wurde, konnten den PARP-1-Proteinlevel der Wirtszellen dagegen nicht reduzieren (Abb. 13). Diese Experimente zeigten, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 offensichtlich nicht durch ein von *T. gondii* spontan sekretiertes Molekül verursacht wird. Die Ergebnisse des Transwell-Systems deuteten darauf hin, dass für die PARP-1 Reduktion ein direkter Kontakt von Parasit und Wirtszelle nötig ist. Daher sollte nachfolgend ermittelt werden, welche weiteren Eigenschaften des Parasiten für die Inhibierung der Expression von PARP-1 wichtig sind. Dazu sollten RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen mit unterschiedlich vorbehandelten *T. gondii* Tachyzoiten bzw. mit Parasitenlysaten inkubiert werden und deren Auswirkung auf die PARP-1 Expression untersucht werden. Parasiten, die mit UV-Licht behandelt werden, sind zwar noch in der Lage in die Wirtszelle

einzudringen, sie können sich aber nicht mehr vermehren (ENDO *et al.*, 1981). Bei 60°C inkubierte Parasiten (SIBLEY *et al.*, 1985), ebenso wie bei -20°C eingefrorene Parasiten, werden durch die Behandlung abgetötet und können daher nicht mehr in die Wirtszelle eindringen. Um die Effektivität der verschiedenen Behandlungen zu testen, wurden in Vorversuchen zunächst RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen für 24 h mit Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE infiziert, die unbehandelt blieben, mit UV-Licht bestrahlt oder bei 60°C inkubiert worden waren. Der Parasitennachweis durch Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass unbehandelte Parasiten sich wie

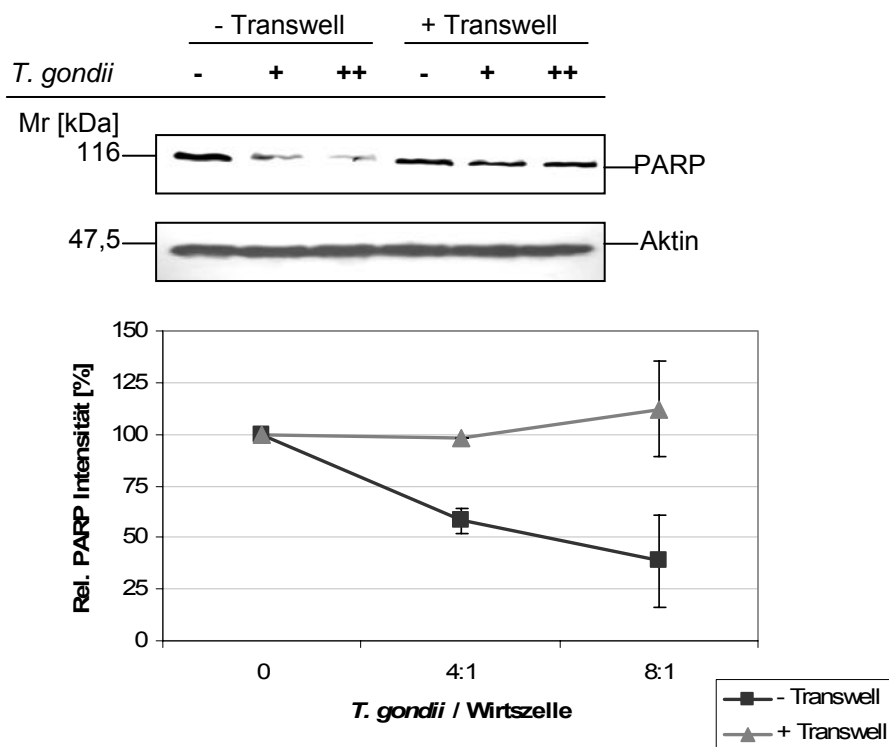


Abb. 13: Von Wirtszellen durch eine semipermeable Membran getrennte Parasiten vermitteln keine Inhibierung der Expression von PARP-1.

RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden entweder direkt mit *T. gondii* NTE Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 (+) bzw. 8:1 (++) infiziert (schwarze Quadrate) oder mit Parasiten in gleichen Parasit-Wirtszell Verhältnissen inkubiert, die von den Wirtszellen durch die Membran (0.4 µm Porengröße) eines Transwell-Einsatzes getrennt waren (+ Transwell, graue Dreiecke). Wirtszellen ohne Parasiten (-) wurden parallel inkubiert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (±) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

erwartet 24 h nach Infektion intrazellulär stark vermehrt hatten und deutliche parasitophore Vakuolen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Parasiten ausgebildet hatten (Abb. 14). Zellen, die mit UV-behandelten Parasiten inkubiert worden waren, enthielten dagegen nur einzelne intrazelluläre Parasiten, so dass UV-behandelte Parasiten zwar zur Invasion der Wirtszelle, nicht aber zur intrazellulären Vermehrung fähig waren (Abb. 14). In Zellen, die mit Hitze-behandelten *T. gondii* inkubiert worden waren, konnten dagegen keine intrazellulären Parasiten nachgewiesen werden, sodass auch die Wirtszellinvasion unterbunden war (Abb. 14).

Nachfolgend wurde die Auswirkung der Vorbehandlungen der Parasiten auf den PARP-1-Proteinlevel der Wirtszellen überprüft. Dazu wurden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen entweder für 1 h mit unbehandelten, mit UV- bzw. Hitze-vorbehandelten *T. gondii* Tachyzoiten oder mit PBS-löslichen oder -unlöslichen *T. gondii*-Lysaten inkubiert. Gesamtproteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf ihren PARP-1 Gehalt überprüft. Interessanterweise reduzierten UV- und Hitze-behandelte Parasiten die PARP-1-Proteinlevel der Wirtszellen ähnlich stark wie unbehandelte *T. gondii* (Abb. 15A).

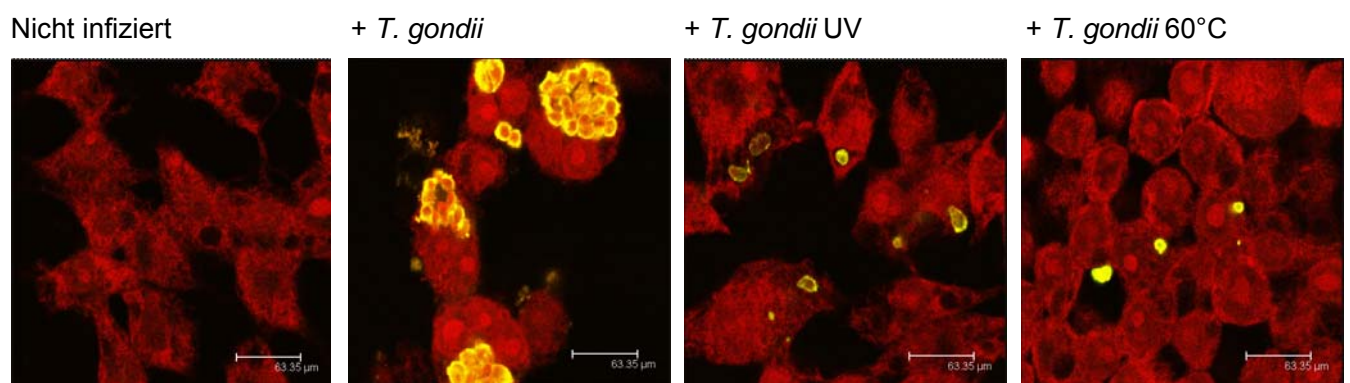
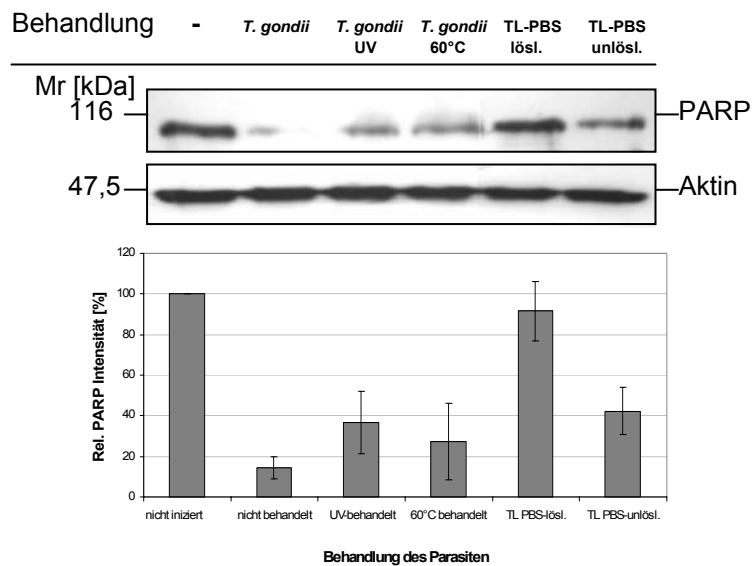


Abb. 14: Effektivität von UV-Behandlung und Hitze-Inaktivierung auf Replikation und Wirtszellinvasion durch *T. gondii*.

Parasiten wurden 70 sec mit UV-Licht bestrahlt, 30 min bei 60°C inkubiert oder unbehandelt belassen. RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für 24 h mit unterschiedlich vorbehandelten oder unbehandelten Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 infiziert oder blieben nicht-infiziert. *T. gondii* wurde mittels eines Parasiten-spezifischen polyklonalen Antiserums und Cy-2-konjugiertem Sekundärantikörper (grüne Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Doppelsträngige Nukleinsäuren in Wirtszellen und Parasiten wurden mit Propidiumiodid angefärbt (rote Fluoreszenz). Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet.

A



B

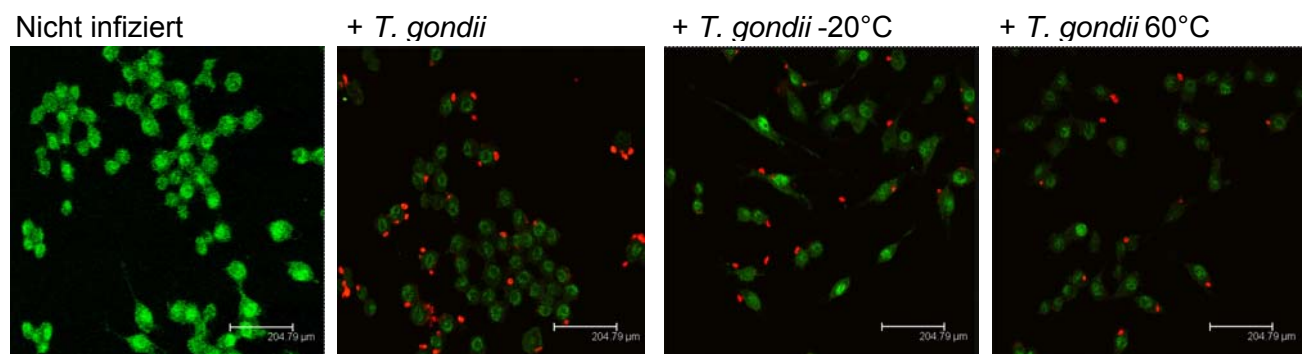


Abb. 15: *T. gondii* Tachyzoiten inhibieren unabhängig von Wirtszellinvasion und intrazellulärer Replikation den PARP-1-Proteinlevel.

T. gondii Tachyzoiten des Stammes NTE wurden für 70 sec mit UV-Licht bestrahlt, bei 60°C für 30 min inkubiert oder bei -20°C für mindestens 24 h inkubiert. Außerdem wurden aus Parasiten ein PBS-lösliches Lysat (TL-PBS lösl.) hergestellt oder das unlösliche Pellet nach PBS-Extraktion resuspendiert (TL-PBS unlösl.). (A) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für 1 h mit den unterschiedlich behandelten oder unbehandelten Parasiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 oder mit *T. gondii*-Lysaten (50 µg) für 1 h inkubiert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primäntikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundäntikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker; TL: *T. gondii*-Lysat (B) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden für 1 h im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit unterschiedlich vorbehandelten oder unbehandelten Tachyzoiten des NTE Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. PARP-1 und *T. gondii* Tachyzoiten wurden durch Immunfluoreszenzfärbung mittels spezifischer Primäntikörper und Cy-2-konjugiertem (PARP-1: grüne Fluoreszenz) oder Cy-3-konjugiertem (*T. gondii*: rote Fluoreszenz) Sekundäntikörper sichtbar gemacht. Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet.

Neben der Hitze-Inaktivierung erfolgte auch eine Inaktivierung von *T. gondii* Tachyzoiten durch Tiefrieren bei -20°C für mindestens 24 h. Diese Parasiten können, ebenso wie die Hitze-inaktivierten *T. gondii*, nicht mehr in Wirtszellen eindringen. Vergleichbar mit Abb. 14 waren im Immunfluoreszenztest keine intrazellulären Parasiten vorhanden und im Western Blot war die Inhibierung der Expression von PARP-1 ähnlich stark wie mit Hitze-inaktivierten Parasiten (nicht gezeigte Ergebnisse). Ein PBS-lösliches *T. gondii*-Lysat führte dagegen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht zur Reduktion des PARP-1-Proteinlevels (Abb. 15A). Im Gegensatz dazu war der PARP-1 Proteingehalt von Wirtszellen nach Inkubation mit einer PBS-unlöslichen Fraktion eines *T. gondii*-Extraktes um mehr als 50% niedriger als in unbehandelten Zellen (Abb. 15A). Durch Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie wurden diese Ergebnisse bestätigt und erweitert. So inhibierten Parasiten, die durch Tiefrieren bei -20°C oder Hitze-Behandlung inaktiviert worden waren, die PARP-1 Expression genauso effektiv wie lebende unbehandelte *T. gondii* Tachyzoiten (Abb. 15B). Dabei war PARP-1 nach Inkubation mit lebenden oder inaktivierten Parasiten auch in solchen Zellen deutlich reduziert, bei denen kein direkter Kontakt zwischen Wirtszelle und einem Parasiten nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass extrazelluläre, an Wirtszellen adhären Parasiten durch Waschen während der Immunfluoreszenzfärbung abgespült wurden. Die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch inaktivierte Parasiten bestätigte außerdem, dass auch in parasit-negativen Wirtszellen einer infizierten Population der PARP-1 Gehalt stark reduziert war, ohne dass es dabei zu einer Umverteilung von PARP-1 aus dem Zellkern kam (Abb. 3C und Abb. 15B). Zusammenfassend zeigten diese Resultate, dass sowohl das Eindringen in die Wirtszelle als auch die Replikation des Parasiten für die PARP-1-Inhibierung offensichtlich ohne Bedeutung war. Allerdings scheinen Moleküle des Parasiten, die sich in einer PBS-unlöslichen Fraktion von Parasitenextrakten befanden und möglicherweise membranassoziiert waren, für die Reduktion von PARP-1 in der Wirtszelle eine wichtige Rolle zu spielen.

3.6 Fraktionierung von PBS-unlöslichen *T. gondii*-

Bestandteilen

Die PBS-unlösliche *T. gondii*-Fraktion, die größtenteils Membranbestandteile des Parasiten enthalten haben dürfte, reduzierte den PARP-1 Proteingehalt ähnlich stark, wie lebende Parasiten. Dies legte die Vermutung nahe, dass ein Membran-assoziiertes Protein diesen Effekt verursachen könnte. Zur näheren Untersuchung wurden daher verschiedene Fraktionen Membran-assoziiierter Proteine von *T. gondii* hergestellt (PRZYBORSKI *et al.*, 2005). Die S1-Fraktion enthielt vor allem periphere Membran-assoziierte Proteine, die durch Waschen mit einem Natriumcarbonat-Puffer isoliert werden konnten. Harnstoff-haltige Puffer sind in der Lage, komplexere Protein-Aggregate zu lösen, diese waren in der S2-Fraktion enthalten. In der S3-Fraktion befanden sich hauptsächlich hydrophobe integrale Membranproteine, die durch einen Triton X-100-haltigen Puffer isoliert werden konnten. In der P1-Fraktion waren die durch diese Behandlungen nicht isolierten Proteine und Membranreste enthalten. Die verschiedenen Fraktionen wurden für 1 h mit RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen inkubiert. Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf ihren PARP-1 Proteingehalt überprüft. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit lebenden Tachyzoiten infiziert worden waren und in denen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen eine Reduzierung des PARP-1-Proteinlevels um über 80% beobachtet wurde (Abb. 16). Die S1-Fraktion, die hauptsächlich periphere Membran-assoziierte Proteine von *T. gondii* enthielt, führte zu einer Reduktion des PARP-1-Gehaltes um 90% und damit zu einer stärkeren Hemmung als lebende Tachyzoiten, auch wenn quantitativ kein Mengenvergleich zwischen Parasiten und S1-Fraktion auf Grund der Herstellung der Fraktionen möglich war. Eine leichte Inhibierung um 25% zeigte auch die S2-Fraktion, wo hingegen die S3-Fraktion keine Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels verursachen konnte (Abb. 16). Die P1-Fraktion, die die restlichen nicht-isolierten Proteine und Membranreste enthielt, führte zu einer Inhibierung der Expression von PARP-1 um etwa 60%, was entweder auf nicht gelöste periphere Membranproteine oder ein zusätzliches Protein bzw. Molekül, welches ebenfalls PARP-1 inhibieren kann, zurückzuführen sein könnte. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein Membran-assoziiertes Protein von *T. gondii* an der Inhibierung der Expression von PARP-1 in Wirtszellen beteiligt war.

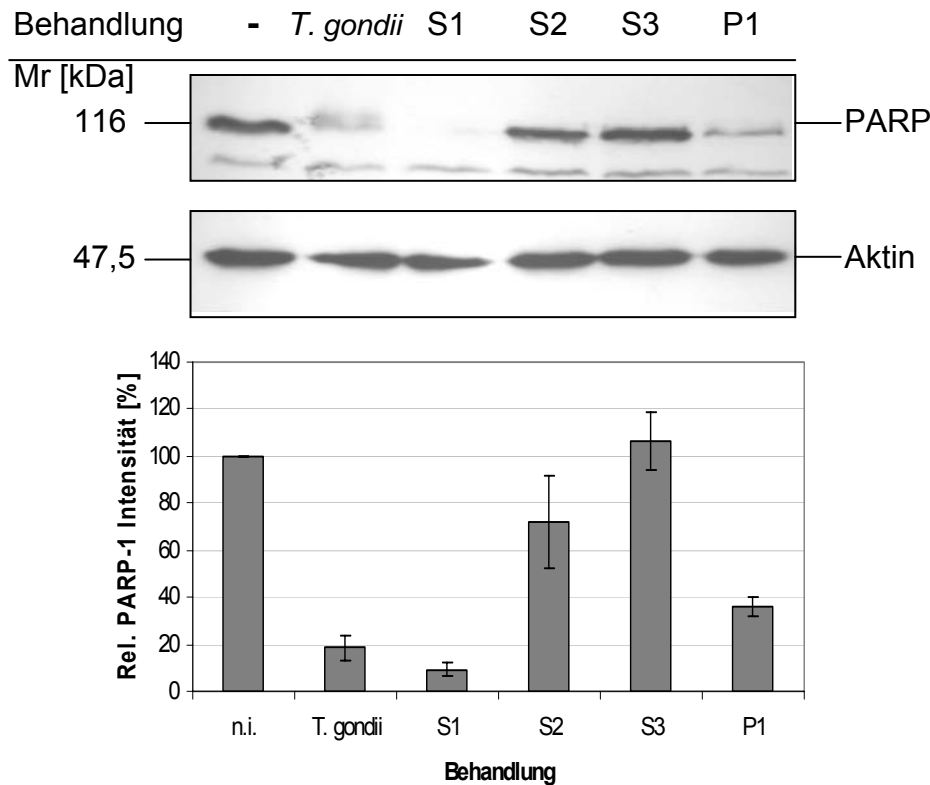


Abb. 16: Ein peripher assoziiertes Membranprotein von *T. gondii* ist an der Hemmung von PARP-1 beteiligt.

Eine PBS-unlösliche Fraktion von *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE wurde durch Inkubation in unterschiedlichen Puffern sequentiell fraktioniert. S1-Fraktion: peripher-assoziierte Membranproteine, die mittels eines Natriumcarbonatpuffers, pH 11, isoliert wurden; S2-Fraktion: durch Harnstoff aus der Membran lösbare Proteine und Proteinkomplexe; S3-Fraktion: hydrophobe integrale Membranproteine, die durch einen Triton X-100 haltigen Puffer gelöst wurden; P1-Fraktion: Suspension des aus dem letzten Fraktionierungsschritt resultierenden Pellets. Je 50 μ l pro Fraktion wurde jeweils 1 h mit RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen inkubiert. Als Kontrolle dienen RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen, die mit *T. gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 infiziert wurden oder nicht-infiziert blieben. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin \times 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

Zur weiteren Charakterisierung möglicherweise beteiligter Proteine wurden ein PBS-löslicher Parasitenextrakt und die Fraktionen S1 bis S3 durch SDS-PAGE analysiert. Nach anschließender Silberfärbung wurde in der S1-Fraktion eine deutliche Doppelbande von etwa 30 kDa nachgewiesen, die weder im PBS-löslichen *T. gondii*-Lysat noch in den S2- und S3-Fractionen vorhanden waren, welche im Gegensatz zu

S1 keinen deutlichen Einfluss auf den PARP-1-Proteinlevel der Wirtszellen besaßen (Abb. 17). Da *T. gondii* mit SAG1, einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Hauptoberflächenprotein ein Molekül ähnlicher Größe aufweist (p30), sollte nachfolgend überprüft werden, ob SAG1 an der Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* beteiligt sein könnte. SAG1 ist an der Wirtszellinvasion beteiligt (GRIMWOOD und SMITH, 1992; MINEO und KASPER, 1994) und verursacht starke Immunantworten des Wirtes (CHARDES *et al.*, 1990; CHARDES *et al.*, 1993; SENG *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob möglicherweise SAG1 die PARP-1-Inhibierung vermittelt, wurde eine SAG1-defiziente Parasitenmutante (Δ SAG1) verwendet und als Kontrolle deren parentaler Stamm verwendet (freundlicherweise von S. Tomavo, Lille, Frankreich, zur Verfügung gestellt).

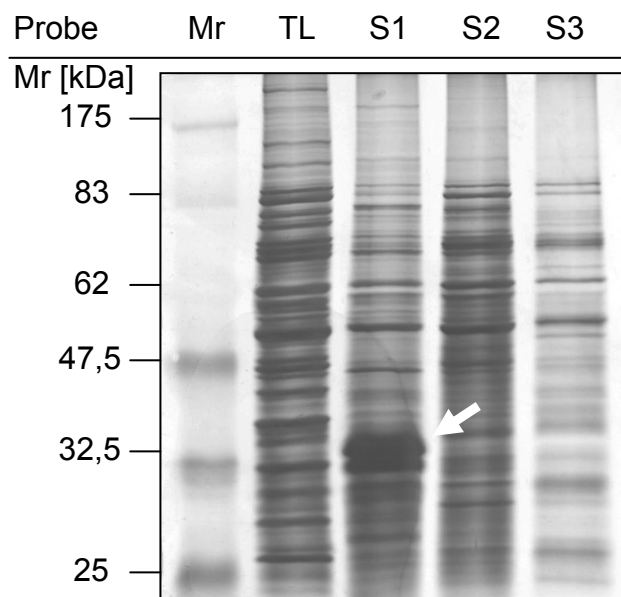


Abb. 17: Elektrophoretische Analyse der Membranfraktionen S1 bis S3 von *T. gondii* mittels SDS-PAGE.

Eine PBS-unlösliche Fraktion von *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE wurde durch Inkubation in unterschiedlichen Puffern sequentiell fraktioniert. S1-Fraktion: peripher-assoziierte Membranproteine, die mittels eines Natriumcarbonatpuffers, pH 11, isoliert wurden; S2-Fraktion: durch Harnstoff aus der Membran lösliche Proteine und Proteinkomplexe; S3-Fraktion: hydrophobe integrale Membranproteine, die durch einen Triton X-100 haltigen Puffer gelöst wurden. Die Membranfraktionen sowie ein PBS-lösliches *T. gondii*-Lysat (TL; 50 μ g) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Gesamtproteinprofil der Proben durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Der weiße Pfeil hebt eine auffällige Doppelbande von etwa 30 kDa hervor, die in S1, nicht aber in den anderen Proben nachweisbar war. Mr: Molekulargewichtsmarker;

Dazu wurde zunächst der SAG1-Gehalt von Mutante und Wildtyp mittels Immunoblot überprüft. Im Vergleich zum parentalen P-Stamm war in der Δ SAG1 Mutante kein SAG1 nachweisbar, während Katalase von beiden Stämmen gleichermaßen exprimiert wurde (Abb. 18A).

Nach dem Nachweis der SAG1-Defizienz wurden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen nun für 1 h mit Tachyzoiten der *T. gondii* Stämme NTE, P und Δ SAG1 infiziert und anschließend Gesamtproteinextrakte durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Parasiten der NTE- und P-Stämme reduzierten den PARP-1-Proteinlevel in Wirtszellen um durchschnittlich ca. 50% (Abb. 18B). Interessanterweise führte auch die Infektion mit der Δ SAG1 Mutante zu einer Abnahme des PARP-1 Proteingehaltes in der Wirtszelle um etwa 50% (Abb. 18B).

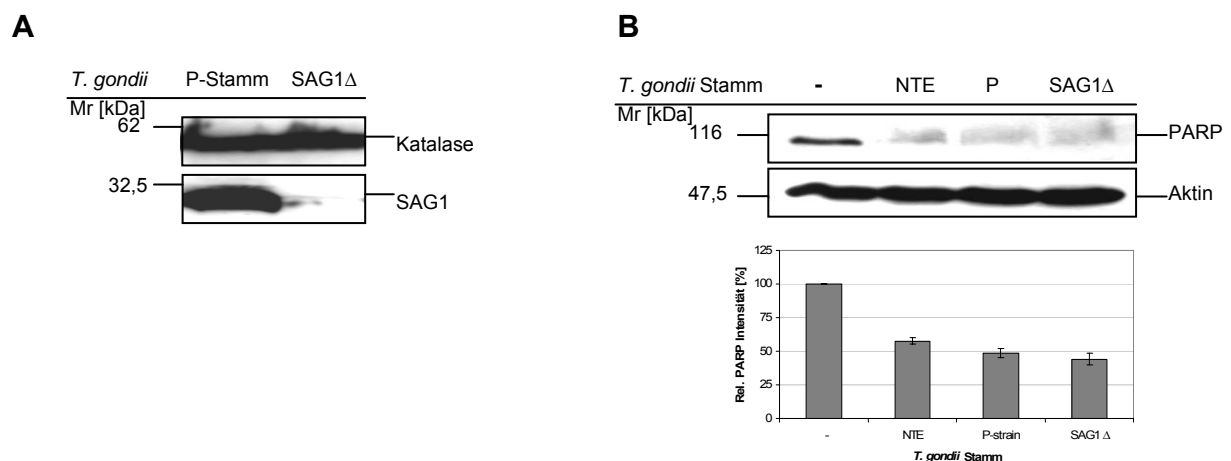


Abb. 18: SAG-1 von *T. gondii* ist nicht an der Inhibierung der Expression von PARP-1 beteiligt.

(A) 1×10^8 Tachyzoiten der SAG1-defizienten Mutante (Δ SAG1) bzw. der parentalen Parasiten des P-Stammes wurden lysiert, Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran übertragen. Katalase und SAG1 wurden durch entsprechende Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Mr: Molekulargewichtsmarker **(B)** RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurden im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten der *T. gondii* Stämme NTE und P sowie mit der SAG1-defizienten Mutante (Δ SAG1) für 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden durch entsprechende Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin \times 100). Die PARP-Intensität der nicht-infizierten Kontrolle wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker

Alle drei Stämme zeigten demnach vergleichbare Effekte auf PARP-1. SAG1 konnte daher als Verursacher der PARP-1-Inhibierung ausgeschlossen werden. Welches Molekül in der S1-Fraktion von *T. gondii* für die PARP-1-Inhibierung verantwortlich war, ist daher zurzeit ungeklärt.

3.7 PARP-1-Überexpression in RAW 264.7 Monocyten/

Makrophagen

PARP-1 hat Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse, wie DNA Reparatur, Apoptose, Nekrose, transkriptionelle Regulation und andere. Gleichzeitig ist *T. gondii* in der Lage, einige dieser Prozesse zu modulieren bzw. sie zu inhibieren. Aufgrund der Reduktion der PARP-1-Proteinlevel nach Infektion mit *T. gondii* stellte sich daher die Frage, wie sich eine Überexpression von PARP-1 in RAW 264.7 Zellen auf das Parasit-Wirt-Verhältnis auswirken würde. Für die Herstellung von PARP-1-überexprimierenden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen wurde das murine PARP-1 Gen aus RAW 264.7 Zellen amplifiziert, in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor kloniert und damit RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen stabil transfiziert. Nach Isolierung von einzelnen Klonen wurden diese auf das Vorhandensein der zusätzlichen PARP-1 Genkopie im Genom mit spezifischen Primern mittels PCR überprüft. Die zusätzliche PARP-1 Genkopie war im Genom von mehreren Klonen, u.a. den drei Klonen A12, C6 und E6, nachweisbar (Abb. 19A). Bei diesen drei Klonen waren auch Transkripte der zusätzlichen PARP-1 Kopie sowie endogene plus rekombinante PARP-1 Transkripte durch RT-PCR nachweisbar (Abb. 19B). Als Kontrolle der RT-PCR-Analyse diente das Housekeeping-Gen β -Aktin (Abb. 19B). Bei A12, C6 und E6 handelte es sich dabei um Klone, die mit einer PARP-1 Kopie transfiziert worden waren, die das STOP-Codon des PARP-Genes enthielt, so dass das später exprimierte Protein kein His-Tag oder V5-Epitop besaß. Des Weiteren sollten mittels eines anderen 3'Primers (3'PARP), der kein Stop-Codon des PARP-1 Gens enthielt, weitere Klone mit einer PARP-1 Kopie hergestellt werden, bei denen das später exprimierte Fusionsprotein sowohl ein Penta-His-Tag als auch ein V5-Epitop als Erkennungssequenz besitzen

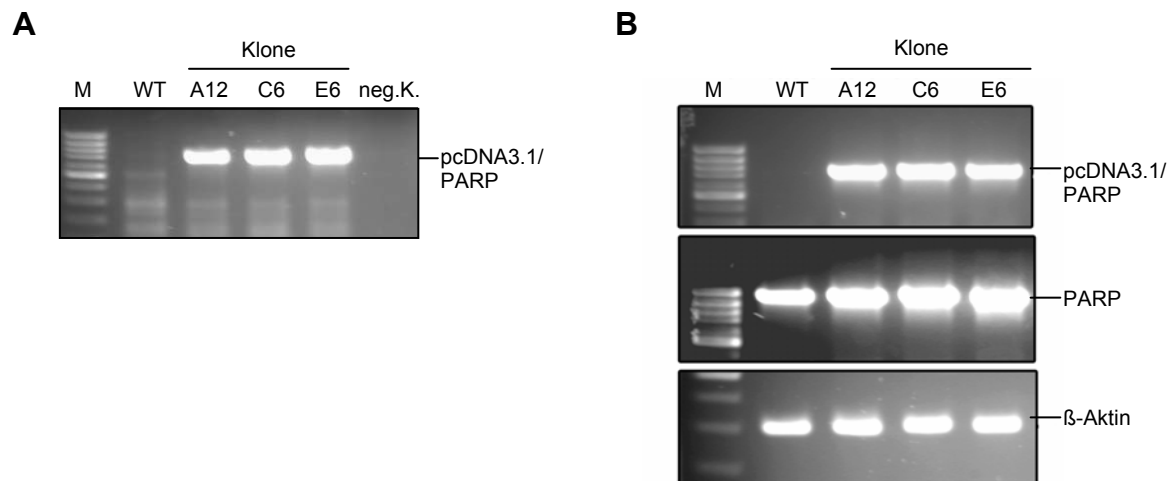


Abb. 19: Nachweis einer zusätzlichen PARP-1-Kopie in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen.

(A) Aus drei PARP-1 transfizierten RAW 264.7 Klonen und Wildtyp Zellen (WT) wurde genomische DNA isoliert. Anschließend wurde die zusätzliche Genkopie mittels PCR und PARP-1/Vektor (pcDNA3.1)-spezifischen Primern in einem 1% Agarosegel nachgewiesen. M: 1kb DNA Marker; neg.K.: Negativkontrolle **(B)** Aus den drei PARP-1 transfizierten RAW 264.7 Klonen und Wildtyp-Zellen (WT) wurde RNA isoliert und mRNA revers transkribiert. Mit der resultierenden cDNA wurden mit PARP-1- und Vektor-spezifischen (pcDNA3.1/PARP), PARP-1- und β -Aktin-spezifischen Primer Paaren PCRs durchgeführt und anschließend in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. M: 1 kb DNA Marker (pcDNA3.1/PARP-Amplifikation) bzw. 100 bp DNA Marker (PARP- bzw. β -Aktin-Amplifikation)

würde. Bei den zuletzt genannten Klonen war zwar ein Nachweis auf genomischer Ebene möglich, allerdings konnte weder auf mRNA-Ebene eine Expression dieser zusätzlichen PARP-1 Kopie noch beim Gesamtproteinextrakt die Überexpression auf Proteinebene mit dem PARP-1-, dem V5- oder His-Tag-Antikörper nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Durch Auftrennung von Gesamtproteinextrakten der drei RAW 264.7-Klone A12, C6 und E6 sowie von Wildtyp-Zellen mittels SDS-PAGE und anschließendem PARP-1 Nachweis mittels Immunblot wurde die PARP-1 Expression auf Proteinebene nachgewiesen. Die drei Klone exprimierten PARP-1 im Vergleich zu Wildtypzellen deutlich stärker (Abb. 20A). Die Klone A12 und E6 zeigten eine Überexpression um mehr als 50%, während der Klon C6 sogar mehr als doppelt so viel PARP-1 exprimierte wie Wildtypzellen (Abb. 20A). Diese Ergebnisse konnten mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden (Abb. 20B). Mikroskopische Analysen ergaben dabei, dass die überwiegende Mehrzahl der Zellen der drei Klone A12, C6 und E6 im Zellkern mehr PARP-1 exprimierten als Wildtypzellen (Abb. 20B). Dies wies darauf hin, dass nicht nur einzelne Zellen der Klone PARP-1 verstärkt exprimierten, sondern auch die gesamten Populationen der transfizierten Zellen

einen erhöhten PARP-1-Gehalt im Zellkern aufwiesen. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen erfolgreich mit einer

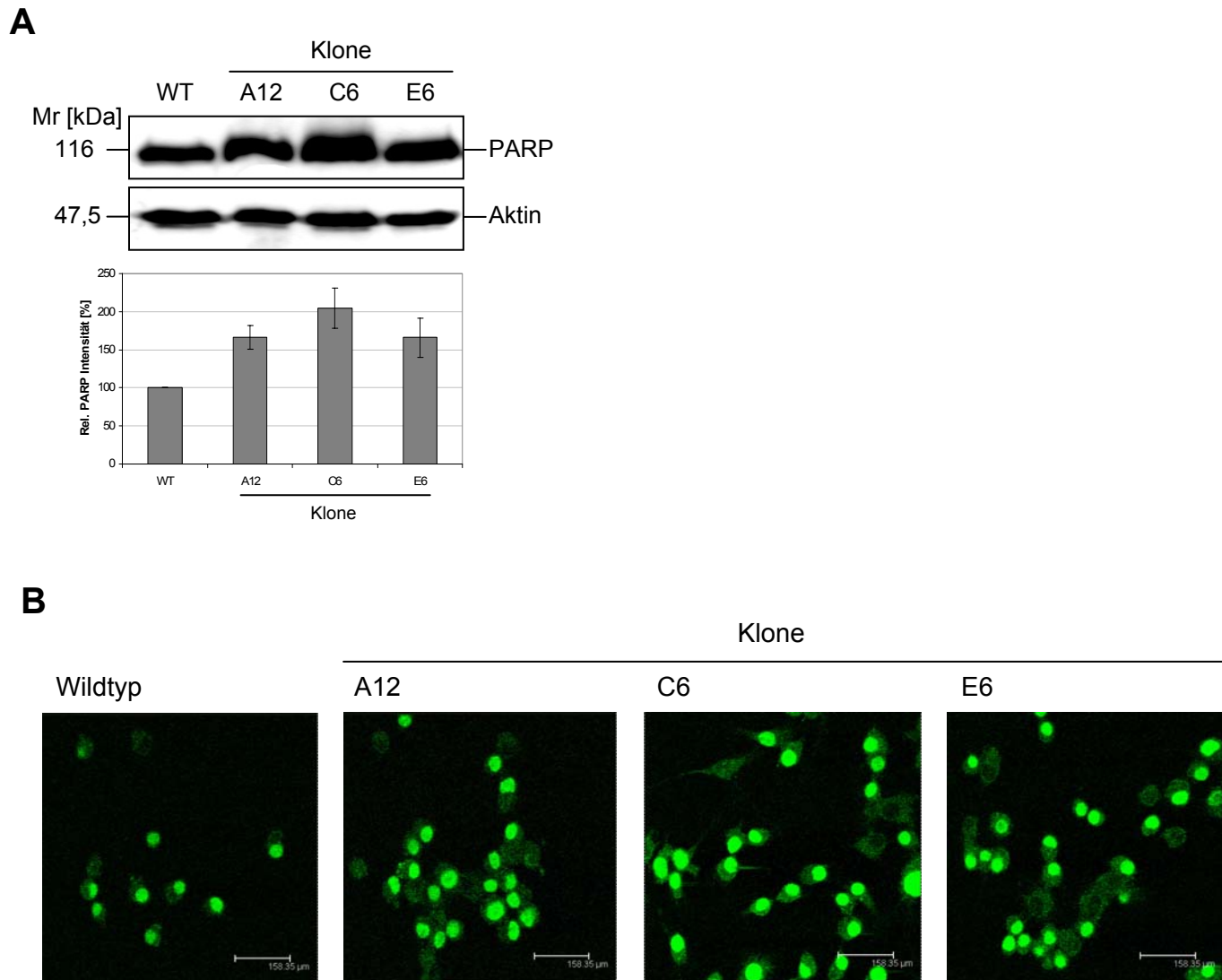


Abb. 20: Überexpression von PARP-1 in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen.

(A) Gesamtproteinextrakt aus drei Klonen PARP-1 transfizierter RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen oder deren Wildtypzellen (WT) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet ($\text{PARP}/\text{Aktin} \times 100$). Die PARP-Intensität der Wildtypzellen wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker **(B)** Drei Klone PARP-1 transfizierter RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen und Wildtypzellen (WT) wurden auf Glasdeckgläschen ausgesät und 24 h später wurde PARP-1 mittels eines spezifischen Primärantikörpers und Cy-2-konjugiertem Sekundärantikörper (grüne Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet.

zusätzlichen Kopie des murinen PARP-1 Gens transfiziert werden konnten und dies in einigen Klonen zur verstärkten Expression von PARP-1 im Vergleich zu Wildtypzellen führte.

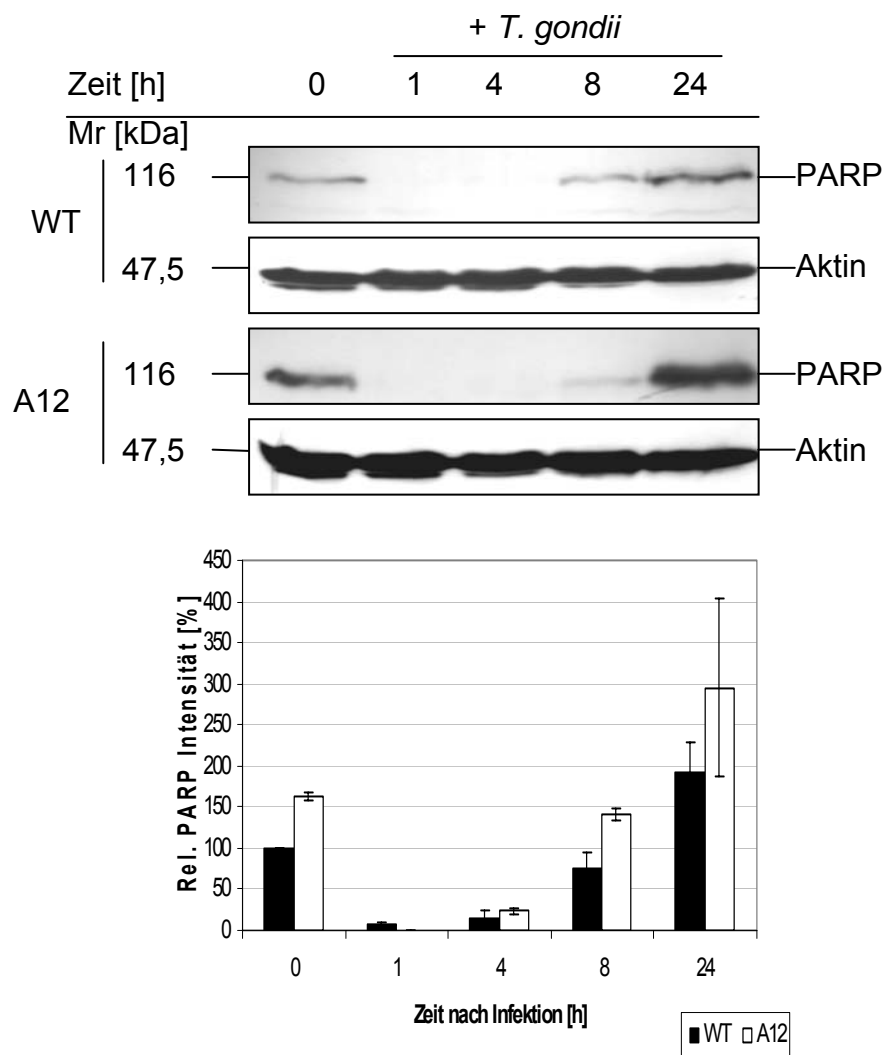


Abb. 21: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierender Mutante A12 nach *T. gondii*-Infektion.

PARP-1-überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (Klon A12: weiße Balken) und Wildtypzellen (WT: schwarze Balken) wurden mit frisch isolierten Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für unterschiedliche Zeiten infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der Western Blots dar, dazu wurden jeweils die relativen PARP-Intensitäten berechnet (PARP/Aktin x 100). Die PARP-Intensität der Wildtypzellen vor Infektion mit *T. gondii* wurde als 100% definiert und alle anderen Werte im Verhältnis dazu bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar. Mr: Molekulargewichtsmarker.

Um den Einfluss der Überexpression von PARP-1 auf die Parasit-Wirt-Interaktion während Infektionen mit *T. gondii* bewerten zu können, war es zunächst notwendig die PARP-1 Expression in stabil transfizierten RAW 264.7-Mutanten nach Infektion mit dem Parasiten zu untersuchen. Dazu wurden repräsentativ stabil transfizierte Zellen des Klonen A12 sowie RAW 264.7 Wildtypzellen mit *T. gondii* Tachyzoiten für unterschiedliche Zeiten infiziert. Gesamtproteinextrakte der Zellen wurden danach mittels SDS-PAGE und Western Blot auf ihren PARP-1 Proteingehalt überprüft. Bemerkenswerterweise führte *T. gondii* in transfizierten Zellen zu einer ähnlich starken Hemmung der PARP-1 Expression wie in Wildtypzellen (Abb. 21). Der Verlauf der PARP-1-Inhibierung in den Zellen des A12-Klonen durch *T. gondii* war dabei vergleichbar dem Verlauf der Hemmung in Wildtypzellen. So führte trotz der Überexpression von PARP-1 in nicht-infizierten Zellen des Klonen A12 die Infektion

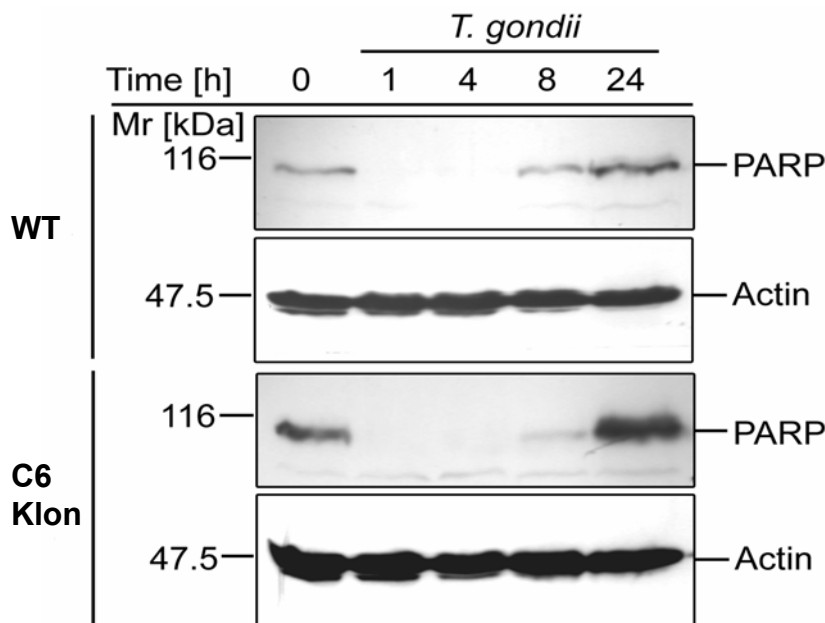


Abb. 22: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierender C6 Mutante nach *T. gondii*-Infektion.

PARP-1-überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (Klon C6) und Wildtypzellen (WT) wurden mit frisch isolierten Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 für unterschiedliche Zeiten infiziert oder blieben nicht-infiziert. Gesamtproteinextrakte der Wirtszellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. PARP-1 und Aktin wurden mittels entsprechender Primärantikörper und Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper durch „enhanced chemiluminescence“ sichtbar gemacht. Mr: Molekulargewichtsmarker.

Hemmung auf weniger als 20% des Wertes nicht-infizierter Kontrollzellen (Abb. 21). Nach 8 h Infektion stieg die PARP-1 Expression sowohl beim Wildtyp und als auch beim A12-Klon an, lag jedoch bei beiden unterhalb der PARP-1 Menge der nicht-infizierten Zellen. Nach 24 h Infektionszeit waren die PARP-1 Proteingehalte in beiden Zellpopulationen höher als die nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 21). Trotz Überexpression war *T. gondii* demnach in der Lage, PARP-1 sehr effektiv und transient in transfizierten Zellen zu hemmen. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die beiden anderen Klone C6 (Abb. 22) und E6 (nicht gezeigt) beobachtet

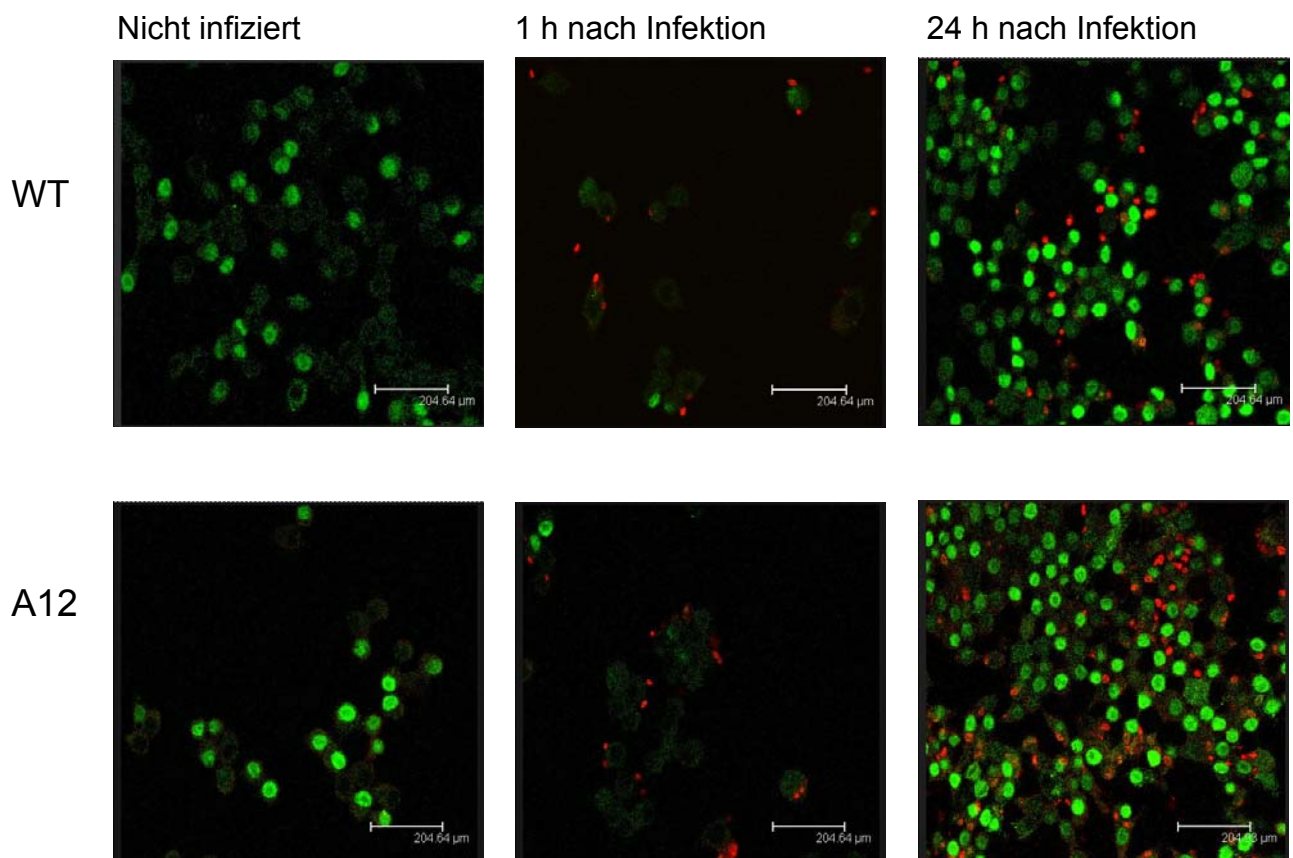


Abb. 23: Vergleich der PARP-1 Expression zwischen Wildtyp und PARP-1-überexprimierenden Mutanten nach *T. gondii*-Infektion mittels Immunfluoreszenzfärbung.

PARP-1-überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (Klon A12) oder deren Wildtypzellen (WT) wurden 1 oder 24 h im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten des NTE Stammes von *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert. Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden PARP-1 und *T. gondii* Tachyzoiten mittels spezifischer Primärantikörper und Cy-2-konjugiertem (PARP-1: grüne Fluoreszenz) oder Cy-3-konjugiertem (*T. gondii*: rote Fluoreszenz) Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet.

werden. Diese Ergebnisse wurden auf Einzelzellebene mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt und erweitert (Abb. 23). So führte *T. gondii* in Zellen des mit PARP-1 transfizierten Klons A12 1 h nach Infektion nicht nur in parasit-positiven sondern auch in parasit-negativen Zellen zu einem stark reduzierten PARP-1 Gehalt. Wie bereits an Wildtypzellen gezeigt, kam es dabei nicht zu einer Umverteilung von PARP-1 aus dem Zellkern in andere Zellkompartimente. Dies konnte auch für die anderen PARP-1-transfizierten Klone C6 und E6 nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). *T. gondii* war demnach in der Lage, die deutlich erhöhten PARP-1-Proteinlevel der PARP-1-transfizierten Klone schnell, aber transient zu reduzieren.

3.8 Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf das Parasit-Wirt-Verhältnis

3.8.1 Invasion und Replikation von *T. gondii* in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten

Obwohl die Infektion mit *T. gondii* die PARP-1 Expression auch in überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten schnell und effektiv hemmte, wiesen diese dennoch vor Infektion und während späterer Infektionszeitpunkte deutlich mehr PARP-1 auf als Wildtypzellen. Die Mutanten wurden daher nachfolgend dazu eingesetzt, um den Einfluss von PARP-1 und dessen Modulation durch *T. gondii* auf die Parasit-Wirt-Interaktion zu untersuchen. Dazu wurde zunächst ermittelt, ob es Unterschiede im Invasions- und Replikationsverhalten des Parasiten in Abhängigkeit von einer PARP-1 Überexpression gab. Dazu wurden PARP-1 überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen und Wildtypzellen mit transgenen *T. gondii* RH/HXGPRT/Sag1/lacZ Tachyzoiten infiziert, die als Reporter mit bakteriellem lacZ unter der Kontrolle des SAG1-Promotors transfiziert waren (SEEBER und BOOTHROYD, 1996). Die Expression der β -Galaktosidase wurde 24 und 45 h nach Infektion durch Farbreaktion sichtbar gemacht und photometrisch gemessen und war ein Maß für die Anzahl intrazellulärer Parasiten. Während in nicht-infizierten RAW 264.7-Zellen wie erwartet nur eine geringe Hintergrundfärbung gemessen wurde, stieg die

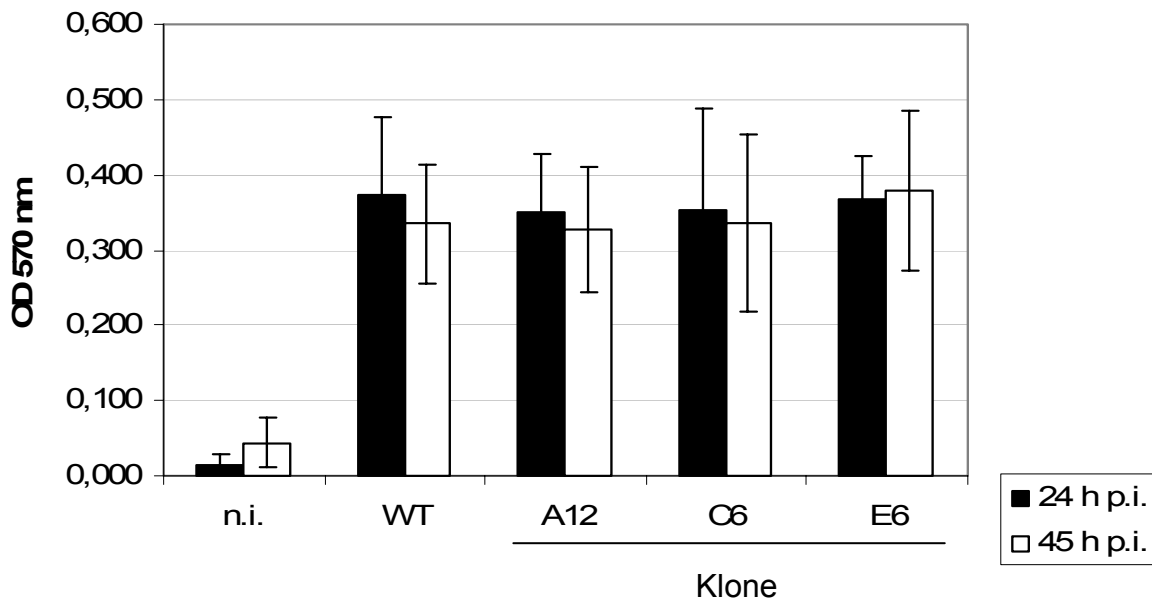


Abb. 24: Entwicklung von *T. gondii* in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten.

Die PARP-1-überexprimierenden RAW 264.7-Mutanten A12, C6 und E6 sowie Wildtypzellen wurden mit β -Galaktosidase-exprimierenden *T. gondii* Tachyzoiten RH/HXGPRT/Sag1/lacZ für 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert (n.i.). Anschließend wurden extrazelluläre Parasiten entfernt und 24 h (schwarze Balken) bzw. 45 h (weiße Balken) nach Infektion die β -Galaktosidaseaktivität nach Zugabe von Chlorphenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG) durch Farbreaktion photometrisch bei 570 nm gemessen. Die Balken des Graphen repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes.

β -Galaktosidaseaktivität 24 und 45 h nach Infektion deutlich an (Abb. 24). Die Enzymaktivität unterschied sich dabei jedoch nicht zwischen *T. gondii*-infizierten Wildtypzellen einerseits und Zellen der PARP-1-überexprimierenden RAW-Mutanten A12, C6 und E6 andererseits (Abb. 24). Dabei ist zu beachten, dass die Farbreaktion nach 24 und 45 h Infektionsdauer bei Erreichen eines ähnlichen Farbumschlages abgestoppt wurde, so dass die photometrische Messung nicht der Zunahme der Parasitenzahl von 24 bis 45 h p.i. entsprach. Diese Ergebnisse wiesen deutlich darauf hin, dass sich *T. gondii* unabhängig von einer Überexpression von PARP-1 in Wildtypzellen und PARP-1-Mutanten ähnlich gut entwickeln konnte. Der β -Galaktosidase-Test erlaubte quantitative Aussagen über die Entwicklung von *T. gondii* auf Populationsebene, er erlaubte jedoch keine Aussage über mögliche Unterschiede hinsichtlich Wirtszellinvasion und intrazellulärer Replikation von *T. gondii* in Wildtypzellen oder PARP-1-überexprimierenden Mutanten.

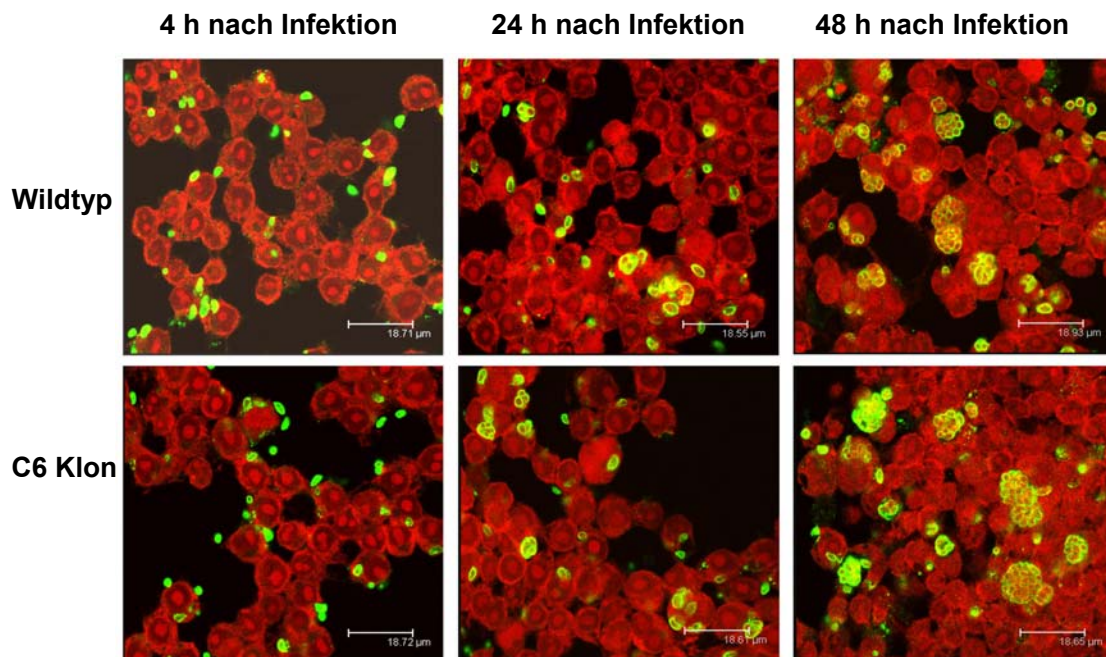


Abb. 25: Einfluss einer PARP-1 Überexpression in Wirtszellen auf Invasion und Replikation von *T. gondii*.

PARP-1 überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen (C6 Klon) oder deren Wildtypzellen (WT) wurden für 4h, 24 h und 48 h mit *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes NTE im Parasit-Wirt-Verhältnis 4:1 infiziert. Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden *T. gondii* Tachyzoiten mittels eines spezifischen Primärantikörpers und Cy-2-konjugiertem Sekundärantikörper (grüne Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Doppelsträngige Nucleinsäuren wurden mit Propidiumiodid angefärbt (rote Fluoreszenz). Die Proben wurden mikroskopisch mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop ausgewertet.

Daher wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung das Invasions- und Replikationsverhalten von *T. gondii* in Wildtypzellen und PARP-1-überexprimierenden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen auf Einzelzellebene untersucht. Nach 4 h Infektion waren vergleichbar viele Zellen des Wildtyps und des C6-Klons mit *T. gondii* des Stammes NTE infiziert, was auf eine ähnliche Invasionsrate schließen ließ (Abb. 25). Nach 24 und 48 h Infektionszeit enthielten außerdem die parasitophoren Vakuolen ähnliche Mengen an Parasiten (Abb. 25). Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit den beiden PARP-1-überexprimierenden RAW 264.7-Klonen A12 und E6 erzielt (nicht gezeigte Ergebnisse). Dies bestätigte die Ergebnisse des β -Galaktosidase Tests hinsichtlich der Entwicklung der Parasiten und zeigte, dass zumindest eine zeitweise Überexpression von PARP-1 keinen Einfluss auf die Wirtszellinvasion und die intrazelluläre Entwicklung von *T. gondii* in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen besaß.

3.8.2 Einfluss der PARP-1 Überexpression auf die Koaktivatorfunktion von PARP bei NF- κ B-vermittelter Genexpression

Wie bereits beschrieben, ist *T. gondii* in der Lage, in den NF- κ B-Signalweg der Wirtszelle einzugreifen, wodurch unter anderem die Expression von TNF- α , IL-12, IL-6 und iNOS herunterreguliert wird (DENKERS, 2003). PARP-1 ist als Koaktivator von NF- κ B bekannt und hat so Einfluss auf die NF- κ B-abhängige Genregulation. Experimente mit PARP-1^{-/-} Mäusen belegen einen PARP-1 abhängigen Einfluss auf einige NF- κ B-abhängige Gene wie iNOS und TNF- α . Eine hohe PARP-1 Expression führt zudem zu einer dysregulierenden NF- κ B-Aktivität (HASSA und HOTTIGER, 2002). Es ist außerdem bekannt, dass PARP-1 die Expression von NF- κ B-regulierten Genen nach LPS-Stimulierung verstärkt. Zu diesen NF- κ B-regulierten Genen gehören neben anderen das Intercellular adhesion molecule(ICAM)-1, TNF- α , iNOS, MIP-2 (HA *et al.*, 2002; HASSA und HOTTIGER, 2002; LIAUDET *et al.*, 2002) und Insulin-like Growth Factor-binding protein(IGFBP)-4 (SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 2000). Diese Gene sollten nun in RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen, die mit PARP-1 transfiziert worden waren, hinsichtlich ihrer Expression nach LPS Stimulierung und/oder nach *T. gondii*-Infektion untersucht und mit RAW 264.7 Wildtyp Zellen verglichen werden. Dazu wurden Wildtyp-Zellen und stellvertretend für alle Transfektanten Zellen des Klones C6 mit LPS (1 μ g/ml) für 4 h stimuliert oder unstimuliert belassen und 1 h mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert oder nicht-infiziert belassen. Im Anschluß wurde RNA isoliert und mRNA revers transkribiert. Die resultierende cDNA wurde mit spezifischen Primern für TNF- α , MIP-2, ICAM-1 und IGFBP-4 durch RealTime-PCR amplifiziert. Um unterschiedliche Effizientien bei der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese oder Pipettierunterschiede auszugleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Amplifikation des Housekeeping-Gens Aktin normiert. Nach Stimulierung mit LPS nahmen die TNF- α -Transkriptmengen sowohl in Wildtypzellen als auch in Zellen des PARP-1 überexprimierenden Klons C6 um durchschnittlich das 75-fache im Vergleich zu den nicht-stimulierten, nicht-infizierten Kontrollen zu. Wurden die Zellen nun mit LPS vorstimuliert und anschließend mit *T. gondii* infiziert, stieg der TNF- α -mRNA-Level nur durchschnittlich um das 25-fache sowohl in Wildtypzellen als auch in Zellen des Klons C6 im Verhältnis zur Kontrolle (Abb. 26A). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die TNF- α Transkriptlevel unabhängig von einer Überexpression von PARP-1 in Wildtypzellen

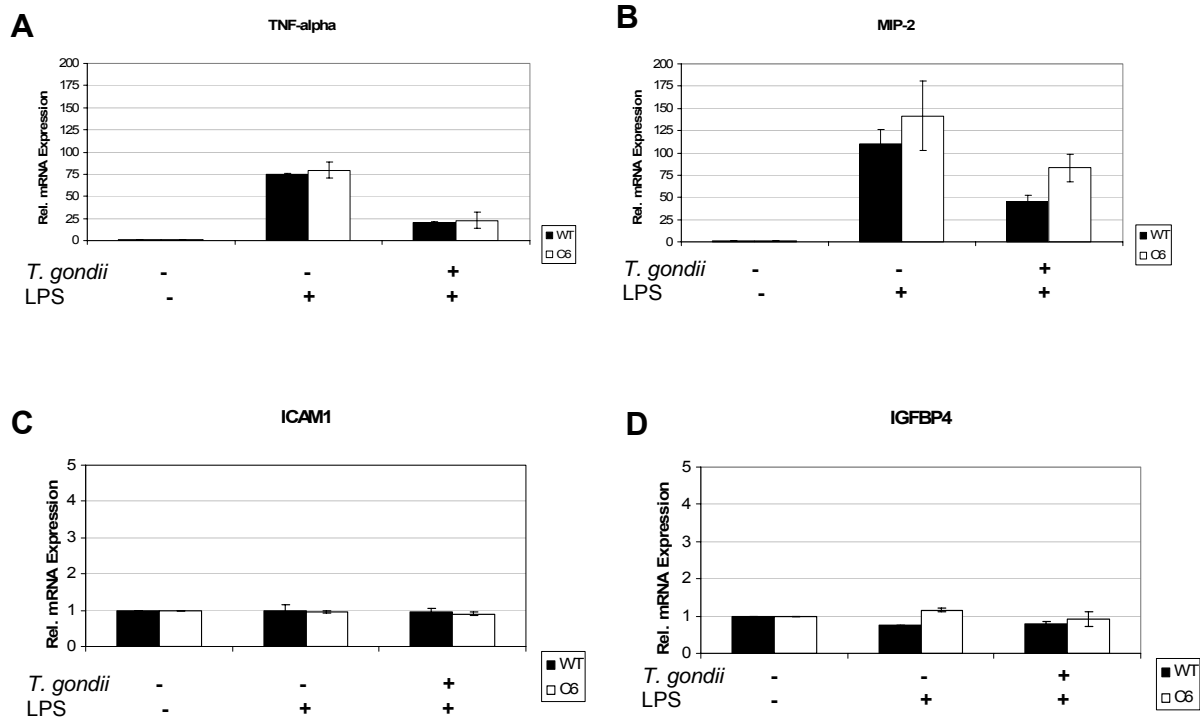


Abb. 26: Expressionsprofile NF- κ B-regulierter Gene.

(A), (B), (C) und (D) RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen Wildtypzellen (schwarze Säulen) und mit PARP-1 transfizierte Zellen des Klonen C6 (weiße Säulen) wurden 4 h mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert und wurden im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 mit Tachyzoiten des *T. gondii* Stammes NTE für 1 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und eine RealTime PCR Analyse wurde mit TNF- α - (A), MIP-2- (B), ICAM-1- (C), oder IGFBP4- (D), sowie mit β -Aktin-spezifischen Primern und dem MasterPlus SYBR Green 1 Kit durchgeführt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwertes dar.

und im Klon C6 durch LPS deutlich hochreguliert wurden, während eine Infektion mit *T. gondii* diesen Anstieg stark hemmte.

Auch die MIP-2 Transkriptlevel stiegen nach Stimulierung mit LPS stark an. Interessanterweise war dabei die Hochregulation in PARP-1 überexprimierenden C6-Zellen höher als in Wildtypzellen im Vergleich zu den jeweiligen nicht-stimulierten, nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 26B). Nach LPS-Stimulierung und Infektion mit *T. gondii* wiesen C6-Zellen ebenfalls deutlich höhere MIP-2 mRNA-Level auf als Wildtypzellen, wobei in beiden Zellklonen nach Infektion die LPS-induzierten Transkriptmengen niedriger waren als in nicht-infizierten, aber LPS-stimulierten Kontrollen (Abb. 26B). Die Stimulierung mit LPS führte also in Zellen des PARP-1-transfizierten C6 Klonen unabhängig von einer *Toxoplasma*-Infektion zu deutlich höheren MIP-2 mRNA-Leveln verglichen mit den Wildtypzellen. Allerdings war *T. gondii* nicht in der Lage, MIP-2 mRNA in PARP-1 überexprimierenden Zellen auf den

gleichen Level wie in Wildtypzellen zu senken. Dem gegenüber waren in Bezug auf die NF- κ B-regulierten Gene ICAM-1 und IGFBP-4 keine Unterschiede hinsichtlich der Transkriptmengen zwischen Wildtypzellen und PARP-1 überexprimierenden Zellen festzustellen (Abb. 26C und D). Dabei führte weder die Stimulierung mit LPS noch eine gleichzeitige Infektion mit *T. gondii* zu veränderten Transkriptmengen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 26C und D). Zusammenfassend wurde die LPS-induzierte Expression von 2 NF- κ B-regulierten Genen, nämlich TNF- α und MIP-2, durch eine *T. gondii*-Infektion deutlich reduziert, wobei eine Überexpression von PARP-1 zu einer verstärkten Expression von MIP-2 führt. Dagegen waren bei zwei anderen NF- κ B-regulierten Genen, nämlich ICAM-1 und IGFBP-4, weder durch eine PARP-1 Überexpression noch durch eine *T. gondii*-Infektion Veränderungen der Transkriptlevel nachweisbar.

3.8.3 Apoptose und deren Veränderung durch *T. gondii* in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Zellen

In Zellen, die zuvor mit einem Apoptose-Stimulus behandelt wurden, führt eine Infektion mit *T. gondii* zu einer deutlichen Inhibierung der Apoptose sowie zu einer Abnahme des PARP-1-Proteinlevels (GOEBEL *et al.*, 2001). Welchen Einfluss veränderte PARP-1-Level auf den Apoptose-inhibierenden Effekt von *T. gondii* hat, sollte mit PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen ermittelt werden. Dazu wurde zunächst die Caspase 3/7 Aktivität als wichtiges Zeichen von apoptotischen Zellen gemessen. PARP-1 überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen und Wildtypzellen wurden mit *Toxoplasma* Tachyzoiten für 4, 11 (nicht gezeigt) oder 24 h infiziert oder blieben nicht-infiziert. Jeweils 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurde Staurosporin, ein Apoptose-Stimulans, zu den Zellen gegeben, oder die Zellen blieben unstimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und im Zellextrakt die Spaltung des Caspase 3/7 spezifischen Substrates DEVD-AMC photometrisch gemessen. In nicht-infizierten Wildtypzellen nahm die Caspase 3/7 Aktivität nach Stimulierung der Apoptose mit Staurosporin sowohl nach 4 h als auch nach 24 h stark zu (Abb. 27).

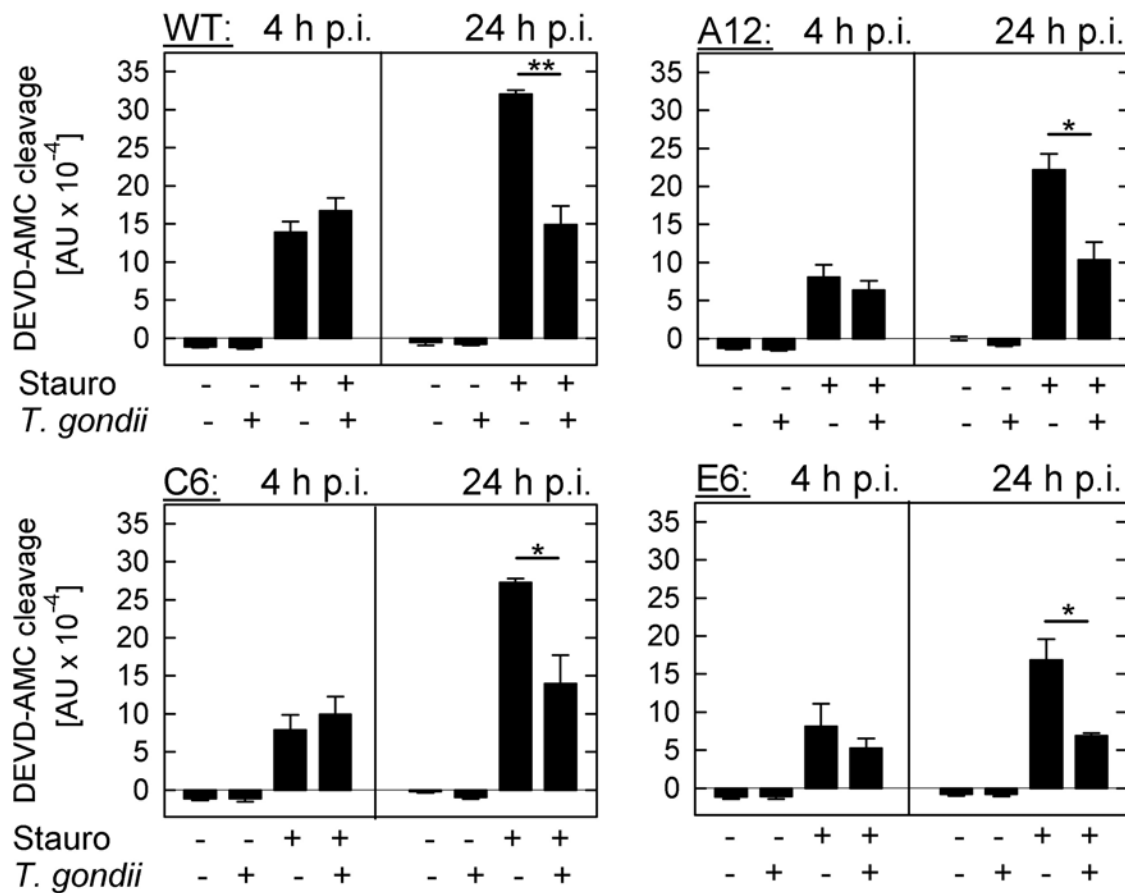


Abb. 27: Zeitabhängige Inhibition der Caspase 3/7 Aktivität in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Klonen A12, C6 und E6 und Wildtypzellen nach *T. gondii*-Infektion.

PARP-1 überexprimierende Klone und Wildtypzellen wurden für 4 h oder 24 h mit *T. gondii* Tachyzoiten im Parasit-Wirt-Verhältnis von 4:1 infiziert oder blieben nicht-infiziert. 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen mit 1 μ M des Apoptose-Induktors Staurosporin behandelt oder blieben unstimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und in den Zelllysaten wurde die Caspase 3/7 Aktivität mittels Spaltung von DEVD-AMC photometrisch bei 380/460 nm ermittelt. Die Balken des Graphen repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken den Standardfehler (\pm) des Mittelwerts. Signifikante Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen wurden mittels Student's t-Test ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Eine Infektion mit *T. gondii* für 4 h hatte keinen Einfluss auf die Staurosporin-vermittelte Wirtszellapoptose in Wildtypzellen. Dagegen war die Caspase 3/7-Aktivität 24 h p.i. in infizierten Zellen signifikant niedriger als in nicht-infizierten Kontrollen ($p < 0.01$) (Abb. 27). Interessanterweise war die Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung der PARP-überexprimierenden Klone A12, C6 und E6 mit Staurosporin niedriger als in Wildtypzellen. Nach Infektion der PARP-1-transfizierten Klone mit *T. gondii* für 4 h war die Caspase 3/7-Aktivität gegenüber nicht-infizierten Kontrollen wie in Wildtypzellen nicht deutlich verändert.

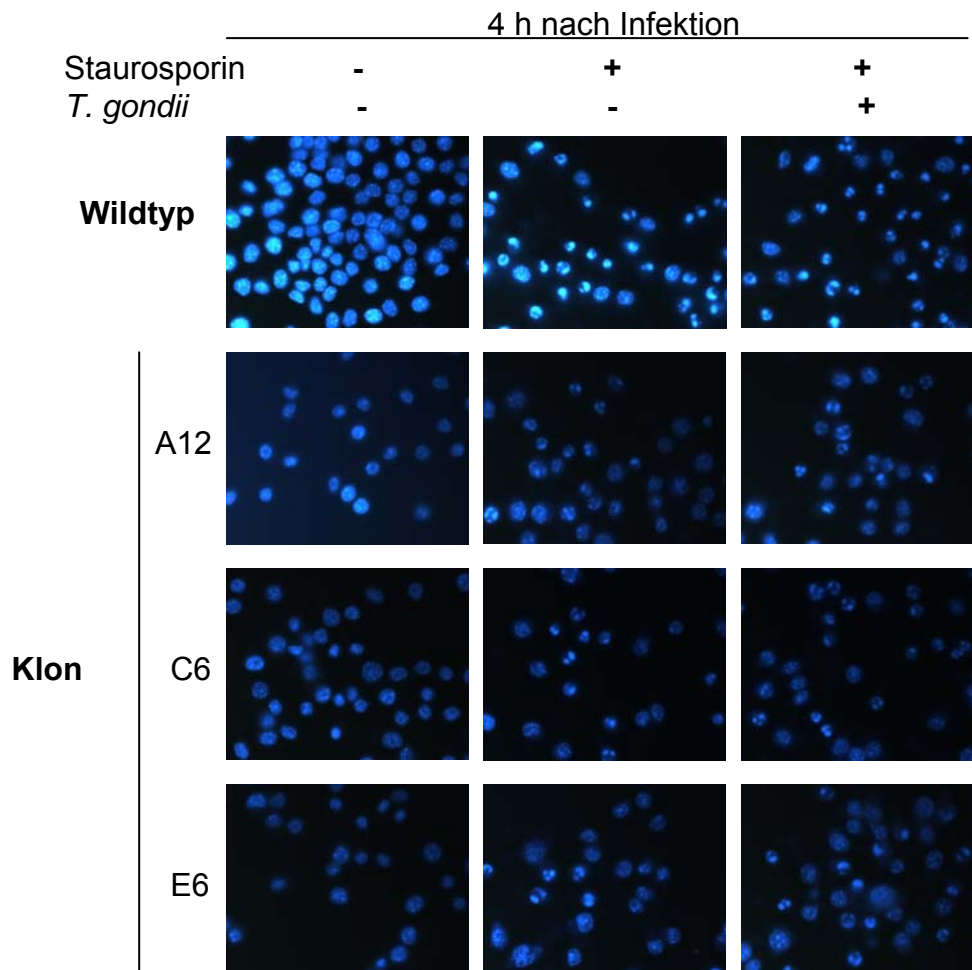


Abb. 28: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt Interaktion in apoptotischen Zellen 4 h nach Infektion mit *T. gondii*.

PARP-1 überexprimierende Klone A12, C6 und E6 und Wildtypzellen wurden für 4 h mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert oder blieben nicht-infiziert. 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen mit 1 μ M Staurosporin behandelt oder blieben unbehandelt. Mittels Höchst-Färbung wurden apoptotische Zellen anhand von kondensiertem Chromatin sichtbar gemacht.

Dagegen führte eine Infektion mit *Toxoplasma* für 24 h zu signifikant niedrigeren Caspase 3/7-Aktivitäten in PARP-1 überexprimierenden Zellen als in den entsprechenden nicht-infizierten Kontrollen ($p < 0.05$). Diese Ergebnisse sprachen eindeutig dagegen, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* den anti-apoptotischen Effekt des Parasiten vermittelte. Außerdem schien auch die PARP-1 Überexpression die durch den Parasiten verursachte Inhibierung der Apoptose nicht zu beeinflussen.

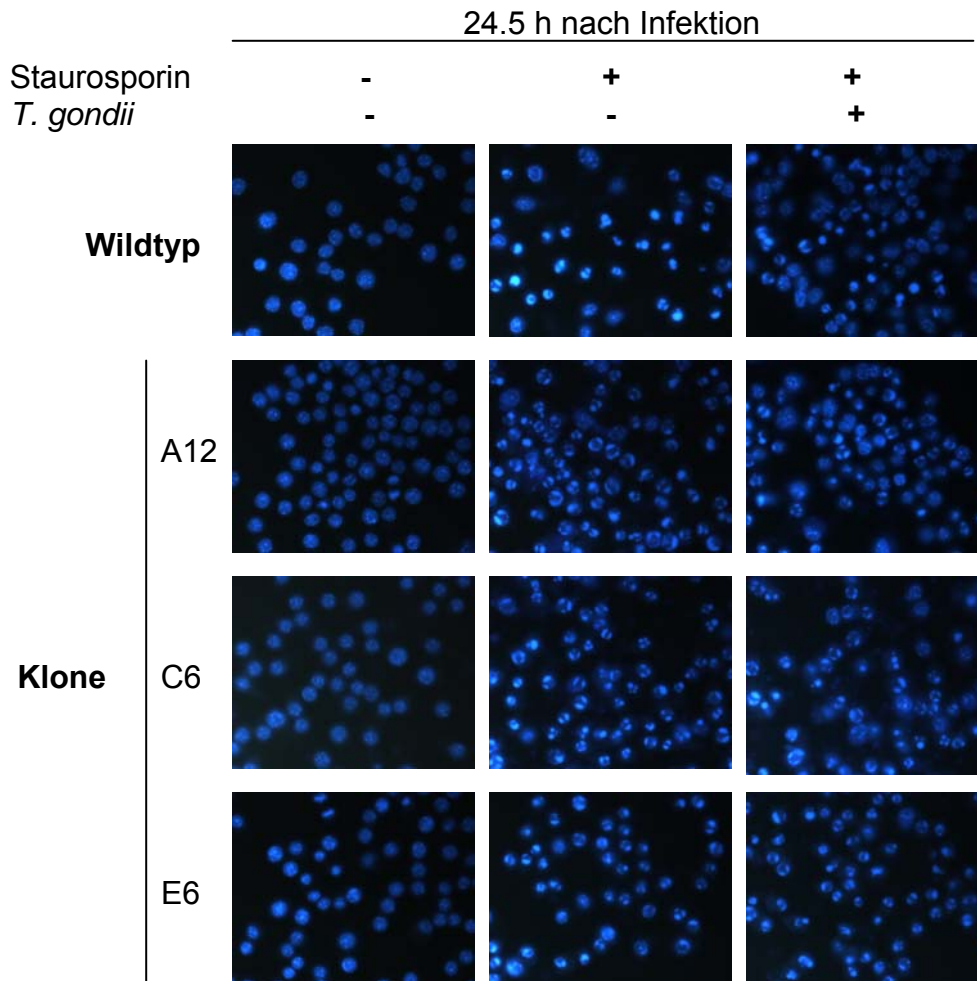


Abb. 29: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt Interaktion in apoptotischen Zellen 24.5 h nach Infektion mit *T. gondii*.

PARP-1 überexprimierende Klone A12, C6 und E6 und Wildtypzellen wurden für 24.5 h mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert oder blieben nicht-infiziert. 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen mit 1 μ M Staurosporin behandelt oder blieben unbehandelt. Mittels Höchst-Färbung wurden apoptotische Zellen anhand von kondensiertem Chromatin sichtbar gemacht.

Die Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf Apoptose und deren Veränderung durch *Toxoplasma* wurde zusätzlich auf Einzelzellebene mittels Höchst-Färbung untersucht. Dafür wurden PARP-1-überexprimierende Klone und Wildtypzellen mit *T. gondii* NTE Tachyzoiten für 4 h (Abb. 28), 11 h (nicht gezeigt) oder 24.5 h (Abb. 29) infiziert oder blieben nicht-infiziert. Jeweils 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurde Apoptose durch 1 μ M Staurosporin induziert, oder die Zellen blieben unbehandelt. Mittels Höchst-Farbstoff 33258 wurde die DNA angefärbt und die Proben anschließend mikroskopisch analysiert. Zur quantitativen Auswertung der Höchstfärbung wurden 500 Zellen gezählt und die Anzahl der apoptotischen Zellen anhand der Kondensation von Chromatin ermittelt (Abb. 30). In Wildtypzellen

kondensierte nach Inkubation der Zellen mit Staurosporin das Chromatin sehr deutlich (Abb. 28). Dabei wiesen 4 h p.i. sowohl infizierte, Staurosporin-behandelte als auch nicht-infizierte, behandelte Kulturen zu etwa 60% Zellen mit stark kondensiertem Chromatin auf (Abb. 30). Staurosporin führte in den PARP-1 überexprimierenden Zellen des Klones A12 zu ähnlichen Mengen von Zellen mit kondensiertem Chromatin wie in Wildtypzellen, und zwar unabhängig von einer *Toxoplasma*-Infektion (Abb. 28 & 30). Dagegen war in den Zellen der PARP-1 überexprimierenden Klone C6 und E6 nach Infektion mit *T. gondii* der Prozentsatz von Zellen mit kondensiertem Chromatin um durchschnittlich 17 bzw. 8% niedriger als in nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 30).

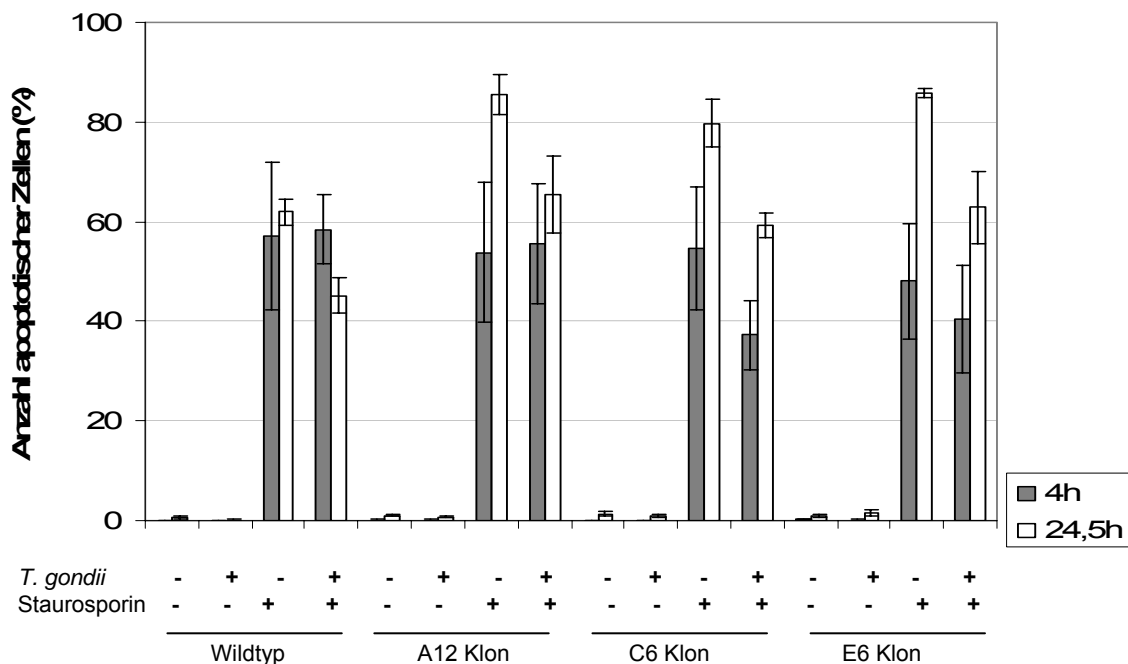


Abb. 30: Auswirkung der PARP-1 Überexpression auf die Parasit-Wirt Interaktion in apoptotischen Zellen.

PARP-1 überexprimierende Klone A12, C6 und E6 und Wildtypzellen wurden für 4 h (graue Balken) und 24.5 h (weiße Balken) mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert oder blieben nicht-infiziert. 3.5 h vor Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen mit 1 μ M Staurosporin behandelt oder blieben unbehandelt. Mittels Höchst-Färbung wurden apoptotische Zellen anhand von kondensiertem Chromatin sichtbar gemacht. Die quantitative Auswertung erfolgte durch das Auszählen von je 500 Zellen und der Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (\pm) des Mittelwerts dar.

Nach längerer Kulturdauer (24.5 h) waren vor allem die PARP-1 überexprimierenden Zellen deutlich anfälliger gegenüber einer Behandlung mit Staurosporin, da der Anteil von Zellen mit kondensiertem Chromatin deutlich höher war als nach 4 h Kulturdauer (Abb. 30). Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil apoptotischer Zellen in PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Zellen um etwa 20% höher als bei Wildtypzellen (Abb. 30). Eine Infektion mit *T. gondii* für 24.5 h führte sowohl bei Wildtypzellen als auch bei den Mutanten zur Hemmung der Staurosporin-induzierten Chromatinkondensation (Abb. 30). Dabei nahm die Anzahl der apoptotischen Zellen durch die Infektion mit *T. gondii* um etwa 17% - 20% ab (Abb. 29 & 30). Ähnlich führte auch in Wildtypzellen eine Infektion mit *T. gondii* für 24.5 h zu einer um durchschnittlich 17% verminderten Anzahl von Zellen mit kondensiertem Chromatin (Abb. 29 & 30). Grundsätzlich führte also die Überexpression von PARP-1 zu einer niedrigeren Caspase 3/7 Aktivität bzw. zu einer verminderten Apoptose-Anfälligkeit im Vergleich zu Wildtypzellen. Allerdings inhibierte *T. gondii* in PARP-1 überexprimierenden Zellen die Apoptose deutlich. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 in infizierten Wirtszellen nicht den anti-apoptotischen Effekt von *T. gondii* erklären konnte. Außerdem verhinderte die Überexpression von PARP-1 in den Mutanten nicht die *T. gondii*-induzierte Inhibierung der Apoptose.

4. Diskussion

PARP-1 spielt als nukleäres Protein eine wichtige Rolle in diversen zellulären Prozessen, wie Zellzyklus, DNA-Reparatur, Apoptose und Nekrose (HASSA *et al.*, 2006). Es ist daher nicht verwunderlich, dass PARP-1 bereits 1983 mit krankhaften Veränderungen in Verbindung gebracht wurde (ALTMANN, 1983). Mittlerweile ist bekannt, dass PARP-1 bei einer großen Anzahl von Erkrankungen, wie Asthma und entzündlichen Lungenerkrankungen (SZABO und DAWSON, 1998; LIAUDET *et al.*, 2002; BOULARES *et al.*, 2003; CUZZOCREA, 2005; VIRAG, 2005a), Arthritis (GONZALEZ-REY *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008), multiplem Organversagen (LIAUDET und ODDO, 2003; CUZZOCREA und WANG, 2005), Diabetes Typ-1 (PACHER und SZABO, 2005; SZABO, 2005), entzündlichen Darmerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn (MARKOWITZ *et al.*, 1988), septischem Schock (CUZZOCREA, 2005) und Krebs (CEPEDA *et al.*, 2006; PLUMMER, 2006; HORVATH und SZABO, 2007) involviert ist. Häufig zeigte sich eine pharmakologische Inhibierung der Expression von PARP-1 *in vitro* (GARCIA *et al.*, 2008), ein Knockout von PARP-1 im Mausmodell (BOULARES *et al.*, 2003; VIRAG, 2005a) oder eine pharmakologische Inhibierung in der Ratte (OBROSOVA *et al.*, 2004) als wirksamer Schutz gegen diese Krankheitsbilder. Gerade bei Krebs konnte die Forschung an pharmakologischen Inhibitoren von PARP-1 als Anti-Krebs Medikamente soweit vorangetrieben werden, dass bereits frühe klinische Studien an Krebspatienten durchgeführt werden (CEPEDA *et al.*, 2006; PLUMMER, 2006; HORVATH und SZABO, 2007). Neben diesen Erkrankungen wird bei HIV-1, dem Epstein-Barr-Virus, *Chlamydiaceae* und Malaria der PARP-1-Gehalt im Wirt bzw. in Wirtszellen mit unterschiedlichen Verläufen der Infektion in Zusammenhang gebracht (TANAKA *et al.*, 1995a; HA *et al.*, 2001; CLARK und COWDEN, 2003; CLARK *et al.*, 2004; YELAMOS *et al.*, 2004; MATTIUSSI *et al.*, 2007). Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* nimmt aktiv Einfluss auf den PARP-1 Gehalt seines Wirtes. So kommt es sowohl in apoptotischen als auch in nicht-apoptotischen Wirtszellen nach einer Infektion mit *T. gondii* zu einer starken Inhibierung des PARP-1 Levels (GOEBEL *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit belegten eine Inhibierung der Expression von PARP-1 in verschiedenen nicht-apoptotischen Wirtszellen und gaben Hinweise darauf, wie die Inhibierung durch *T. gondii* ausgelöst werden könnte und welche Auswirkungen auf das Parasit-Wirt-Verhältnis zu beobachten waren. Bei der Inhibierung der Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 durch *T. gondii*, sowohl in

apoptotischen als auch in nicht-apoptotischen Wirtszellen, handelt es sich um eine weitere bisher wenig untersuchte Interaktion des Parasiten mit der Physiologie seiner Wirtszelle.

4.1 Die PARP-1-Inhibierung nach *T. gondii*-Infektion ist ein generelles Phänomen

In früheren Untersuchungen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *T. gondii* in HL-60 bzw. U937 Wirtszellen Auswirkungen auf die Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 hat und dass dieser Effekt nicht nur auf Wirtszellen beschränkt ist, die mit einem Apoptose Stimulans behandelt und durch die Infektion mit *T. gondii* vor Apoptose geschützt werden (GOEBEL *et al.*, 2001). Zur genaueren Charakterisierung dieses Effektes wurden die Versuche nun darüber hinaus an nicht-apoptotischen Wirtszellen von *T. gondii* fortgesetzt. Es konnte dabei eine deutliche, wenn auch transiente, Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels nach Infektion mit *T. gondii* nachgewiesen werden. Da die Inhibierung der Expression von PARP-1 in Monocyten/Makrophagen schon innerhalb von wenigen Minuten nach der Infektion sehr stark ausgeprägt war und erst nach Stunden wieder langsam abnahm, könnte ein Zusammenhang vor allem zwischen dem veränderten PARP-1-Gehalt und der Frühphase der Parasit-Wirt-Interaktion bestehen. *T. gondii* beeinflusst auch NF- κ B in Makrophagen während der frühen Phase der Infektion und verhindert dadurch die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen (BUTCHER *et al.*, 2001; SHAPIRA *et al.*, 2002).

Daneben konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Inhibierung der Expression von PARP-1 in deutlicher Korrelation zur Parasitenmenge, mit der die Wirtszellen infiziert worden waren, stand. Eine Dosisabhängigkeit der Modulation von zellulären Abläufen von der Parasitenmenge wird sowohl bei der Reduzierung der DNA-Fragmentierung durch *Toxoplasma* (GOEBEL *et al.*, 2001), als auch bei der Inhibierung der CIITA Expression (LANG C *et al.*, 2006) gezeigt. Sie kann dabei auch als Hinweis auf eine direkte Interaktion des Parasiten mit einer Wirtszelle gewertet werden.

Außerdem wurde durch Versuche auf Einzelzellebene deutlich, dass PARP-1 nach der Infektion mit *T. gondii* nicht aus dem Zellkern in andere Zellkompartimente

transportiert wurde. Dies wurde auch von den Ergebnissen der Western Blot Analysen untermauert. Vielmehr scheint es sich bei der Reduktion von PARP-1 um einen schnellen Abbau des Proteins zu handeln.

T. gondii beeinflusst im Verlauf der Apoptose nicht-infizierte Nachbarzellen von infizierten Wirtszellen (WEI *et al.*, 2002; LÜDER und GROSS, 2005). Bei den hier durchgeführten Experimenten auf Einzelzellebene nahm *T. gondii* ebenfalls Einfluss auf nicht-infizierte Nachbarzellen von infizierten Zellen in Bezug auf PARP. Hierbei wurde deutlich, dass auch in parasit-negativen Zellen einer infizierten Kultur PARP-1 stark inhibiert war. Allerdings muss erwähnt werden, dass durch die Art der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung nicht ausgeschlossen werden kann, dass Parasiten, die nur an die Wirtszelle adhärirt aber nicht eingedrungen waren, nicht ausreichend fixiert und während der verschiedenen Waschschrte unbeabsichtigt entfernt wurden. Diese Zellen wären jedoch als parasit-negativ ausgewertet worden. Dagegen sprach aber, dass auch extrazelluläre Parasiten in den Proben deutlich zu sehen waren.

Da eine Inhibierung der Expression von PARP-1 auch in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien beobachtet werden konnte, scheint es sich um ein generelles Phänomen bei der *T. gondii*-Infektion von Wirtszellen zu handeln. Allerdings waren die Stärke der Inhibierung und deren Zeitpunkt nach der Infektion abhängig vom Wirtszell-Typ und vom Ursprungsorganismus der Wirtszellen. So zeigte sich eine stärkere Inhibierung der Expression von PARP-1 bei murinen Zellen im Vergleich zu humanen Zellen. Im Vergleich von zwei murinen Zelltypen untereinander belegten die Daten dieser Arbeit, dass in Makrophagen PARP-1 nach Infektion mit *T. gondii* schneller und stärker inhibiert wurde als in Fibroblasten. Ähnliche Beobachtungen wurden schon früher gemacht. Bei der Infektion von Wirtszellen durch *T. gondii* scheint die Art der Wirtszelle Auswirkungen auf die Modulation der zellulären Prozesse durch den Parasiten zu haben. So werden deutliche Unterschiede zwischen Zellen des Immunsystems und Nicht-Immunzellen in der Reaktion auf eine *T. gondii*-Infektion beobachtet (MOLESTINA *et al.*, 2003).

Ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit Pathogenen und Auswirkungen auf PARP-1 zeigte sich bisher meist im Hinblick auf die Apoptose. So zeigt sich, dass Infektionen mit verschiedenen Viren, wie z.B. beim humanen Rhinovirus (DESZCZ *et al.*, 2005), beim Pferde-Grippe-Virus (EIV) (LIN *et al.*, 2002) und beim humanen Cytomegalievirus (CMV) (CHIOU *et al.*, 2002), sowie bei Infektionen mit Bakterien, wie

Francisella tulariensis (LAI und SJOSTEDT, 2003) und *Pseudomonas aeruginosa* (ZHANG *et al.*, 2004), zur Aktivierung der Caspase-Kaskade sowie der PARP-1 Spaltung und somit zur Induktion der Apoptose führen. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass PARP-1 bei verschiedenen Viren (TANAKA *et al.*, 1995a; HA *et al.*, 2001) und Bakterien (YELAMOS *et al.*, 2004) eine wichtige von Apoptose unabhängige Rolle im Lebenszyklus dieser Pathogene spielt. Diese Daten belegen, dass PARP-1 eine wichtige Rolle auch bei der Entwicklung intrazellulärer Pathogene zukommt.

Neben dem Proteingehalt in der Zelle, der bei PARP-1 bei bis zu $0.5 - 5 \times 10^6$ Moleküle / Nukleus liegt (DURIEZ und SHAH, 1997), spielt die enzymatische Aktivität von PARP-1 eine entscheidende Rolle. PARP-1 modifiziert viele Proteine, die wiederum auf diverse zelluläre Prozesse Einfluss haben, post-translational durch Poly(ADP-ribosyl)ierung (AME *et al.*, 2004). Dabei ist die enzymatische Grundaktivität in Zellen sehr niedrig und PARP-1 wird erst durch verschiedene Stimuli, zu denen DNA-Strangbrüche gehören, aktiviert (KIM *et al.*, 2005). In der vorliegenden Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die Poly(ADP-ribosyl)ierung nach Stimulierung von H_2O_2 durch Infektion mit *T. gondii* signifikant reduziert war. PARP-1 ist für etwa 90% der Poly(ADP-ribosyl)ierung in der Zelle verantwortlich (VIRAG, 2005b), so dass die verminderte Poly(ADP-ribosyl)ierung auf die verminderten PARP-1-Proteinlevel nach *Toxoplasma*-Infektion zurückzuführen sein dürfte. Diese Vermutung wurde zudem von Experimenten mit Katalase-knockout Parasiten gestützt. Dabei zeigten Zellen, die mit den Katalase-negativen PRUcaf Parasiten infiziert worden waren, im Zell-ELISA eine ähnlich stark reduzierte H_2O_2 -induzierte PARP-1-Aktivität wie Zellen, die mit dem parentalen Stamm PRUhxgprt infiziert worden waren. Eine Katalase-vermittelte Detoxifizierung von H_2O_2 durch *T. gondii* konnte also ausgeschlossen werden. Nicht nur die Inhibierung der PARP-1-Proteinlevel durch eine Infektion mit *T. gondii* konnte also in der hier vorliegenden Arbeit bewiesen werden, sondern auch eine starke Abnahme der enzymatischen Aktivität von PARP-1 wurde durch eine Infektion mit *T. gondii* verursacht. Somit hatte der Parasit nach Infektion neben dem Einfluss auf das Protein PARP-1 auch Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Zwar könnten noch andere Mitglieder der PARP Familie theoretisch die Poly(ADP-ribosyl)ierung übernehmen, allerdings sprechen die Daten der hier vorliegenden Arbeit dagegen, da gerade der Nachweis der reduzierten ADP-ribosyltransferase-Aktivität nach Infektion für die wichtige Rolle von PARP-1 bei der ADP-ribosylierung sprach.

4.2 Die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* ist nicht von der Virulenz des Toxoplasma-Stammes abhängig

Bei Infektionen mit dem Erreger der zerebralen Malaria (*Malaria tropica*), *Plasmodium falciparum*, zeigt sich eine Korrelation unter anderem zwischen der PARP-1 Stimulierung und der Schwere des Verlaufs der Infektion (CLARK *et al.*, 2004). Durch die mit dem Schweregrad des Krankheitsverlaufes korrelierende Freisetzung von TNF- α durch Makrophagen und Monozyten als Antwort auf die Infektion mit *Plasmodium* kommt es zur NO-Freisetzung, zu Einzelstrangbrüchen der DNA, zur Überaktivierung von PARP-1 und zu einem Verlust von NAD⁺ und ATP. Dadurch kann Sauerstoff, der durch die Anämie bei *Malaria tropica* ohnehin nur in niedrigen Konzentrationen im Blut vorkommt, nicht effektiv verarbeitet werden. Folge davon sind schwere Krankheitsverläufe aufgrund einer Mangelversorgung von ZNS-Gewebe bis hin zum Tod der Patienten. Außerdem führt die Überaktivierung von PARP-1 zu einer verstärkten NF- κ B-vermittelten Genexpression und zu einer vermehrten Bildung von pro-inflammatorischen Cytokinen, was eine lokale Entzündungsreaktion verstärkt (CLARK und COWDEN, 2003; CLARK *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PARP-1-Überaktivierung während entzündlicher Reaktionen bei zerebraler Malaria für die Schwere des Krankheitsverlaufes mitverantwortlich sein könnte. Auch Infektionen mit *T. gondii* führen zu sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen, die besonders in der Maus von der unterschiedlichen Virulenz des Erregers abhängt. Dies ist anhand von zwei unterschiedlichen *T. gondii* Stämmen, einem hoch virulenten (S23), und einem anderen signifikant weniger mausvirulenten Stamm (S22), nachgewiesen worden (SAEIJ *et al.*, 2005b). Beide Stämme tragen zusätzlich das Luciferase-Gen, um die Replikationsrate nach der Infektion in Mäusen optisch bestimmen zu können. Die Mäuse, die mit dem virulenten Stamm S23 infiziert werden, zeigen ein exponentielles Replikationsverhalten des Parasiten bis hin zum Tod der Mäuse, während sich der S22 Stamm zunächst auch stark vermehrt, dann aber nicht mehr nachweisbar ist (SAEIJ *et al.*, 2005b). Grundlage für weitere Experimente dieser Arbeit war die Überlegung, dass der entzündungsbedingte Tod der Mäuse eventuell auf eine unterschiedliche Modulation von PARP-1 durch virulente und avirulente Stämme von *T. gondii* zurück zu führen ist. Die Einteilung der unterschiedlichen Stämme von *T.*

gondii in drei Gruppen richtet sich unter anderem nach ihrer Virulenz in Mäusen (PARMLEY *et al.*, 1994). Die virulenten Stämme kommen seltener in Tieren vor, wohingegen sie häufig bei congenitaler Toxoplasmose und Augenerkrankungen gefunden werden. Bei diesen Stämmen reicht ein einzelner Erreger, um zum Tod einer Maus innerhalb von 8 - 12 Tagen zu führen. Avirulente Stämme hingegen sind meist in Nutztieren in Form einer chronischen Toxoplasmose zu finden. Hier führen $\geq 10^3$ Parasiten zu einer chronischen Infektion (SIBLEY *et al.*, 2002). Die hier vorliegenden Daten konnten zeigen, dass sowohl die Stämme aus der Maus-virulenten Gruppe A als auch die Stämme aus den Maus-avirulenten Gruppen B und C die PARP-1-Proteinlevel deutlich inhibierten. Da keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Inhibierung zwischen den Gruppen zu erkennen war, konnte eine Virulenz-abhängige bzw. Genotyp-abhängige Inhibierung der Expression von PARP-1 ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis war auch ein erster Hinweis, dass die parasiten-vermittelte Modulation von PARP nicht für stammspezifische Unterschiede bei der Regulation der Immunantwort während der Toxoplasmose verantwortlich ist. Tatsächlich ist die Ausprägung der Immunantwort unter anderem von der Virulenz des *T. gondii* Stammes abhängig. So kann nach Infektion von Makropagen mit *T. gondii* beobachtet werden, dass Maus-avirulente Stämme deutlich größere Mengen IL-12 induzieren als Maus-virulente Stämme (SCHADE und FISCHER, 2001). Allerdings ist keine Unterschiede zwischen den Stämmen bezüglich der induzierten IL-12p40 Produktion in verschiedenen Zellen festzustellen (SAEIJ *et al.*, 2005a). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Virulenz der Gruppe A Stämme und einer Überexpression von T_H1 Zytokinen, die letztendlich zum Tod der Wirte führt, ist vorhanden (SIBLEY *et al.*, 2002). Auch Unterschiede zwischen den Stämmen bezüglich ihrer Interaktion mit den NF- κ B- und STAT3-Signalwegen zeigten sich kürzlich (SAEIJ *et al.*, 2005a). Hingegen scheint es sich bei der PARP-1-Inhibierung um einen generellen Effekt bei der Interaktion von *T. gondii* mit seinen Wirtszellen zu handeln. Einschränkend muss allerdings beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit Makrophagen mit Parasiten unterschiedlicher Genotypen nur für 1 h infiziert wurden und nicht über einen längeren Zeitraum und auch nicht *in vivo*. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine unterschiedliche Modulation der PARP-1 Expression an den entzündlichen Reaktionen verschiedenen Schweregrades *in vivo* durchaus beteiligt sein könnte.

4.3 Regulation der PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* in

Wirtszellen

Toxoplasma gondii ist ebenso wie andere intrazelluläre Infektionserreger, z.B. *Salmonella typhimurium* und *Chlamydia trachomatis*, in der Lage durch die Invasion der Wirtszelle die Transkription verschiedener Wirtszellgene zu beeinflussen. Dies belegen Daten, die mittels Genarray erbracht wurden (BLADER *et al.*, 2001; GAIL *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden die Transkriptionslevels von RAW 264.7 Wirtszellen auf ihre PARP-1 mRNA Level mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Es zeigte sich jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen den PARP-1 mRNA-Leveln der infizierten und nicht-infizierten RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen. Die schnelle und starke Herunterregulation des PARP-1 Proteins nach einer Infektion mit *T. gondii* konnte daher nicht auf reduzierte mRNA Level zurückgeführt werden, da diese im Verlauf der Infektion sogar eher zu- als abnahmen. Die Zunahme der PARP-1-Proteinlevel bis 24 h nach Infektion könnte daher auf eine verstärkte Transkription zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen an HL-60 und U937 Zellen, die zeigen, dass in nicht-apoptotischen Zellen die PARP-1 mRNA-Level mit und ohne *T. gondii*-Infektion unverändert blieben (GOEBEL *et al.*, 2001). Ein transkriptioneller Einfluss auf die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* kann daher ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint es sich um eine post-transkriptionelle Regulierung zu handeln (GOEBEL *et al.*, 2001).

Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass *T. gondii* in der Lage ist, auf post-transkriptioneller Ebene in die Expression von Wirtszellproteinen einzugreifen. So konnte für den Tumor Necrosis Faktor- α (TNF- α), ein pro-inflammatorisches Cytokin, eine post-transkriptionelle Regulation durch den Parasiten *T. gondii* nachgewiesen werden (BELLONI *et al.*, 2003). Daher wurde diese Möglichkeit auch für die PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* in Betracht gezogen. Um den Regulationspunkt weiter einzugrenzen, wurde ein zellfreies *in vitro* System verwendet, in dem keine funktionelle Translationsmaschinerie vorhanden war. Dennoch zeigte sich eine dosisabhängige Inhibierung der Expression von PARP-1 nach Inkubation mit *T. gondii*. Dies ließ mehrere Schlüsse zu. Eingriffe in die Prozessierung der mRNA waren unwahrscheinlich, da sowohl das Aufsetzen der 7-Methylguanosinium-Kappe am 5'-Ende der mRNA, als auch das Anheften des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA zu einer Schwächung der RNA-Stabilität und somit zu einem schnelleren

Abbau der RNA führen würde. Wie bereits dargestellt, waren veränderte Transkriptlevel nicht für die Inhibierung der Expression von PARP-1 verantwortlich. Da ein RNA-Editing bei Säugerzellen eher unwahrscheinlich war und auch die Daten des zellfreien *in vitro* Systems dagegen sprachen, konnte ein RNA-Editing weitgehend ausgeschlossen werden.

Außerdem könnte *T. gondii* Wirtszellproteasen aktivieren, vergleichbar der Caspase 3, für die bekannt ist, dass sie PARP-1 spaltet (DURIEZ und SHAH, 1997). Caspase 3 selbst konnte jedoch ausgeschlossen werden, da keine Caspase 3-spezifischen Spaltprodukte von PARP-1 nachweisbar waren und auch keine Induktion der Apoptose vorlag, durch die die Caspase 3 aktiviert worden wäre. Hauptsächlich wird PARP-1, neben Caspase 3, von verschiedenen Proteasen wie Yama/CPP-32/Apopain und Caspase 7 im Verlauf der Apoptose gespalten und inaktiviert (DECKER und MULLER, 2002). Auch nach Induktion von Nekrose konnte eine Spaltung von PARP-1 in verschieden große Fragmente durch lysosomale Proteasen wie Cathepsin B und G nachgewiesen werden (GOBEIL *et al.*, 2001). Allerdings konnten auch diese Proteasen weitgehend ausgeschlossen werden, da der in der hier vorliegenden Arbeit verwendete PARP-1-spezifische Antikörper C2-10 ebenfalls zum Nachweis der durch Cathepsin B und G hervorgerufenen PARP-1-Spaltprodukte verwendet wurde (GOBEIL *et al.*, 2001) und nach Infektion mit *T. gondii* keine Spaltprodukte nachweisen konnte.

Da die PARP-1-spezifischen Transkriptlevel im Gegensatz zu den Proteinleveln nach Infektion mit *T. gondii* nicht abnahmen, könnten Wirtszellproteasomen bei der Degradierung von PARP-1 eine Rolle spielen. Deren Beteiligung konnte auch bei der Modulation der NF- κ B-abhängigen Genexpression durch *T. gondii* nachgewiesen werden. Als Reaktion auf Infektionen wird häufig NF- κ B aktiviert, was zu einer Expression verschiedener pro-inflammatorischer Cytokine (IL-12, TNF- α) führt. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt dabei indirekt durch Inaktivierung von I- κ B. NF- κ B liegt im Zytoplasma inaktiv und gebunden an den NF- κ B-Inhibitor I- κ B vor. Eine Infektion mit Pathogenen kann zu einer Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation von I- κ B durch das Proteasom führen, wodurch NF- κ B aktiviert wird und in den Nukleus wandert (WANG *et al.*, 2002). Bei einer Infektion mit *T. gondii* kommt es zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation von I- κ B durch das 26S Proteasom, allerdings wird eine Translokation von NF- κ B in den Nukleus, und die Expression von verschiedenen pro-inflammatorischen Cytokinen, zumindest

zeitweise verhindert (BUTCHER *et al.*, 2001). Als Reaktion auf die Infektion mit *T. gondii* könnte es auch bei PARP-1 zu einer Ubiquitinierung sowie zum Abbau durch das Proteasom kommen. Vergleichbares konnte bei Infektionen mit anderen Pathogenen schon gezeigt werden. Eine Infektion mit *Leishmania donovani* verursacht in Makrophagen einen Proteasomen-vermittelten Abbau von STAT1 α (FORGET *et al.*, 2005). In Zellen, die mit *Chlamydia trachomatis* infiziert sind, kommt es zum Abbau von CD1d durch das Proteasom (KAWANA *et al.*, 2007). In unseren Versuchen zeigten mit Proteasom-Inhibitoren (MG132 oder Lactacystin) vorinkubierte und mit *T. gondii* infizierte Zellen allerdings ebenso wie infizierte und unbehandelte Kontrollzellen eine starke Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels. Der Abbau von CD1d bei *C. trachomatis* Infektionen kann nicht durch MG132 inhibiert werden, wohl aber mit Lactacystin (KAWANA *et al.*, 2007). Bei der RPG1 (Protein des „stem rust resistance“ Genes) Proteolyse nach Infektion mit dem Pilz *Puccinia graminis* zeigt einzig MG132 eine Inhibierung des Proteasoms (NIRMALA *et al.*, 2007). Unsere Ergebnisse zeigten aber weder einen Effekt mit dem Inhibitor Lactacystin noch mit MG132. Dies sprach gegen den Abbau von PARP-1 durch das Proteasom.

Indessen könnten Wirtszellen als Reaktion auf die Anwesenheit des Parasiten dazu angeregt werden, Moleküle zu sezernieren, die die Inhibierung der Expression von PARP-1 induzieren. Ein Beispiel hierfür wäre, dass *T. gondii*-Infektionen die Freisetzung von IL-12 durch Makrophagen und Dendritische Zellen verursachen (DENKERS, 2003) und auch bei *Plasmodium falciparum* Infektionen zeigen THP-1 Zellen eine deutliche Sekretion von TNF- α als Reaktion auf die Infektion (CRUZ CUBAS *et al.*, 1994). Kürzlich wurde gezeigt, dass es durch die Infektion mit *T. gondii* auch zur Sekretion von CCL2 (Chemokine Ligand 2) durch die Wirtszellen kommt. Mittels einer SAG1 Knockout Mutante von *T. gondii* wurde SAG1 als Auslöser der CCL2 Sekretion von Wirtszellen identifiziert (BRENIER-PINCHART *et al.*, 2006). Und auch die Chemokine Interleukin (IL)-8, GRO α und MCP-1 werden nach Infektion mit *T. gondii* von HeLa Epithelzellen und Fibroblasten verstärkt sekretiert (DENNEY *et al.*, 1999). Außerdem produzieren *T. gondii*-infizierte Astrocyten Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches die Herunterregulation der NO Produktion von IFN- γ aktivierten Mikrogliazellen auslöst und neuronale Degeneration verhindert (ROZENFELD *et al.*, 2003). Es wäre also denkbar, dass auch die PARP-1-Inhibierung durch die Sekretion eines Moleküls von der Wirtszelle als Antwort auf die Infektion verursacht wurde.

Allerdings zeigten RAW 264.7 Zellen, die mit steril filtriertem Medium von infizierten RAW 264.7 Zellen inkubiert wurden, unveränderte PARP-1 Level im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrolle. Und auch die Ergebnisse aus dem zellfreien *in vitro* System sprachen gegen diese Hypothese.

Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR) oder Nod-like Rezeptoren (NLR) binden extra- bzw. intrazelluläre Signalmoleküle, Pathogen-assoziierte molekulare Proben (PAMPs) genannt, die diverse Signalkaskaden aktivieren. Während es sich bei der Familie der TLR um membranständige Rezeptoren handelt, sind NLR im Inneren der Zelle lokalisiert (SIRARD *et al.*, 2007). TLR 2 und TLR 11 z. B. wurden als wichtige Moleküle in der Abwehr von *T. gondii*-Infektionen beschrieben (MUN *et al.*, 2003; YAROVINSKY *et al.*, 2005; YAROVINSKY und SHER, 2006). Nukleäre Rezeptoren (NR) binden entweder direkt oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren an die Ziel-DNA und regulieren deren Transkription (KININIS und KRAUS, 2008). Die Ergebnisse aus dem zellfreien *in vitro* System belegten, dass es sich bei der Inhibierung der Expression von PARP-1 nicht um eine Membranrezeptor-vermittelte Regulation handelte. Im nukleären Lysat befanden sich keine intakten Membranen der Wirtszelle, obwohl dennoch eine Reduktion des PARP-1-Proteinlevels zu beobachten war. NLR sind nicht membranständig und binden PAMPs im Cytosol (STROBER *et al.*, 2006; SIRARD *et al.*, 2007). Da in dem für diese Arbeit verwendeten Lysat allerdings nur die Nuklei enthalten waren, konnte eine Beteiligung von NLRs oder anderen intrazellulären Rezeptoren weitgehend ausgeschlossen werden. NR kämen als Rezeptoren in Betracht. Sie waren sicherlich im nukleären Lysat vorhanden, allerdings bleibt die Frage, wie das Signalmolekül in die Zelle und zu den NR gelangte, vor allem in Bezug auf die sehr schnelle Inhibierung von PARP innerhalb von 2.5 min nach Infektion mit *T. gondii* (Abb. 3A).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die PARP-1-Inhibierung posttranskriptional und unabhängig von einer funktionsfähigen Translationsmaschinerie der Wirtszelle erfolgte. Auch ein *Toxoplasma*-induzierter PARP-1-Abbau durch Wirtszellproteasomen, sowie ein Abbau von PARP-1 durch von der Wirtszelle sezernierte Moleküle und eine Beteiligung von intrazellulären Wirtszell-Rezeptoren konnten weitgehend ausgeschlossen werden.

4.4 Voraussetzungen seitens des Parasiten *T. gondii* zur PARP-1-Inhibierung

Während der Invasion einer Wirtszelle kommt es zur Sekretion einer ganzen Reihe von Proteinen aus den verschiedenen Organellen von *T. gondii* (CARRUTHERS, 1999). Diese sind zur Anheftung an die Wirtszelle, zur Invasion und zur Bildung der parasitophoren Vakuole unerlässlich (SIBLEY *et al.*, 1986; SIBLEY *et al.*, 1995; CARRUTHERS und SIBLEY, 1997; MORDUE *et al.*, 1999). Außerdem erlaubt die Beschaffenheit der parasitophoren Vakuole als molekulares Sieb einen Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1300 - 1900 Da (SCHWAB *et al.*, 1994). Für ROP16, ein Protein der Rhoptrien von *T. gondii*, das während der Wirtszellinvasion abgegeben wird, wurde nachgewiesen, dass es die Expression von IL-12 durch die Wirtszelle beeinflusst (SAEIJ *et al.*, 2006; SAEIJ *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit einer Molekül- bzw. Proteinsekretion durch den Parasiten, die die PARP-1-Inhibierung verursacht, in Betracht gezogen. Denkbar wäre auch, dass eine von *T. gondii* während der Wirtszellinvasion sekretierte Protease, wie das 42-kDa Rhoptrienprotein (AHN *et al.*, 2001), PARP-1 in der Wirtszelle abbaut. Dies könnte die Tatsache erklären, dass PARP-1 auch in parasit-negativen Zellen einer infizierten Population inhibiert war. Ein von extrazellulären Parasiten sekretiertes Protein könnte von nicht-infizierten Wirtszellen aufgenommen werden und die PARP-1-Inhibierung verursachen. Zur Überprüfung der Hypothese wurde ein so genanntes Transwell-System verwendet. Dabei wurde ein direkter Kontakt zwischen Wirtszellen und Parasiten durch eine Membran mit einer Porengröße von 0.4 µm verhindert. Dennoch konnten von *T. gondii* sekretierte Moleküle durch die Membran gelangen und auf die Wirtszellen Einfluss nehmen. Der PARP-1 Proteingehalt der Zellen blieb jedoch unverändert, unabhängig davon, ob sie von *T. gondii* durch die Membran des Transwell-Systems getrennt waren, oder nicht-infiziert blieben. Die Zellen, die direkt mit Tachyzoiten infiziert worden waren, zeigten hingegen eine starke Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels. Von *T. gondii* sekretierte Moleküle haben demnach keinen Einfluss auf PARP-1, vielmehr ist der direkte Kontakt zwischen Wirtszelle und Parasit für die Inhibierung der Expression von PARP-1 nötig. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass der Einfluss eines vom Parasiten sekretierten Moleküls mit geringer Halbwertszeit nicht ausgeschlossen werden konnte. Ferner könnte auch die Sekretion eines parasitären Moleküls erst durch den direkten Kontakt zwischen *T.*

gondii und der Wirtszelle ausgelöst werden. Um diese Möglichkeiten auszuschließen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden, da dies im Rahmen des Transwell-Systems nicht möglich war.

Sowohl für die Inhibierung der Wirtszellapoptose, als auch für die Inhibierung der MHC-Klasse II Expression durch *T. gondii* ist die Fähigkeit des Parasiten zur Replikation unbedeutend. Allerdings sind für beide Mechanismen lebende Parasiten, die die Wirtszelle aktiv infizieren können, unerlässlich (GOEBEL, 2000; LANG *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob lebende und/oder zur Replikation fähige Parasiten für die PARP-1-Inhibierung notwendig sind, wurden die Parasiten vor der Infektion von Wirtszellen entweder mit UV-Licht behandelt, wodurch die Replikationsfähigkeit des Parasiten verloren ging (ENDO *et al.*, 1981), oder bei 60°C (SIBLEY *et al.*, 1985) bzw. bei -20°C abgetötet. Für die PARP-1-Inhibierung war die Replikationsfähigkeit des Parasiten nicht nötig. Im Gegensatz zur Inhibierung der Wirtszellapoptose und der MHC-Klasse II Expression durch *T. gondii* führten interessanterweise aber auch abgetötete Parasiten zu einer deutlichen Inhibierung der Expression von PARP-1. Dies bedeutete, dass die Wirtszellinvasion des Parasiten für die PARP-1-Inhibierung keine notwendige Voraussetzung war und dass auch tote Parasiten den Effekt verursachten. Beobachtungen auf Einzelzellebene, die zeigten, dass auch parasit-negative Zellen einer infizierten Population eine deutliche Reduktion der PARP-1 Menge aufwiesen, untermauerten dies. Die Tatsache, dass PARP-1 auch durch tote Parasiten inhibiert wurde, zeigte, dass es sich nicht um einen aktiven Prozess des Parasiten handelte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für die PARP-1-Inhibierung ein enger Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle offensichtlich wichtig war, wie die Versuche mit dem Transwell-System belegten. Allerdings waren intrazelluläre Replikation und Wirtszellinvasion ohne Bedeutung für die Inhibierung der PARP-1-Proteinlevel. Ferner wurde durch die Versuche mit den Hitze-behandelten Parasiten deutlich, dass es sich bei dem Effekt auf PARP-1 um keinen aktiven Prozess des Parasiten handelte, wie z.B. das Ausrichten des apikalen Pols zur Wirtszelle hin (MITCHELL *et al.*, 2004) oder das Gleiten auf der Wirtszelloberfläche (OPITZ und SOLDATI, 2002).

Um genauer bestimmen zu können, welche Bestandteile von *T. gondii* die Inhibierung der Expression von PARP-1 induzierten, wurden auch ein PBS-lösliches Parasiten-Lysat und ein PBS-unlösliches *T. gondii*-Lysat mit Wirtszellen inkubiert. Dabei führte das PBS-unlösliche Parasiten-Lysat zu einer vergleichbaren Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels wie lebende Parasiten. Es enthielt neben anderen Komponenten vor allem wasserunlösliche Membranbestandteile des Parasiten. Dies deutete auf die Beteiligung eines Membranmoleküls bei der PARP-1-Inhibierung hin und könnte – ein auf der Oberfläche exponiertes Membranmolekül vorausgesetzt – auch erklären, dass tote Parasiten eine Inhibierung der Expression von PARP-1 verursachten.

Bei den verschiedenen Membranfraktionen handelte es sich einmal um eine Carbonatpuffer-Fraktion mit hohem pH-Wert, die lösliche und Membran-assoziierte Proteine enthielt, um eine Harnstoff-haltige Fraktion, die komplexere Protein-Aggregate beinhaltete, eine Triton-haltige Fraktion, die hauptsächlich hydrophobe Proteine aufwies, sowie eine unlösliche Fraktion, die die restlichen Membranproteine aus den vorangegangenen Fraktionierungsschritten enthielt. Eine starke Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels der Wirtszellen zeigte sich nach Inkubation mit der Fraktion, die hauptsächlich Membran-assoziierte Proteine des Parasiten beinhaltete. Eine Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Silberfärbung zeigte in der PARP-1-hemmenden Fraktion eine deutliche Doppelbande bei ca. 30 kDa, die im PBS-löslichen *T. gondii*-Lysat nicht vorhanden war. SAG-1 (p30), ein 30 kDa großes Protein, ist das Hauptoberflächenprotein von *T. gondii* und stellt 5% des Gesamtproteingehaltes der Tachyzoiten von *T. gondii* dar (KASPER *et al.*, 1983). Es besitzt einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker, über den es in der Plasmamembran des Parasiten verankert ist (NAGEL und BOOTHROYD, 1989; TOMAVO *et al.*, 1989). Infektionsversuche mit SAG1 Knockout Mutanten geben Hinweise, dass dieses Oberflächenmolekül für die Modulation der Immunantwort des Wirtes und für die Ausprägung der Virulenz mitverantwortlich ist (LEKUTIS *et al.*, 2001) und nachweislich Einfluss auf Wirtszellen von *T. gondii* nimmt (SENG *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 2005). So löst es sowohl eine IgA Antikörper Antwort aus (CHARDES *et al.*, 1990) als auch die Produktion der Cytokine IFN- γ und IL-2 (CHARDES *et al.*, 1993). Auch ist von *Trypanosoma cruzi* und anderen einzelligen Parasiten bekannt, dass GPI-Anker bzw. GPI-Protein-Komplexe pro-inflammatorische Zytokinproduktionen durch Makrophagen auslösen (GAZZINELLI *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2000; ALMEIDA und

GAZZINELLI, 2001). Um zu überprüfen, ob SAG-1 die PARP-1-Inhibierung in Wirtszellen auslöst, wurden RAW 264.7 Makrophagen mit SAG-1 defizienten Mutanten infiziert. Diese zeigten jedoch eine ähnlich starke Inhibierung des PARP-1-Proteinlevels wie die entsprechenden parentalen SAG-1-positiven Parasiten und wie NTE Tachyzoiten. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass ein Membran-assoziiertes *T. gondii* Protein für den Effekt auf PARP-1 verantwortlich war. Allerdings wurde SAG-1 als verursachendes Protein ausgeschlossen.

Auch die P1-Fraktion zeigte eine Inhibierung der Expression von PARP-1, allerdings könnte dies auf eine Kontaminierung dieser Fraktionen mit Proteinen aus der S1-Fraktion zurück zu führen sein.

In weiteren Versuchen wäre zunächst eine Charakterisierung der Molekülgruppe, zu der das PARP-1 inhibierende Effektormolekül von *T. gondii* gehört, sinnvoll. Möglicherweise könnte es sich dabei auch um ein Lipoprotein oder Glycolipid handeln. Für *Trypanosoma cruzi* konnte nachgewiesen werden, dass Glycoinositolphospholipide immunregulatorische Aktivität besitzen (BRODSKYN *et al.*, 2002). Um weitere Hinweise auf das Membranmolekül von *T. gondii* zu bekommen, welches PARP-1 inhibiert, könnte ein Verdau mit Proteasen oder eine Behandlung mit Lipasen der S1 Fraktion zu einer besseren Charakterisierung beitragen. Auch eine weitere Auftrennung der S1 Fraktion, z.B. mittels Chromatographie, wäre denkbar. Sobald eine Fraktion aus wenigen Banden einen Effekt zeigt, könnte eine MALDI-TOF Analyse durchgeführt und das entsprechende Protein näher bestimmt werden.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem Effektormolekül von *T. gondii* selbst um eine Protease handelt. Bei *P. falciparum* wurden nach einer Genomanalyse mehr als 90 Gene gefunden, die Homologien zu bekannten Protease-Familien besitzen und auch bei *T. gondii* wird eine vergleichbare Anzahl an Proteasen vermutet. Die regulierte Proteolyse stellt einen integralen Teil der Biogenese sekretorischer Organellen bei *T. gondii* dar (JONGCO und KIM, 2007). Daher spielen Proteasen eine wichtige Rolle bei der Invasion von Wirtszellen durch *T. gondii* (CARRUTHERS, 1999; DOWSE und SOLDATI, 2005). Sowohl *in vitro* (CONSEIL *et al.*, 1999; QUE *et al.*, 2002) als auch *in vivo* (BUIRAGO-REY *et al.*, 2002) Experimente konnten zeigen, dass Proteaseinhibitoren das Penetrieren der Wirtszelle durch *T. gondii* verhindern. In *T. gondii* können bisher 4 Klassen an Proteasen nachgewiesen werden: Serinproteasen, Aspartatproteasen,

Cysteinproteasen und Metalloproteasen (JONGCO und KIM, 2007). Aufgrund der Daten dieser Arbeit müsste es sich hierbei um eine Protease handeln, die auf der Parasitenoberfläche aktiv ist. Denn Experimente im Transwell-System zeigten, dass ein enger Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle für die Inhibierung der Expression von PARP-1 nötig war und die Behandlung von Parasiten mit Hitze zeigten, dass keine Invasion des Parasiten für die Inhibierung erforderlich war. Bisher ist bekannt, dass bis zu 3 Mikronemenproteinproteasen (MPP1-3) auf der Oberfläche von *T. gondii* aktiv sind. Allerdings gelang bisher keine eindeutige Identifizierung dieser MPPs (JONGCO und KIM, 2007). Jedoch zeigen Knockout Versuche von TgSUB1, einer Serin-Subtilase von *T. gondii*, zwar keine Beeinträchtigung des Invasionsverhaltens des Parasiten, wohl aber eine Inhibierung der Aktivität von MPP2 und 3. Diese sind für die Reifung von Adhäsinen bzw. für den regulierten Abbau von sekretorischen Komplexen verantwortlich (JONGCO und KIM, 2007). Neben TgSUB1 wären auch ROM4 und 5 Kandidaten als Effektormolekül der PARP-1-Inhibierung, denn ROM4 und 5, Serin-Rhomboid-Proteasen, sind vermutlich für die MPP1 Aktivität verantwortlich und ebenfalls auf der Plasmamembran des Parasiten aktiv (JONGCO und KIM, 2007). Bisher sind keine Inhibitoren für diese beiden Serin-Proteasen bekannt und auch in dieser Arbeit nicht gezeigte Vorversuche mit verschiedenen Protease-Inhibitoren wie PMSF, Pepstatin, Leupeptin u.a. zeigten keine Auswirkung auf die Inhibierung der Expression von PARP-1 sowohl bei Infektion von RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen mit *T. gondii* als auch bei Inkubation von *T. gondii* im zellfreien *in vitro* System. Zur weiteren Charakterisierung des Effektormoleküls wäre jedoch eine Infektion von RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen mit der TgSUB1 Knockout Mutante von *T. gondii* denkbar um den Effekt von TgSUB1 auf die Inhibierung der Expression von PARP-1 zu untersuchen.

4.5 Auswirkungen der PARP-1 Überexpression in Wirtszellen auf Parasit-Wirt Interaktionen

Sowohl PARP-1 als auch *T. gondii* haben Einfluss auf verschiedene zelluläre Abläufe, scheinen aber meist antagonistische Effekte zu verursachen. Während PARP-1 eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt und nach Spaltung als wichtiger

Apoptosemarker bekannt ist (DURIEZ und SHAH, 1997), moduliert *T. gondii* die Apoptose in Wirtszellen auf verschiedensten Wegen (LÜDER und GROSS, 2005; SCHAUMBURG *et al.*, 2006). PARP-1 wird als Koaktivator von NF- κ B regulierten Genen (z.B. TNF- α , IL-6, IL-10, MIP-2, iNOS, etc.) beschrieben (HASSA *et al.*, 2005), wo hingegen *T. gondii* die Expression NF- κ B regulierter Gene inhibiert (DENKERS, 2003; DENKERS *et al.*, 2004). Zu diesen gehören verschiedene pro-inflammatorische Moleküle, wie IL-12, TNF- α , IL-6 und iNOS. Auch bei anderen apikomplexen Parasiten wird PARP-1 in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben. So wird bei der zerebralen Malaria unter anderem die PARP-1 Überaktivierung mit der Schwere des Verlaufs in Zusammenhang gebracht (CLARK *et al.*, 2004), während bei *T. gondii*-Infektionen apoptotische und nicht-apoptotische Wirtszellen eine Abnahme des PARP-1-Proteinlevels zeigen (GOEBEL *et al.*, 2001). Es stellte sich daher die Frage, welche Auswirkungen eine Überexpression von PARP-1 auf das Parasit-Wirt-Verhältnis haben würde. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit PARP-1 überexprimierende RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen generiert.

4.5.1 Invasion und Replikation von *T. gondii*

PARP-1 beeinflusst die Invasion und Vermehrung von verschiedenen pathogenen Organismen, wie Viren und Bakterien. Bei der Infektion mit HIV-1 zeigen verschiedene Klone der monocytischen Zelllinie U937 eine unterschiedliche Anfälligkeit für HIV-1. Zellen mit einer hohen Anfälligkeit für HIV-1 Infektionen besitzen einen 4 - 7-fach reduzierten PARP-1 Gehalt. Daraus wurde geschlossen, dass die Herunterregulierung von PARP-1 eine wichtige Voraussetzung für die Infektion mit HIV-1 ist (TANAKA *et al.*, 1995a). Für Chlamydiaceae, also intrazellulären Bakterien, scheint das Gegenteil der Fall zu sein. Sie zeigen in PARP-1^{-/-} Fibroblasten eine 10-fach niedrigere Vermehrungsrate als in PARP-1^{+/+} Zellen und auch PARP-1 Inhibitoren führen zu verminderter Bakterienreplikation (YELAMOS *et al.*, 2004). Welchen Einfluss PARP-1 auf Invasion und Replikation von Parasiten besitzt, ist bisher unbekannt. Zur Charakterisierung des Einflusses von PARP-1 auf die Parasit-Wirt Interaktionen und die funktionelle Bedeutung der PARP-1 Modulation durch den Parasiten wurden PARP-1 überexprimierende Makrophagen mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert und hinsichtlich des Invasions- und Replikationsverhaltens der Parasiten im Vergleich zu Wildtypzellen untersucht. Sowohl in einem quantitativen

Wachstumstest mit β -Galaktosidase-exprimierenden Parasiten, als auch bei Immunfluoreszenzfärbungen konnten keine Unterschiede bei Invasion oder Replikation von *T. gondii* zwischen PARP-1 überexprimierenden Makrophagen und deren Wildtypzellen beobachtet werden. Eine mögliche Ursache, warum die PARP-1-Überexpression in den Mutanten keinen Effekt auf die Invasion und Replikation der Parasiten hatte, könnte in dem vergleichbar niedrigen Niveau der Proteinmengen von PARP-1 nach Infektion sowohl in Wildtypzellen und als auch in Mutanten gelegen haben. PARP-1 wurde schon wenige Minuten nach der Infektion mit *T. gondii* inhibiert und auch der zeitliche Ablauf der Infektion in Wildtypzellen und Mutanten war sowohl auf Protein- als auch auf Einzelzellebene über einen langen Zeitraum der Infektion vergleichbar erniedrigt. Dies bedeutete, dass *T. gondii* in der Lage war, die erhöhte PARP-1 Expression der Mutanten im Verhältnis stärker zu erniedrigen, nämlich auf ein vergleichbares Niveau wie in Wildtypzellen. Dennoch ist festzustellen, dass die höheren Proteinmengen von PARP-1 in den Mutanten vor und 24 Stunden nach der Infektion keinen Einfluss auf Invasion und Replikation von *T. gondii* hatten.

4.5.2 NF- κ B regulierte Gene in der infizierten Wirtszelle

Ergebnisse aus Versuchen mit einem murinen Asthma-Modell, das zur Untersuchung der PARP-1-Inhibierung und dessen Auswirkung auf Inflammation verwendet wurde, stellen eine Verminderung von Entzündungsmediatoren nach PARP-1-Inhibierung fest. So wird eine Unterdrückung der Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-12 nach PARP-1-Inhibierung mit PJ34 nachgewiesen (VIRAG *et al.*, 2004), sowie von iNOS bei ischämischer Hirnverletzung (PARK *et al.*, 2004). Eine Reduktion der Entzündungsmediatoren TNF- α und iNOS wird auch mittels Microarray Analyse von Gewebe aus PARP-1^{-/-} Mäusen bestätigt (HA *et al.*, 2001). *T. gondii* könnte daher sowohl über die Inhibierung der Translokation von NF- κ B in den Nukleus die Expression der pro-inflammatorischen Gene hemmen (DENKERS, 2003) als auch durch die Inhibierung der Expression von PARP-1. Tatsächlich ist PARP-1 als Koaktivator der NF- κ B-regulierten Genexpression beschrieben worden (HASSA *et al.*, 2005). Des Weiteren ist PARP-1 ein Koaktivator von Stat-1, einem weiteren, unter anderem pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor (HA *et al.*, 2001), der auch

bei der Infektion von *T. gondii* eine wichtige Rolle spielt (DENKERS und BUTCHER, 2005).

Es sollten daher verschiedene NF- κ B-regulierte pro-inflammatorische Moleküle, für die eine Koaktivator-Funktion von PARP-1 beschrieben wurde (HASSA und HOTTIGER, 2002), hinsichtlich ihrer Expression in Wildtyp RAW 264.7 und PARP-1-überexprimierenden Mutanten nach Infektion mit *Toxoplasma* untersucht werden. Zu den pro-inflammatorischen Molekülen, die durch PARP-1 als Koaktivator der NF- κ B-abhängige Transkription reguliert werden, gehören Cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IFN- γ), Chemokine (MIP-1 α und MIP-2), Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM, P-Selektin, E-Selektin und CD-1 1 α), sowie Enzyme (iNOS) (HASSA und HOTTIGER, 2002). Welche molekularen Mechanismen dabei zur Regulation der NF- κ B-regulierten Transkription durch PARP-1 führen, wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Enzymaktivität von PARP-1 die NF- κ B-regulierte Transkription direkt beeinflusst. So wurde gezeigt, dass eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung die DNA Bindeaktivität von NF- κ B durch direkte Modifikation verändert (KAMEOKA *et al.*, 2000). Außerdem scheint die DNA Bindeaktivität von NF- κ B-p50 NAD⁺-abhängig zu sein und durch die Automodifikation von PARP-1 reversibel reguliert zu werden (CHANG und ALVAREZ-GONZALEZ, 2001). Die Automodifizierung von PARP-1 spielt auch eine wichtige Rolle in der NF- κ B-abhängigen Transkription und Genexpression in Gliazellen (NAKAJIMA *et al.*, 2004). Andere Studien zeigen hingegen, dass weder die enzymatische Aktivität noch die durch PARP-1 veränderte DNA Bindeaktivität von NF- κ B für die Transkriptionsregulation relevant sind (HASSA und HOTTIGER, 2002). Die Unterschiede in den Ergebnissen der Studien könnten auf die verwendeten, unterschiedlichen Systeme, unterschiedlichen Stimuli und unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen sein.

LPS-stimulierte Makrophagen zeigten eine stark erhöhte TNF- α Expression im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen, allerdings führte die Überexpression von PARP-1 in LPS-stimulierten Klonen zu keiner stärkeren TNF- α Expression im Vergleich zu LPS-stimulierten Wildtypzellen (Abb. 26A). Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, da PARP^{+/+} und PARP^{-/-} Mäuse extreme Unterschiede in der TNF- α Expression nach LPS-Stimulierung aufweisen (LIAUDET *et al.*, 2002). Bemerkenswerterweise wurde die TNF- α Expression sowohl in LPS-stimulierten PARP-1 überexprimierenden Zellen als auch in LPS-stimulierten Wildtypzellen durch

die Infektion mit *T. gondii* in ähnlichem Maße herunterreguliert (Abb. 26A). In Bezug auf die Wildtypzellen korrelierte dies mit anderen Studien, in denen ebenfalls eine Herunterregulation der LPS-stimulierten TNF- α Expression durch *T. gondii* zu beobachten ist (DENKERS, 2003). Dass auch die PARP-1 überexprimierenden Zellen eine vergleichbare Herunterregulation der LPS-stimulierten TNF- α Expression zeigten, könnte auf die Notwendigkeit der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PARP-1, nicht aber auf die absolute Menge des Proteins zurückzuführen sein. Dies würde mit den starken Unterschieden in PARP^{+/+} und in PARP^{-/-} Mäusen bezüglich der TNF- α Expression nach LPS-Stimulierung (LIAUDET *et al.*, 2002) korrelieren. Die hier vorliegenden Daten sprechen dafür, dass eine Überexpression von PARP-1 keinen Einfluss bei der LPS-stimulierten TNF- α Expression hatte.

Im Gegensatz dazu war die mRNA Expression des Chemokins Makrophage Inflammatory Protein (MIP)-2 in LPS-stimulierten PARP-1 überexprimierenden Makrophagen im Vergleich zu LPS-stimulierten Wildtypzellen erhöht (Abb. 26B). Auch in PARP^{+/+} und in PARP^{-/-} Mäusen werden extreme Unterschiede in der MIP-2 Expression nach LPS-Stimulierung beobachtet (LIAUDET *et al.*, 2002). Außerdem zeigt sowohl die pharmakologische Inhibierung sowie die genetische Deletion von PARP-1 eine starke Unterdrückung der Expression der Chemokine MIP-1 α und MIP-2 bei entzündlichen Erkrankungen (HASKO *et al.*, 2002). Daher war auch eine mutmaßliche Zunahme der MIP-2 Expression nach LPS-Stimulierung in PARP-1 überexprimierenden Makrophagen im Vergleich zu Wildtypzellen möglich. Ausgehend von dem erhöhten PARP-1-Grundlevel in PARP-1 überexprimierenden Makrophagen war *T. gondii* in der Lage, die MIP-2 Expression um einen vergleichbaren Level wie in Wildtypzellen zu inhibieren. Dennoch zeigte dies, dass PARP-1 offensichtlich bei der MIP-2 Expression Regulatorfunktion hatte. Durch die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* könnte der MIP-2-Level unter einen Schwellenwert fallen, der die Entwicklung des Parasiten im Wirt begünstigte. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung der PARP-1-Inhibierung nach Infektion mit *T. gondii* sein.

Es ist denkbar, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 und die daraus resultierende MIP-2 Inhibierung ein bisher unbekannter Weg des Parasiten ist, in pro-inflammatorische Chemokin-vermittelte Abwehrmechanismen der Wirtszelle einzugreifen. Diese Hypothese wird von der Tatsache untermauert, dass die Chemokin-Suppression eine wichtige Rolle bei der anti-inflammatorischen Wirkung

der PARP-1-Inhibierung spielt (HASKO *et al.*, 2002). Durch die Inhibierung der Expression von PARP-1 könnte *T. gondii* die Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen und die Infiltration von inflammatorischen Zellen vermindern. Ein ähnlicher Effekt konnte für die chronische Erkrankung Asthma nachgewiesen werden (VIRAG *et al.*, 2004). Die Untersuchung von weiteren PARP-1- und NF- κ B-regulierten Chemokinen, wie z.B. MIP-1 α (HASSA und HOTTIGER, 2002), könnte darüber Aufschluss geben, ob es sich tatsächlich um eine bisher unbekannte Interaktion von *T. gondii* mit einem pro-inflammatorischen Chemokin-vermittelten Abwehrmechanismus der Wirtszelle handelt.

Neben Cytokinen wie TNF- α und Chemokinen wie MIP-2 und MIP-1 α werden auch Adhäsionsmoleküle wie das Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 durch PARP-1 und dessen Koaktivatorfunktion von NF- κ B beeinflusst (HASSA und HOTTIGER, 2002). Dabei zeigt sich bei Mikroarrayanalysen von mit LPS stimulierten PARP^{+/+} Gliazellen eine deutlich höhere Transkription von ICAM-1 im Vergleich zu PARP^{-/-} Gliazellen (HA *et al.*, 2002). Auch in Fibroblasten von PARP^{-/-} Mäusen ist die Cytokin-stimulierte Expression von ICAM-1 deutlich reduziert im Vergleich zu Fibroblasten von PARP^{+/+} Mäusen. Außerdem führt eine pharmakologische Inhibierung der Expression von PARP-1 mit 3-Aminobenzidin zu einer Inhibierung der Expression von ICAM-1 (ZINGARELLI *et al.*, 1998). Auch Wachstumsfaktoren wie einige Mitglieder der IGFBP-Familie zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Expression in Wildtypzellen im Vergleich zu PARP^{-/-} primären Fibroblasten. Während IGFBP-5 eine 4.5-fach niedrigere Expression in Wildtypzellen zeigt, ist die Expression von IGFBP-4 in Wildtypzellen um das 20 fache höher als in PARP^{-/-} Fibroblasten (SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch die LPS-stimulierte Expression von ICAM-1 und IGFBP-4 in PARP-1 überexprimierenden Monocyten/Makrophagen und deren Wildtypzellen mit und ohne Infektion mit *T. gondii* untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch weder eine verstärkte Expression von ICAM-1 noch von IGFBP-4 nach Stimulierung mit LPS in Wildtypzellen und auch nicht in PARP-1 überexprimierenden Mutanten. Auch eine Infektion mit *T. gondii* führte zu keiner Veränderung der Expression von ICAM-1 und IGFBP-4 in Wildtypzellen oder Mutanten im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 26C und D). Auch wenn diese Ergebnisse der Literatur offensichtlich widersprechen muss festgehalten werden, dass es bisher keine Vergleiche zwischen PARP Wildtypzellen und PARP überexprimierenden Mutanten hinsichtlich der Expression von ICAM-1 und IGFBP-4

gibt. Stattdessen handelt es sich stets um den Vergleich zwischen PARP^{-/-} Zellen und PARP^{+/+} Zellen (ZINGARELLI *et al.*, 1998; HA *et al.*, 2002) oder um Vergleiche zwischen Wildtypzellen und mit PARP-Inhibitoren behandelten Zellen (ZINGARELLI *et al.*, 1998; SZABO *et al.*, 2002; PICONI *et al.*, 2004; SCOTT *et al.*, 2004; HADDAD *et al.*, 2006). Es ist also durchaus denkbar, dass eine Überexpression von PARP-1 nicht notwendigerweise zu einer verstärkten ICAM-1 oder IGFBP-4 Expression führt. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Resultate könnte in den unterschiedlichen verwendeten Zelltypen liegen. Obwohl die hier vorliegenden Daten den Ergebnissen von Simbulan-Rosenthal und Kollegen widersprechen, korrelieren sie mit den Ergebnissen einer neueren Studie. So zeigt das mRNA-Profil von IGFBP-4 in Skelettmuskelgewebe keine Veränderung durch LPS oder Sepsis (LANG CH *et al.*, 2006).

Daten aus anderen Labors legen die Vermutung nahe, dass zwischen der hier beobachteten schnellen PARP-1-Inhibierung während der frühen Infektion mit *T. gondii* und der von anderen beobachteten Auswirkung der *T. gondii*-Infektion auf NF- κ B in Makrophagen ein Zusammenhang bestehen könnte. So kann 2 h p.i. keine nukleäre Lokalisierung von p65 oder c-Rel, Untereinheiten von NF- κ B, in mit *T. gondii* infizierten Makrophagen beobachtet werden (SHAPIRA *et al.*, 2002). Auch in peritonealen Makrophagen wird 2 h nach Infektion mit *T. gondii* keine Aktivierung von NF- κ B gefunden (BUTCHER *et al.*, 2001). Zudem kann keine Transkription von einigen NF- κ B-regulierten Genen, wie IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α und iNOS nachgewiesen werden. Die Daten der hier vorliegenden Arbeiten zeigten eine Inhibierung der Expression von PARP-1 sowohl in Wildtypzellen als auch in PARP-1 überexprimierenden Mutanten während der ersten Stunden der Infektion. Da der Parasit auch die erhöhten PARP-1 Level der Mutanten in vergleichbarer Weise über einen langen Zeitraum reduzieren konnte, war ein Effekt durch die Überexpression nur vor Infektion möglich. Dies ließ sich anhand der MIP-2 Expressionsprofile erkennen. Bei TNF- α hingegen schien, wie bereits erwähnt, nur die Anwesenheit von PARP-1 für die Expression ausschlaggebend zu sein, nicht aber die absolute Menge des Proteins in der Zelle, und damit hatte auch die Überexpression in Mutanten keinerlei Auswirkung auf die TNF- α Expression. Interessant wäre es nun, weitere NF- κ B-regulierte Gene, wie z.B. iNOS, IL-12 etc., in Bezug auf ihre Expression zu untersuchen.

4.5.3 Apoptose in infizierten Wirtszellen

Die Apoptose stellt einen wichtigen Mechanismus in mehrzelligen Organismen während Embryogenese bzw. Homeostase dar, um funktionslose oder geschädigte Zellen des Organismus zu entfernen (HUPPERTZ *et al.*, 1999). Dies geschieht in einer strikt regulierten Weise und verhindert entzündungsbedingte Schädigungen von umliegendem Gewebe. Auch bei Infektionen durch Pathogene spielt der programmierte Zelltod für den Wirt eine wichtige Rolle. Vom Immunsystem als infiziert erkannte Zellen können durch Apoptose eliminiert werden bevor sich die Infektion auf andere Zellen ausbreitet. Aus diesem Grund greifen viele intrazelluläre Pathogene in die Apoptoseregulation des Wirtes ein, entweder indem die Apoptose inhibiert oder induziert wird (SCHAUMBURG *et al.*, 2006). Verschiedene Viren wie das Epstein-Barr-Virus (GREGORY *et al.*, 1991), oder der Erreger des afrikanischen Schweinefiebers (REVILLA *et al.*, 1997), Bakterien wie *Coxiella burnetti* (VOTH *et al.*, 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (ZHANG *et al.*, 2004) oder *Wolbachia* (PANNEBAKKER *et al.*, 2007) und protozoische Parasiten wie *Leishmania donovani* (MOORE und MATLASHEWSKI, 1994), *Theileria parva* (HEUSSLER *et al.*, 1999) und *T. gondii* (GOEBEL *et al.*, 1998; NASH *et al.*, 1998; KELLER *et al.*, 2006) inhibieren die Apoptose in Wirtszellen. Einige virale (TAKIZAWA *et al.*, 1993), bakterielle (ZYCHLINSKY *et al.*, 1992; CHEN und ZYCHLINSKY, 1994; MULLER *et al.*, 1996; BELYI *et al.*, 2006) und eukaryontische (KHAN *et al.*, 1996; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2007) Pathogene induzieren dagegen die Apoptose in bestimmten Wirtszellen. *T. gondii* hat sowohl Mechanismen entwickelt, um die Apoptose in Wirtszellen zu inhibieren (GOEBEL *et al.*, 1998; NASH *et al.*, 1998; GOEBEL *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2006), als auch in bestimmten Immunzellpopulationen zu induzieren (KHAN *et al.*, 1996; LÜDER und GROSS, 2005; SCHAUMBURG *et al.*, 2006). Dabei bildet sich ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Replikation und Überleben von *T. gondii* und dem Überleben des Wirtes.

PARP-1 steht im Zusammenhang mit verschiedenen Formen des programmierten Zelltodes wie dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF)-abhängigen Zelltod (YU *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2003), einer verstärkten Sensibilität gegenüber Endonukleasen während der frühen Phase der Apoptose (SIMBULAN-ROSENTHAL *et al.*, 1998) und einer Anfälligkeit für verschiedene Apoptose-Induktoren (TANAKA *et al.*, 1995b; PACINI *et al.*, 1999). Die Spaltung von PARP-1 durch die Caspase 3 stellt einen Regulationsmechanismus im Ablauf der Apoptose dar und wird auch als zentraler

Nachweisparameter für Apoptose verwendet (DURIEZ und SHAH, 1997). Aus diesem Grund wird die Spaltung von PARP-1 durch die Caspase 3 als wichtige Größe für den Nachweis der Inhibierung der Apoptose nach Infektion mit Pathogenen verwendet (GOEBEL *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; VOTH *et al.*, 2007). Dabei zeigt sich in mit *Coxiella burnetii* (VOTH *et al.*, 2007) bzw. *T. gondii* (GOEBEL *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2007) infizierten Wirtszellen eine reduzierte Spaltung von PARP-1 nach Apoptose-Induktion mit Staurosporin bzw. Actinomycin-D. Gleichzeitig ist die Actinomycin-induzierte Apoptose in *Toxoplasma*-infizierten Zellen deutlich gehemmt. Außerdem gibt es Hinweise, dass PARP-1 bei Überaktivierung ein Pro-Apoptose-Signal darstellen könnte. Bei übermäßiger Aktivierung von PARP-1 kann es zu einer kompletten Leerung der NAD⁺ Speicher und damit zu einer starken Abnahme von ATP in der Zelle kommen, dies führt letztendlich zum Zelltod (ZHANG *et al.*, 1994; HA und SNYDER, 1999; PIEPER *et al.*, 1999; BOULU *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2005). Obwohl die genauen Zusammenhänge noch nicht geklärt sind, scheinen bei dieser Art von Zelltod der Übergang zur Permeabilität der Mitochondrien (MPA), die Freisetzung von AIF (ALANO *et al.*, 2004; YING *et al.*, 2005) und die Inhibierung der Glycolyse aufgrund der Depletion von ATP (YING *et al.*, 2005) eine Rolle zu spielen. Außerdem gibt es Vermutungen, dass diese Ereignisse in Zusammenhang mit der PARP Überaktivierung und NAD⁺ Depletion auf mindestens zwei Wegen zum Zelltod führen (YING, 2008). Daher wird aufgrund des parasiten-induzierten PARP-1-Abbaus und der Inhibierung der Apoptose durch *T. gondii* auf einen möglicherweise anti-apoptotischen Mechanismus geschlossen (GOEBEL *et al.*, 2001). Ob die Inhibierung der Apoptose durch eine Infektion mit *T. gondii* dabei auf die Inhibierung der Expression von PARP-1 zurück zu führen ist, und ob eine Überexpression von PARP-1 diesen Effekt aufheben kann, sollte daher mit Hilfe der PARP-1 überexprimierenden RAW 264.7 Monocyten/Makrophagen geklärt werden. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit zeigten jedoch deutlich, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 in infizierten Wirtszellen nicht den anti-apoptotischen Effekt durch *T. gondii* erklären konnte. Außerdem verhinderte eine Überexpression von PARP-1 in den Mutanten nicht die *T. gondii*-induzierte Inhibierung der Apoptose. Dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 nicht primär mit apoptotischen Abläufen in Verbindung stehen dürfte, deuteten schon frühere Untersuchungen an, in denen gezeigt wurde, dass die PARP-1-Proteinlevel durch eine Infektion mit *T. gondii* sowohl in apoptotischen, als auch in nicht-apoptotischen Zellen stark reduziert sind

(GOEBEL *et al.*, 2001). Die hier dargestellten eigenen Ergebnisse bestätigten diesen Sachverhalt deutlich, da 4 h p.i. die PARP-1-Proteinlevel in Wildtypzellen stark erniedrigt waren (Abb. 3B), wohingegen *T. gondii* die Caspase 3/7 Aktivität zu diesem Zeitpunkt nicht beeinflusste (Abb. 27). Umgekehrt ließ die transiente Inhibierung der Expression von PARP-1 24 h p.i. stark nach, während die Caspase 3/7 Aktivität zu diesem Zeitpunkt eine starke Inhibierung durch *T. gondii* erfuhr. Untermauert werden diese Daten von der Tatsache, dass *T. gondii* die Apoptose in mit Actinomycin-D behandelten Wirtszellen durch die Inaktivierung der Caspase 3 und die Aktivierung von NF- κ B inhibiert. Dabei wird auch die Inaktivierung von PARP-1 gezeigt (KIM *et al.*, 2006). Außerdem inhibiert *T. gondii* die Caspase 3 in einem zellfreien *in vitro* System (KELLER *et al.*, 2006).

Auch die Voraussetzungen seitens des Parasiten zeigten, dass die PARP-1-Inhibierung nicht für die Blockade der Apoptose durch *T. gondii* verantwortlich war. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch tote Parasiten PARP-1 inhibierten, was gegen einen aktiven Prozess sprach. Für die Inhibierung der Apoptose ist aber ein lebender Parasit unerlässlich (NASH *et al.*, 1998; GOEBEL *et al.*, 1999).

Allerdings bestand die Möglichkeit, dass die Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* mit einem Caspase-unabhängigen Pfad des programmierten Zelltodes in Zusammenhang stand. Es ist bekannt, dass PARP-1 die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien auslöst und so die Apoptose induziert (YU *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2004; VAN WIJK und HAGEMAN, 2005; AGUILAR-QUESADA *et al.*, 2007). Allerdings konnte bisher kein Anhaltspunkt gefunden werden, dass *T. gondii* in die Caspase-unabhängige Apoptose eingreift. Es werden ausschließlich Interaktionen von *T. gondii* mit dem Caspase-abhängigen extrinsischen (VUTOVA *et al.*, 2007; HIPPE *et al.*, 2008) und dem intrinsischen Signalweg der Wirtszellen (GOEBEL *et al.*, 1998; GOEBEL *et al.*, 2001; LÜDER und GROSS, 2005; KELLER *et al.*, 2006; SCHAUMBURG *et al.*, 2006) nachgewiesen. Daher wäre eine Inhibierung der Expression von PARP-1 durch *T. gondii* in Verbindung mit der Blockierung eines Caspase-unabhängigen Pfades des programmierten Zelltodes, z.B. über einen AIF-vermittelten Weg, sehr unwahrscheinlich, muss aber in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

Die PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* in infizierten Wirtszellen als anti-apoptotischer Mechanismus (GOEBEL *et al.*, 2001) konnte somit von uns widerlegt

werden. Zusammenfassend kann damit festgehalten werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Caspase-vermittelten Weg der Apoptose und der PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* ausgeschlossen wurde. Die Möglichkeit einer Interaktion zwischen dem AIF-vermittelten Zelltod und der PARP-1-Inhibierung nach Infektion mit *T. gondii* konnte nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein weit verbreiteter und obligat intrazellulärer protozoischer Parasit, der unter anderem in Menschen meist asymptomatische, lebenslang persistierende Infektionen hervorruft. Er ist aber auch ein wichtiger opportunistischer Krankheitserreger des Menschen. *T. gondii* hat Mechanismen entwickelt, um innerhalb seines Wirtes langfristig zu persistieren, dabei spielt ein balanciertes Parasit-Wirt-Verhältnis eine wichtige Rolle. *T. gondii* verändert dazu verschiedene Aspekte in der Wirtszellphysiologie und verursacht neben der Modulation von Wirtszell-Kompartimenten, der Interaktion mit Wirtszell-Signalwegen und der Apoptose auch die Inhibierung der Expression der Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)-1. PARP-1 ist ein nukleäres Protein und spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Abläufen einschließlich DNA Reparatur, Apoptose, Nekrose und Regulation der Genexpression. Außerdem ist es an der Pathogenese von verschiedenen Krankheiten wie entzündlich-chronischen Erkrankungen, Ischämie und Malaria beteiligt. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer Infektion mit *T. gondii* auf PARP-1 eingehend zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse über die Parasit-Wirt-Interaktionen während einer Toxoplasmose zu erlangen.

PARP-1-Proteinlevel wurden bereits innerhalb weniger Minuten nach Infektion von Mausmakrophagen mit *T. gondii* dosisabhängig inhibiert. Da diese Inhibierung in verschiedenen murinen und humanen Zelltypen beobachtet wurde, handelte es sich um ein generelles Phänomen einer *T. gondii*-Infektion. Die verminderten PARP-1 Proteinmengen führten zu einer signifikant verminderten ADP-Ribosylierung in infizierten Wirtszellen. Vergleichende Untersuchungen mit virulenten und avirulenten *T. gondii* Stämmen widerlegten die Theorie einer genotyp- oder virulenzabhängigen PARP-1-Inhibierung. Die Inhibierung erfolgte posttranskriptional und unabhängig von einer funktionsfähigen Translationsmaschinerie der Wirtszelle. Durch den Einsatz von Proteasominhibitoren wurde ein *Toxoplasma*-induzierter PARP-1-Abbau durch Wirtszellproteasomen weitgehend ausgeschlossen. Versuche mit unterschiedlich behandelten Parasiten zeigten, dass die PARP-1-Inhibierung unabhängig von Invasions- oder Replikationsfähigkeit von *T. gondii* stattfand, denn auch tote Parasiten waren zur PARP-1-Inhibierung in der Lage. Die Sekretion von Wirtszell-eigenen Molekülen, die durch Infektion mit *T. gondii* induziert wurden, konnte als zugrunde liegender Mechanismus weitgehend ausgeschlossen werden. Dagegen

war ein direkter Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle nötig, wie Experimente mit einem *in vitro* Transwell-System zeigten. Dabei schien ein bisher nicht näher identifiziertes Effektormolekül in der Parasitenmembran für die Herunterregulation von PARP-1 verantwortlich zu sein, wie Fraktionierungen von Parasitenextrakten nahelegten. Das Hauptoberflächenantigen von *Toxoplasma*, SAG-1, konnte jedoch als parasitäres Effektormolekül ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnte es sich bei dem Effektormolekül um eine Protease von *T. gondii* handeln.

Um die funktionelle Bedeutung von PARP-1 und dessen Modulation durch *Toxoplasma* zu untersuchen, wurde PARP-1 in Monocyten/Makrophagen der Maus stabil überexprimiert (PARP-1^{hoch} Mutanten). Bemerkenswerterweise inhibierte *T. gondii* nach Infektion die PARP-1-Proteinlevel in überexprimierenden Mutanten auf das gleiche Niveau wie in Wildtypzellen. Die zumindest teilweise erhöhten PARP-1-Proteinmengen in PARP-1^{hoch} Mutanten hatten keinen Einfluss auf Invasion und Replikation des Parasiten im Vergleich zu Wildtypzellen. Expressionsprofile von NF- κ B-regulierten Genen in PARP-1 überexprimierenden Mutanten und Wildtypzellen zeigten, dass PARP-1 an der parasiten-vermittelten Verminderung von MIP-2, nicht aber jener von TNF- α beteiligt zu sein schien. Die PARP-1-Inhibierung durch *T. gondii* könnte daher ein bisher unbekannter Mechanismus des Parasiten sein, in pro-inflammatorische Chemokin-vermittelte Abwehrmechanismen der Wirtszelle einzugreifen. Die zumindest zeitweise Überexpression von PARP-1 verhinderte jedoch nicht die *T. gondii*-abhängige Inhibierung der Staurosporin-induzierten Wirtszellapoptose, wobei ein Effekt auf Caspase-unabhängige Apoptosewege nicht ausgeschlossen werden konnte.

Durch diese Arbeit konnten neue Zusammenhänge zwischen *T. gondii* und der PARP-1-Inhibierung in Wirtszellen aufgezeigt werden, die zu einem besseren Verständnis der Parasit-Wirt-Interaktionen während einer Toxoplasmose beitragen.

6. Literatur

Aguilar-Quesada, R, Munoz-Gamez, JA, Martin-Oliva, D, Peralta-Leal, A, Quiles-Perez, R, Rodriguez-Vargas, JM, de Almodovar, MR, Conde, C, Ruiz-Extremera, A and Oliver, FJ (2007). Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation
Curr Med Chem. **14**, 1179-87

Ahn, HJ, Song, KJ, Son, ES, Shin, JC and Nam, HW (2001). Protease activity and host cell binding of the 42-kDa rhoptry protein from *Toxoplasma gondii* after secretion
Biochem Biophys Res Commun. **287**, 630-5

Alano, CC, Ying, W and Swanson, RA (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition
J Biol Chem. **279**, 18895-902

Alexander, DL, Mital, J, Ward, GE, Bradley, P and Boothroyd, JC (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles
PLoS Pathog. **1**, e17

Almeida, IC, Camargo, MM, Procopio, DO, Silva, LS, Mehlert, A, Travassos, LR, Gazzinelli, RT and Ferguson, MA (2000). Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents
Embo J. **19**, 1476-85

Almeida, IC and Gazzinelli, RT (2001). Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses
J Leukoc Biol. **70**, 467-77

Altmann, H (1983). [Poly-(ADP ribose) synthesis and regulation disorders in disease]
Wien Klin Wochenschr. **95**, 861-4

Ame, JC, Spenlehauer, C and de Murcia, G (2004). The PARP superfamily
Bioessays. **26**, 882-93

Bakondi, E, Bai, P, Szabo, EE, Hunyadi, J, Gergely, P, Szabo, C and Virag, L (2002). Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate
J Histochem Cytochem. **50**, 91-8

Beckers, CJ, Dubremetz, JF, Mercereau-Puijalon, O and Joiner, KA (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm
J Cell Biol. **127**, 947-61

- Belloni, A, Villena, I, Gomez, JE, Pelloux, H, Bonhomme, A, Guenounou, M, Pinon, JM and Aubert, D** (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha and its specific receptors during *Toxoplasma gondii* infection in human monocytic cells
Parasitol Res. **89**, 207-13
- Belyi, Y, Niggeweg, R, Opitz, B, Vogelsgesang, M, Hippenstiel, S, Wilm, M and Aktories, K** (2006). Legionella pneumophila glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A
Proc Natl Acad Sci U S A. **103**, 16953-8
- Berger, NA** (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage
Radiat Res. **101**, 4-15
- Beyer, TV, Svezhova, NV, Radchenko, AI and Sidorenko, NV** (2002). Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem)
Cell Biol Int. **26**, 861-71
- Blader, IJ, Manger, ID and Boothroyd, JC** (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells
J Biol Chem. **276**, 24223-31
- Bohne, W, Heesemann, J and Gross, U** (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion
Infect Immun. **62**, 1761-7
- Bohne, W, Holpert, M and Gross, U** (1999). Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*
Immunobiology. **201**, 248-54
- Bonametti, AM, Passos, JN, Koga da Silva, EM and Macedo, ZS** (1997). Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding
J Trop Pediatr. **43**, 116
- Boulares, AH, Zoltoski, AJ, Sherif, ZA, Jolly, P, Massaro, D and Smulson, ME** (2003). Gene knockout or pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 prevents lung inflammation in a murine model of asthma
Am J Respir Cell Mol Biol. **28**, 322-9
- Boulu, RG, Mesenge, C, Charriaut-Marlangue, C, Verrecchia, C and Plotkine, M** (2001). [Neuronal death: potential role of the nuclear enzyme, poly (ADP-ribose) polymerase]
Bull Acad Natl Med. **185**, 555-63; discussion 564-5
- Brenier-Pinchart, MP, Villena, I, Mercier, C, Durand, F, Simon, J, Cesbron-Delauw, MF and Pelloux, H** (2006). The *Toxoplasma* surface protein SAG1 triggers efficient in vitro secretion of chemokine ligand 2 (CCL2) from human fibroblasts
Microbes Infect. **8**, 254-61

- Brodskyn, C, Patricio, J, Oliveira, R, Lobo, L, Arnholdt, A, Mendonca-Previato, L, Barral, A and Barral-Netto, M** (2002). Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses
Infect Immun. **70**, 3736-43
- Buitrago-Rey, R, Olarte, J and Gomez-Marin, JE** (2002). Evaluation of two inhibitors of invasion: LY311727 [3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indolyl-5-oxy)propane phosphonic acid] and AEBSF [4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride] in acute murine toxoplasmosis
J Antimicrob Chemother. **49**, 871-4
- Burkle, A, Diefenbach, J, Brabeck, C and Beneke, S** (2005). Ageing and PARP
Pharmacol Res. **52**, 93-9
- Butcher, BA, Kim, L, Johnson, PF and Denkers, EY** (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B
J Immunol. **167**, 2193-201
- Buxton, D** (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine
Parasitol Today. **9**, 335-7
- Carruthers, VB and Sibley, LD** (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts
Eur J Cell Biol. **73**, 114-23
- Carruthers, VB** (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells
Parasitol Int. **48**, 1-10
- Cepeda, V, Fuertes, MA, Castilla, J, Alonso, C, Quevedo, C, Soto, M and Perez, JM** (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy
Recent Patents Anticancer Drug Discov. **1**, 39-53
- Chang, WJ and Alvarez-Gonzalez, R** (2001). The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1
J Biol Chem. **276**, 47664-70
- Chardes, T, Bourguin, I, Mevelec, MN, Dubremetz, JF and Bout, D** (1990). Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens
Infect Immun. **58**, 1240-6
- Chardes, T, Velge-Roussel, F, Mevelec, P, Mevelec, MN, Buzoni-Gatel, D and Bout, D** (1993). Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice
Immunology. **78**, 421-9
- Chen, Y and Zychlinsky, A** (1994). Apoptosis induced by bacterial pathogens

Microb Pathog. **17**, 203-12

Chiou, SH, Liu, JH, Chen, SS, Liu, WT, Lin, JC, Wong, WW, Tseng, WS, Chou, CK, Liu, CY, Ho, LL and Hsu, WM (2002). Apoptosis of human retina and retinal pigment cells induced by human cytomegalovirus infection
Ophthalmic Res. **34**, 77-82

Clark, IA and Cowden, WB (2003). The pathophysiology of falciparum malaria
Pharmacol Ther. **99**, 221-60

Clark, IA, Alleva, LM, Mills, AC and Cowden, WB (2004). Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions
Clin Microbiol Rev. **17**, 509-39, table of contents

Conseil, V, Soete, M and Dubremetz, JF (1999). Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*
Antimicrob Agents Chemother. **43**, 1358-61

Cruz Cubas, AB, Gentilini, M and Monjour, L (1994). Cytokines and T-cell response in malaria
Biomed Pharmacother. **48**, 27-33

Cuzzocrea, S (2005). Shock, inflammation and PARP
Pharmacol Res. **52**, 72-82

Cuzzocrea, S and Wang, ZQ (2005). Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) in shock, ischemia and reperfusion
Pharmacol Res. **52**, 100-8

Decker, P and Muller, S (2002). Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress
Curr Pharm Biotechnol. **3**, 275-83

Denkers, EY (2003). From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*
FEMS Immunol Med Microbiol. **39**, 193-203

Denkers, EY, Butcher, BA, Del Rio, L and Kim, L (2004). Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection
Immunol Rev. **201**, 191-205

Denkers, EY and Butcher, BA (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans
Trends Parasitol. **21**, 35-41

Denney, CF, Eckmann, L and Reed, SL (1999). Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection
Infect Immun. **67**, 1547-52

- Deszcz, L, Gaudernak, E, Kuechler, E and Seipelt, J** (2005). Apoptotic events induced by human rhinovirus infection
J Gen Virol. **86**, 1379-89
- Diana, J, Vincent, C, Peyron, F, Picot, S, Schmitt, D and Persat, F** (2005). Toxoplasma gondii regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors
Clin Exp Immunol. **141**, 475-84
- Ding, M, Kwok, LY, Schluter, D, Clayton, C and Soldati, D** (2004). The antioxidant systems in Toxoplasma gondii and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury
Mol Microbiol. **51**, 47-61
- Dobrowolski, JM and Sibley, LD** (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite
Cell. **84**, 933-9
- Dobrowolski, JM, Carruthers, VB and Sibley, LD** (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii
Mol Microbiol. **26**, 163-73
- Dowse, TJ and Soldati, D** (2005). Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature
Trends Parasitol. **21**, 254-8
- Dubey, JP, Miller, NL and Frenkel, JK** (1970). The Toxoplasma gondii oocyst from cat feces
J Exp Med. **132**, 636-62
- Dubey, JP** (1991). Toxoplasmosis--an overview
Southeast Asian J Trop Med Public Health. **22 Suppl**, 88-92
- Dubey, JP and Rommel, M** (1992). [Abortions caused by protozoa in agricultural animals]
Dtsch Tierarztl Wochenschr. **99**, 355-62
- Dubey, JP, Lindsay, DS and Speer, CA** (1998). Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts
Clin Microbiol Rev. **11**, 267-99
- Dubremetz, JF, Garcia-Reguet, N, Conseil, V and Fourmaux, MN** (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa
Int J Parasitol. **28**, 1007-13
- Duriez, PJ and Shah, GM** (1997). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death
Biochem Cell Biol. **75**, 337-49

- Endo, T, Pelster, B and Piekarski, G** (1981). Infection of murine peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii* exposed to ultraviolet light
Z Parasitenkd. **65**, 121-9
- Feldman, HA** (1968). Toxoplasmosis
N Engl J Med. **279**, 1370-5 contd
- Ferguson, DJ, Hutchison, WM and Siim, JC** (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*
Acta Pathol Microbiol Scand [B]. **83**, 491-505
- Ferguson, DJ, Birch-Andersen, A, Siim, JC and Hutchison, WM** (1979). Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts
Acta Pathol Microbiol Scand [B]. **87**, 253-60
- Fichera, ME and Roos, DS** (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites
Nature. **390**, 407-9
- Fischer, HG, Nitzgen, B, Reichmann, G and Hadding, U** (1997). Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells
Eur J Immunol. **27**, 1539-48
- Forget, G, Gregory, DJ and Olivier, M** (2005). Proteasome-mediated degradation of STAT1 α following infection of macrophages with *Leishmania donovani*
J Biol Chem. **280**, 30542-9
- Fox, BA, Gigley, JP and Bzik, DJ** (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation
Int J Parasitol. **34**, 323-31
- Frenkel, JK, Dubey, JP and Miller, NL** (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts
Science. **167**, 893-6
- Froelich, CJ, Hanna, WL, Poirier, GG, Duriez, PJ, D'Amours, D, Salvesen, GS, Alnemri, ES, Earnshaw, WC and Shah, GM** (1996). Granzyme B/perforin-mediated apoptosis of Jurkat cells results in cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase to the 89-kDa apoptotic fragment and less abundant 64-kDa fragment
Biochem Biophys Res Commun. **227**, 658-65
- Gail, M, Gross, U and Bohne, W** (2001). Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization
Mol Genet Genomics. **265**, 905-12
- Garcia, S, Bodano, A, Pablos, JL, Gomez-Reino, JJ and Conde, C** (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces tumor necrosis factor-induced inflammatory response in rheumatoid synovial fibroblasts

Ann Rheum Dis. **67**, 631-7

Gazzinelli, RT, Camargo, MM, Almeida, IC, Morita, YS, Giraldo, M, Acosta-Serrano, A, Hieny, S, Englund, PT, Ferguson, MA, Travassos, LR and Sher, A (1997). Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages
Chem Immunol. **68**, 136-52

Gobeil, S, Boucher, CC, Nadeau, D and Poirier, GG (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases
Cell Death Differ. **8**, 588-94

Goebel, S, Lüder, CG, Lugert, R, Bohne, W and Gross, U (1998). Toxoplasma gondii inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells
Tokai J Exp Clin Med. **23**, 351-6

Goebel, S, Lüder, CG and Gross, U (1999). Invasion by Toxoplasma gondii protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis
Med Microbiol Immunol. **187**, 221-6

Goebel, S, Gross, U and Lüder, CG (2001). Inhibition of host cell apoptosis by Toxoplasma gondii is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression
J Cell Sci. **114**, 3495-505

Gonzalez-Rey, E, Martinez-Romero, R, O'Valle, F, Aguilar-Quesada, R, Conde, C, Delgado, M and Oliver, FJ (2007). Therapeutic Effect of a Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitor on Experimental Arthritis by Downregulating Inflammation and Th1 Response
PLoS ONE. **2**, e1071

Gregory, CD, Dive, C, Henderson, S, Smith, CA, Williams, GT, Gordon, J and Rickinson, AB (1991). Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis
Nature. **349**, 612-4

Grimwood, J and Smith, JE (1992). Toxoplasma gondii: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion
Exp Parasitol. **74**, 106-11

Gross, U, Muller, WA, Knapp, S and Heesemann, J (1991). Identification of a virulence-associated antigen of Toxoplasma gondii by use of a mouse monoclonal antibody
Infect Immun. **59**, 4511-6

Ha, HC and Snyder, SH (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion
Proc Natl Acad Sci U S A. **96**, 13978-82

- Ha, HC, Juluri, K, Zhou, Y, Leung, S, Hermankova, M and Snyder, SH** (2001). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for efficient HIV-1 integration
Proc Natl Acad Sci U S A. **98**, 3364-8
- Ha, HC, Hester, LD and Snyder, SH** (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia
Proc Natl Acad Sci U S A. **99**, 3270-5
- Haddad, M, Rhinn, H, Bloquel, C, Coqueran, B, Szabo, C, Plotkine, M, Scherman, D and Margail, I** (2006). Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice
Br J Pharmacol. **149**, 23-30
- Hasko, G, Mabley, JG, Nemeth, ZH, Pacher, P, Deitch, EA and Szabo, C** (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase is a regulator of chemokine production: relevance for the pathogenesis of shock and inflammation
Mol Med. **8**, 283-9
- Hassa, PO and Hottiger, MO** (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders
Cell Mol Life Sci. **59**, 1534-53
- Hassa, PO, Haenni, SS, Buerki, C, Meier, NI, Lane, WS, Owen, H, Gersbach, M, Imhof, R and Hottiger, MO** (2005). Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription
J Biol Chem. **280**, 40450-64
- Hassa, PO, Haenni, SS, Elser, M and Hottiger, MO** (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?
Microbiol Mol Biol Rev. **70**, 789-829
- Herceg, Z and Wang, ZQ** (2001). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death
Mutat Res. **477**, 97-110
- Heussler, VT, Machado, J, Jr., Fernandez, PC, Botteron, C, Chen, CG, Pearse, MJ and Dobbelaere, DA** (1999). The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis
Proc Natl Acad Sci U S A. **96**, 7312-7
- Heussler, VT, Kuenzi, P and Rottenberg, S** (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites
Int J Parasitol. **31**, 1166-76
- Hippe, D, Lytovchenko, O, Schmitz, I and Lüder, CG** (2008). Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop
Infect Immun.

- Hong, SJ, Dawson, TM and Dawson, VL** (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling
Trends Pharmacol Sci. **25**, 259-64
- Horvath, EM and Szabo, C** (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase as a drug target for cardiovascular disease and cancer: an update
Drug News Perspect. **20**, 171-81
- Huppertz, B, Frank, HG and Kaufmann, P** (1999). The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization
Anat Embryol (Berl). **200**, 1-18
- Jackson, MH and Hutchison, WM** (1989). The prevalence and source of Toxoplasma infection in the environment
Adv Parasitol. **28**, 55-105
- Jacobs, L, Remington, JS and Melton, ML** (1960). The resistance of the encysted form of Toxoplasma gondii
J Parasitol. **46**, 11-21
- Joiner, KA, Fuhrman, SA, Miettinen, HM, Kasper, LH and Mellman, I** (1990). Toxoplasma gondii: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts
Science. **249**, 641-6
- Joiner, KA** (1991). Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue
Parasitol Today. **7**, 226-7
- Jones, TC and Hirsch, JG** (1972). The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites
J Exp Med. **136**, 1173-94
- Kameoka, M, Ota, K, Tetsuka, T, Tanaka, Y, Itaya, A, Okamoto, T and Yoshihara, K** (2000). Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase
Biochem J. **346 Pt 3**, 641-9
- Kasper, LH, Crabb, JH and Pfefferkorn, ER** (1983). Purification of a major membrane protein of Toxoplasma gondii by immunoabsorption with a monoclonal antibody
J Immunol. **130**, 2407-12
- Kato, M, Claveria, FG, Maki, Y, Tanaka, T, Suzuki, N and Nagasawa, H** (2005). Toxoplasma gondii antigens GRA1 (p24) and SAG1 (p30): a comparison of their stimulatory influence on T-cell activation and cytokine expression in in vitro cultures
Pathobiology. **72**, 160-4

- Kaufmann, SH** (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note
Cancer Res. **49**, 5870-8
- Kaufmann, SH, Desnoyers, S, Ottaviano, Y, Davidson, NE and Poirier, GG** (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis
Cancer Res. **53**, 3976-85
- Kawana, K, Quayle, AJ, Ficarra, M, Ibane, JA, Shen, L, Kawana, Y, Yang, H, Marrero, L, Yavagal, S, Greene, SJ, Zhang, YX, Pyles, RB, Blumberg, RS and Schust, DJ** (2007). CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity
J Biol Chem. **282**, 7368-75
- Keller, P, Schaumburg, F, Fischer, SF, Hacker, G, Gross, U and Lüder, CG** (2006). Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by Toxoplasma gondii reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis
FEMS Microbiol Lett. **258**, 312-9
- Khan, IA, Matsuura, T and Kasper, LH** (1996). Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute Toxoplasma gondii infection in mice
Int Immunol. **8**, 887-96
- Kim, JY, Ahn, MH, Jun, HS, Jung, JW, Ryu, JS and Min, DY** (2006). Toxoplasma gondii inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation
Yonsei Med J. **47**, 862-9
- Kim, L and Denkers, EY** (2006). Toxoplasma gondii triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis
J Cell Sci. **119**, 2119-26
- Kim, MY, Zhang, T and Kraus, WL** (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal
Genes Dev. **19**, 1951-67
- Kim, SK, Fouts, AE and Boothroyd, JC** (2007). Toxoplasma gondii dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling
J Immunol. **178**, 5154-65
- Kininis, M and Kraus, WL** (2008). A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis
Nucl Recept Signal. **6**, e005
- Knoll, LJ and Boothroyd, JC** (1998). Molecular Biology's Lessons about Toxoplasma Development: Stage-specific Homologs
Parasitol Today. **14**, 490-3

- Koskiniemi, M, Lappalainen, M and Hedman, K** (1989). Toxoplasmosis needs evaluation. An overview and proposals
Am J Dis Child. **143**, 724-8
- Lai, XH and Sjostedt, A** (2003). Delineation of the molecular mechanisms of Francisella tularensis-induced apoptosis in murine macrophages
Infect Immun. **71**, 4642-6
- Lang, C, Aligner, M, Beinert, N, Gross, U and Lüder, CG** (2006). Diverse mechanisms employed by Toxoplasma gondii to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression
Microbes Infect. **8**, 1994-2005
- Lang, C, Gross, U and Lüder, CG** (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by Toxoplasma Gondii
Parasitol Res. **100**, 191-203
- Lang, CH, Krawiec, BJ, Huber, D, McCoy, JM and Frost, RA** (2006). Sepsis and inflammatory insults downregulate IGFBP-5, but not IGFBP-4, in skeletal muscle via a TNF-dependent mechanism
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **290**, R963-72
- Lebech, M, Joynson, DH, Seitz, HM, Thulliez, P, Gilbert, RE, Dutton, GN, Ovlisen, B and Petersen, E** (1996). Classification system and case definitions of Toxoplasma gondii infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **15**, 799-805
- Lecker, SH, Goldberg, AL and Mitch, WE** (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states
J Am Soc Nephrol. **17**, 1807-19
- Lekutis, C, Ferguson, DJ, Grigg, ME, Camps, M and Boothroyd, JC** (2001). Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme
Int J Parasitol. **31**, 1285-92
- Liaudet, L, Pacher, P, Mabley, JG, Virag, L, Soriano, FG, Hasko, G and Szabo, C** (2002). Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation
Am J Respir Crit Care Med. **165**, 372-7
- Liaudet, L and Oddo, M** (2003). Role of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 in septic peritonitis
Curr Opin Crit Care. **9**, 152-8
- Lin, C, Holland, RE, Jr., Donofrio, JC, McCoy, MH, Tudor, LR and Chambers, TM** (2002). Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death
Vet Microbiol. **84**, 357-65

- Lüder, CG, Lang, T, Beuerle, B and Gross, U** (1998). Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*
Clin Exp Immunol. **112**, 308-16
- Lüder, CG, Gross, U and Lopes, MF** (2001a). Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions
Trends Parasitol. **17**, 480-6
- Lüder, CG, Walter, W, Beuerle, B, Maeurer, MJ and Gross, U** (2001b). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha
Eur J Immunol. **31**, 1475-84
- Lüder, CG, Aligner, M, Lang, C, Bleicher, N and Gross, U** (2003a). Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages
Int J Parasitol. **33**, 833-44
- Lüder, CG, Lang, C, Giraldo-Velasquez, M, Aligner, M, Gerdes, J and Gross, U** (2003b). *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA
J Neuroimmunol. **134**, 12-24
- Lüder, CG and Gross, U** (2005). Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis
Curr Top Microbiol Immunol. **289**, 219-37
- Luft, BJ, Naot, Y, Araujo, FG, Stinson, EB and Remington, JS** (1983). Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population
Ann Intern Med. **99**, 27-31
- Luft, BJ, Brooks, RG, Conley, FK, McCabe, RE and Remington, JS** (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome
Jama. **252**, 913-7
- Luft, BJ and Remington, JS** (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS
Clin Infect Dis. **15**, 211-22
- Marechal, E and Cesbron-Delauw, MF** (2001). The apicoplast: a new member of the plastid family
Trends Plant Sci. **6**, 200-5
- Marinovich, M, Viviani, B, Corsini, E, Ghilardi, F and Galli, CL** (1996). NF-kappaB activation by triphenyltin triggers apoptosis in HL-60 cells
Exp Cell Res. **226**, 98-104

- Markowitz, MM, Rozen, P, Pero, RW, Tobi, M and Miller, DG** (1988). Hydrogen peroxide induced adenosine diphosphate ribosyl transferase (ADPRT) response in patients with inflammatory bowel disease
Gut. **29**, 1680-6
- Mattiussi, S, Tempera, I, Matusali, G, Mearini, G, Lenti, L, Fratarcangeli, S, Mosca, L, D'Erme, M and Mattia, E** (2007). Inhibition of Poly(ADP-ribose)polymerase impairs Epstein Barr Virus lytic cycle progression
Infect Agent Cancer. **2**, 18
- McFadden, DC, Seeber, F and Boothroyd, JC** (1997). Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro
Antimicrob Agents Chemother. **41**, 1849-53
- Michel, R, Schupp, K, Raether, W and Bierther, FW** (1980). Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro
Int J Parasitol. **10**, 309-13
- Mineo, JR and Kasper, LH** (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30)
Exp Parasitol. **79**, 11-20
- Mitchell, GH, Thomas, AW, Margos, G, Dluzewski, AR and Bannister, LH** (2004). Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells
Infect Immun. **72**, 154-8
- Molestina, RE, Payne, TM, Coppens, I and Sinai, AP** (2003). Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I kappa B to the parasitophorous vacuole membrane
J Cell Sci. **116**, 4359-71
- Moore, KJ and Matlashewski, G** (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis
J Immunol. **152**, 2930-7
- Mordue, DG, Desai, N, Dustin, M and Sibley, LD** (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring
J Exp Med. **190**, 1783-92
- Morisaki, JH, Heuser, JE and Sibley, LD** (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell
J Cell Sci. **108 (Pt 6)**, 2457-64
- Muller, A, Hacker, J and Brand, BC** (1996). Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection
Infect Immun. **64**, 4900-6

Muller, WE, Totsuka, A, Nusser, I, Obermeier, J, Rhode, HJ and Zahn, RK (1974). Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase in quail oviduct. Changes during estrogen and progesterone induction
Nucleic Acids Res. **1**, 1317-27

Mun, HS, Aosai, F, Norose, K, Chen, M, Piao, LX, Takeuchi, O, Akira, S, Ishikura, H and Yano, A (2003). TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection
Int Immunol. **15**, 1081-7

Murray, HW, Nathan, CF and Cohn, ZA (1980). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates
J Exp Med. **152**, 1610-24

Nagel, SD and Boothroyd, JC (1989). The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid
J Biol Chem. **264**, 5569-74

Nakajima, H, Nagaso, H, Kakui, N, Ishikawa, M, Hiranuma, T and Hoshiko, S (2004). Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells
J Biol Chem. **279**, 42774-86

Nash, PB, Purner, MB, Leon, RP, Clarke, P, Duke, RC and Curiel, TJ (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis
J Immunol. **160**, 1824-30

Nichols, BA, Chiappino, ML and O'Connor, GR (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion
J Ultrastruct Res. **83**, 85-98

Nirmala, J, Dahl, S, Steffenson, BJ, Kannangara, CG, von Wettstein, D, Chen, X and Kleinhofs, A (2007). Proteolysis of the barley receptor-like protein kinase RPG1 by a proteasome pathway is correlated with Rpg1-mediated stem rust resistance
Proc Natl Acad Sci U S A. **104**, 10276-81

Obrosova, IG, Minchenko, AG, Frank, RN, Seigel, GM, Zsengeller, Z, Pacher, P, Stevens, MJ and Szabo, C (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression
Int J Mol Med. **14**, 55-64

Opitz, C and Soldati, D (2002). 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*
Mol Microbiol. **45**, 597-604

Pacher, P and Szabo, C (2005). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme
Antioxid Redox Signal. **7**, 1568-80

- Pacini, A, Quattrone, A, Denegri, M, Fiorillo, C, Nediani, C, Ramon y Cajal, S and Nassi, P** (1999). Transcriptional down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase gene expression by E1A binding to pRb proteins protects murine keratinocytes from radiation-induced apoptosis
J Biol Chem. **274**, 35107-12
- Pannebakker, BA, Loppin, B, Elemans, CP, Humblot, L and Vavre, F** (2007). Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis
Proc Natl Acad Sci U S A. **104**, 213-5
- Park, EM, Cho, S, Frys, K, Racchumi, G, Zhou, P, Anrather, J and Iadecola, C** (2004). Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury
Stroke. **35**, 2896-901
- Parmley, SF, Gross, U, Sucharczuk, A, Windeck, T, Sgarlato, GD and Remington, JS** (1994). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*
J Parasitol. **80**, 293-301
- Payne, TM, Molestina, RE and Sinai, AP** (2003). Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis
J Cell Sci. **116**, 4345-58
- Piconi, L, Quagliaro, L, Da Ros, R, Assaloni, R, Giugliano, D, Esposito, K, Szabo, C and Ceriello, A** (2004). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase
J Thromb Haemost. **2**, 1453-9
- Pieper, AA, Verma, A, Zhang, J and Snyder, SH** (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death
Trends Pharmacol Sci. **20**, 171-81
- Plummer, ER** (2006). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in cancer
Curr Opin Pharmacol. **6**, 364-8
- Przyborski, JM, Miller, SK, Pfahler, JM, Henrich, PP, Rohrbach, P, Crabb, BS and Lanzer, M** (2005). Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes
Embo J. **24**, 2306-17
- Que, X, Ngo, H, Lawton, J, Gray, M, Liu, Q, Engel, J, Brinen, L, Ghosh, P, Joiner, KA and Reed, SL** (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing
J Biol Chem. **277**, 25791-7
- Quinn, PJ and McCraw, BM** (1972). Current status of toxoplasma and toxoplasmosis: a review

Can Vet J. **13**, 247-62

Raschke, WC, Baird, S, Ralph, P and Nakoinz, I (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus
Cell. **15**, 261-7

Revilla, Y, Cebrian, A, Baixeras, E, Martinez, C, Vinuela, E and Salas, ML (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain
Virology. **228**, 400-4

Riemann, HP, Meyer, ME, Theis, JH, Kelso, G and Behymer, DE (1975). Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk
J Pediatr. **87**, 573-6

Rozenfeld, C, Martinez, R, Figueiredo, RT, Bozza, MT, Lima, FR, Pires, AL, Silva, PM, Bonomo, A, Lannes-Vieira, J, De Souza, W and Moura-Neto, V (2003). Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration
Infect Immun. **71**, 2047-57

Sacks, D and Sher, A (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa
Nat Immunol. **3**, 1041-7

Saeij, JP, Boyle, JP and Boothroyd, JC (2005a). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host
Trends Parasitol. **21**, 476-81

Saeij, JP, Boyle, JP, Grigg, ME, Arrizabalaga, G and Boothroyd, JC (2005b). Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains
Infect Immun. **73**, 695-702

Saeij, JP, Boyle, JP, Collier, S, Taylor, S, Sibley, LD, Brooke-Powell, ET, Ajioka, JW and Boothroyd, JC (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis
Science. **314**, 1780-3

Saeij, JP, Collier, S, Boyle, JP, Jerome, ME, White, MW and Boothroyd, JC (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue
Nature. **445**, 324-7

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

Schaumburg, F, Hippe, D, Vutova, P and Lüder, CG (2006). Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites

Parasitology. **132 Suppl**, S69-85

Schwab, JC, Beckers, CJ and Joiner, KA (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve

Proc Natl Acad Sci U S A. **91**, 509-13

Scott, GS, Kean, RB, Mikheeva, T, Fabis, MJ, Mabley, JG, Szabo, C and Hooper, DC (2004). The therapeutic effects of PJ34 [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl], a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation

J Pharmacol Exp Ther. **310**, 1053-61

Seeber, F and Boothroyd, JC (1996). *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*

Gene. **169**, 39-45

Seeber, F (2003). Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa

Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. **3**, 99-109

Sehgal, A, Bettiol, S, Pypaert, M, Wenk, MR, Kaasch, A, Blader, IJ, Joiner, KA and Coppens, I (2005). Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*

Traffic. **6**, 1125-41

Seng, S, Makala, LH, Maki, Y, Choi, Y, Yokoyama, M, Suzuki, N, Toyoda, Y and Nagasawa, H (2002). Unresponsiveness to surface antigen 1 modifies cytokine profiles in acute *Toxoplasma gondii* infection

Pathobiology. **70**, 237-46

Shapira, S, Speirs, K, Gerstein, A, Caamano, J and Hunter, CA (2002).

Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*

J Infect Dis. **185 Suppl 1**, S66-72

Sheffield, HG and Melton, ML (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*

J Parasitol. **54**, 209-26

Sibley, LD, Weidner, E and Krahenbuhl, JL (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*

Nature. **315**, 416-9

Sibley, LD, Krahenbuhl, JL, Adams, GM and Weidner, E (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins

J Cell Biol. **103**, 867-74

- Sibley, LD, Niesman, IR, Parmley, SF and Cesbron-Delauw, MF** (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*
J Cell Sci. **108** (Pt 4), 1669-77
- Sibley, LD, Mordue, DG, Su, C, Robben, PM and Howe, DK** (2002). Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **357**, 81-8
- Simbulan-Rosenthal, CM, Rosenthal, DS, Iyer, S, Boulares, AH and Smulson, ME** (1998). Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis
J Biol Chem. **273**, 13703-12
- Simbulan-Rosenthal, CM, Ly, DH, Rosenthal, DS, Konopka, G, Luo, R, Wang, ZQ, Schultz, PG and Smulson, ME** (2000). Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase
Proc Natl Acad Sci U S A. **97**, 11274-9
- Sims, JL, Berger, SJ and Berger, NA** (1983). Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis
Biochemistry. **22**, 5188-94
- Sirard, JC, Vignal, C, Dessein, R and Chamailard, M** (2007). Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens
PLoS Pathog. **3**, e152
- Smith, S** (2001). The world according to PARP
Trends Biochem Sci. **26**, 174-9
- Smulson, ME, Simbulan-Rosenthal, CM, Boulares, AH, Yakovlev, A, Stoica, B, Iyer, S, Luo, R, Haddad, B, Wang, ZQ, Pang, T, Jung, M, Dritschilo, A and Rosenthal, DS** (2000). Roles of poly(ADP-ribosyl)ation and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1
Adv Enzyme Regul. **40**, 183-215
- Soldati, D, Dubremetz, JF and Lebrun, M** (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*
Int J Parasitol. **31**, 1293-302
- Soriano, FG, Virag, L and Szabo, C** (2001). Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation
J Mol Med. **79**, 437-48
- Strober, W, Murray, PJ, Kitani, A and Watanabe, T** (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2
Nat Rev Immunol. **6**, 9-20

Suss-Toby, E, Zimmerberg, J and Ward, GE (1996). Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore

Proc Natl Acad Sci U S A. **93**, 8413-8

Szabo, C, Zingarelli, B, O'Connor, M and Salzman, AL (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite

Proc Natl Acad Sci U S A. **93**, 1753-8

Szabo, C and Dawson, VL (1998). Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion

Trends Pharmacol Sci. **19**, 287-98

Szabo, C (2005). Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications

Pharmacol Res. **52**, 60-71

Szabo, G, Bahrle, S, Stumpf, N, Sonnenberg, K, Szabo, EE, Pacher, P, Csont, T, Schulz, R, Dengler, TJ, Liaudet, L, Jagtap, PG, Southan, GJ, Vahl, CF, Hagl, S and Szabo, C (2002). Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation

Circ Res. **90**, 100-6

Takizawa, T, Matsukawa, S, Higuchi, Y, Nakamura, S, Nakanishi, Y and Fukuda, R (1993). Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells

J Gen Virol. **74 (Pt 11)**, 2347-55

Tanaka, Y, Yoshihara, K, Kojima, K, Itaya, A, Kameoka, M, Ikuta, K and Kamiya, T (1995a). Poly(ADP-ribose) polymerase activity in various U937 cell subclones with different susceptibility to HIV-1 infection: its dramatic decrease following persistent virus infection

Biochem Biophys Res Commun. **213**, 161-8

Tanaka, Y, Yoshihara, K, Tohno, Y, Kojima, K, Kameoka, M and Kamiya, T (1995b). Inhibition and down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase results in a marked resistance of HL-60 cells to various apoptosis-inducers

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). **41**, 771-81

Tenter, AM, Heckerroth, AR and Weiss, LM (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans

Int J Parasitol. **30**, 1217-58

Tomavo, S, Schwarz, RT and Dubremetz, JF (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of Toxoplasma gondii major surface antigens

Mol Cell Biol. **9**, 4576-80

- van Wijk, SJ and Hageman, GJ** (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion
Free Radic Biol Med. **39**, 81-90
- van Zandbergen, G, Solbach, W and Laskay, T** (2007). Apoptosis driven infection
Autoimmunity. **40**, 349-52
- Virag, L, Bai, P, Bak, I, Pacher, P, Mabley, JG, Liaudet, L, Bakondi, E, Gergely, P, Kollai, M and Szabo, C** (2004). Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma
Med Sci Monit. **10**, BR77-83
- Virag, L** (2005a). Poly(ADP-ribosyl)ation in asthma and other lung diseases
Pharmacol Res. **52**, 83-92
- Virag, L** (2005b). Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies
Curr Vasc Pharmacol. **3**, 209-14
- Voth, DE, Howe, D and Heinzen, RA** (2007). *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages
Infect Immun. **75**, 4263-71
- Vutova, P, Wirth, M, Hippe, D, Gross, U, Schulze-Osthoff, K, Schmitz, I and Lüder, CG** (2007). *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8
Cell Microbiol. **9**, 1556-70
- Wang, T, Zhang, X and Li, JJ** (2002). The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses
Int Immunopharmacol. **2**, 1509-20
- Wei, S, Marches, F, Borvak, J, Zou, W, Channon, J, White, M, Radke, J, Cesbron-Delauw, MF and Curiel, TJ** (2002). *Toxoplasma gondii*-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis
Infect Immun. **70**, 1750-60
- Werk, R** (1985). How does *Toxoplasma gondii* enter host cells?
Rev Infect Dis. **7**, 449-57
- Yarovinsky, F, Zhang, D, Andersen, JF, Bannenberg, GL, Serhan, CN, Hayden, MS, Hieny, S, Sutterwala, FS, Flavell, RA, Ghosh, S and Sher, A** (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein
Science. **308**, 1626-9
- Yarovinsky, F and Sher, A** (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*
Int J Parasitol. **36**, 255-9

- Yelamos, J, Buendia, AJ, Ortega, N, Monreal, Y, Gallego, MC, Sanchez, J, Ramirez, P, Parrilla, P, Caro, MR, Aparicio, P and Salinas, J** (2004). Genetic and pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 interferes in the chlamydial life cycle
Biochem Biophys Res Commun. **324**, 840-8
- Ying, W, Alano, CC, Garnier, P and Swanson, RA** (2005). NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death
J Neurosci Res. **79**, 216-23
- Ying, W** (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences
Antioxid Redox Signal. **10**, 179-206
- Yu, SW, Wang, H, Poitras, MF, Coombs, C, Bowers, WJ, Federoff, HJ, Poirier, GG, Dawson, TM and Dawson, VL** (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor
Science. **297**, 259-63
- Yu, SW, Wang, H, Dawson, TM and Dawson, VL** (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity
Neurobiol Dis. **14**, 303-17
- Zhang, J, Dawson, VL, Dawson, TM and Snyder, SH** (1994). Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity
Science. **263**, 687-9
- Zhang, J, Li, H, Wang, J, Dong, Z, Mian, S and Yu, FS** (2004). Role of EGFR transactivation in preventing apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa*-infected human corneal epithelial cells
Invest Ophthalmol Vis Sci. **45**, 2569-76
- Zimmermann, S, Murray, PJ, Heeg, K and Dalpke, AH** (2006). Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling
J Immunol. **176**, 1840-7
- Zingarelli, B, Salzman, AL and Szabo, C** (1998). Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury
Circ Res. **83**, 85-94
- Zychlinsky, A, Prevost, MC and Sansonetti, PJ** (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages
Nature. **358**, 167-9

Publikationen

Fachartikel

A. Gais, N. Beinert, U. Gross and C.G.K. Lüder (2008). Transient inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase expression and activity by *Toxoplasma gondii* is dispensable for parasite-mediated blockade of host cell apoptosis
Microbes Infect., **10(4)**, 358-66

Buchartikel

D. Hippe, A. Gais, U. Groß and C.G.K. Lüder (2007). Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*. In: Rupp, S., Sohn, K. und Hauser, N. (Eds). *Methods in Molecular Biology: Host-Pathogen Interactions*. Humana Press., Totowa, NJ, USA. *In press*

Vorträge und Poster

DGHM 2005, Göttingen (Poster):

“*Toxoplasma gondii* transiently inhibits Poly(ADP-ribose) polymerase protein expression of its host cells”

Statusworkshop Eukaryonten 2006, München (Vortrag):

“Inhibierung der Poly(ADP-Ribose) Polymerase durch *Toxoplasma gondii*”

2nd Short Course for Young Parasitologists 2006, Wien (Vortrag):

“Inhibition of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) expression after infection with *Toxoplasma gondii*”

DGP 2006, Wien (Poster):

“Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) protein levels are strongly decreased after infection with *Toxoplasma gondii*”

COST 857 PhD Retreat, Brüssel 2006 (Vortrag):

“Characterization of Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in *Toxoplasma gondii* infected host cells”

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Andrea Nadja Gais, geb. Stender
Geburtsdatum	07.04.1978
Geburtsort	Langen
Familienstand	Verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch



Studium / Ausbildung

Mai 2004 – Mai 2007	Praktische Arbeiten zu meiner Promotion: „Charakterisierung der Poly(ADP-ribose) Polymerase Expression in <i>Toxoplasma gondii</i> infizierten Wirtszellen“ am Hygieneinstitut der Georg-August-Universität in Göttingen bei Prof. Dr. U. Groß (Note noch ausstehend; Rigorosum: Ende Oktober)
Nov 2001 – Juni 2002	Externe Diplomarbeit: „ <i>In vitro</i> Mutagenese, rekombinante Herstellung und funktionelle Analyse von Lektinen aus <i>Sarcocystis muris</i> “ am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Abteilung Bakteriologie, Fachgebiet Parasitologie und Diagnostika bei Dr. T. Montag-Lessing (Note: 2,0)
Okt 1997 – Okt 2001	Diplomstudiengang Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt; Hauptfach Genetik, Nebenfächer Mikrobiologie und Biochemie (Note: 1,8)
1989 – 1997	Goethe Gymnasium, Neu-Isenburg, Abschluss Abitur (Note: 2,0)

Praxiserfahrung

Seit Aug 2008	Aufbau und Leitung eines Diagnostiklabors zur Mutationsanalyse am Nordwest-Krankenhaus in Frankfurt am Main bei Prof. Dr. E. Jäger in der Onkologie
Mai 2004 – Mai 2007	Lehrtätigkeit und Forschungsassistentin während meiner Dissertation am Hygieneinstitut der Georg-August-Universität in Göttingen bei Prof. Dr. U. Gross
Sep 2002 – April 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Abteilung Bakteriologie, Fachgebiet Parasitologie und Diagnostika bei Dr. Montag-Lessing

Familienphase

Juni 2007 – Juli 2008 Mutterschutz und Elternzeit, sowie schriftliche Ausarbeitung der Promotion

Universitäre Tätigkeiten

2006 Tutor auf Englisch für die Vorlesung: 'Viruses and Cancer' für Studenten des internationalen Master-Studiengangs „Molecular Biology“ an der Georg-August-Universität in Göttingen während der Tätigkeit am Hygieneinstitut der Georg-August-Universität

2005 und 2006 Leitung eines Methodenkurses auf Englisch: 'SDS-PAGE and Western Blot' für Studenten des internationalen Master-Studiengangs „Molecular Biology“ an der Georg-August-Universität in Göttingen während der Tätigkeit am Hygieneinstitut der Georg-August-Universität

Praktika

Feb 2000 – März 2000 Praktikum am Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Bakteriologie, Fachgebiet Parasitologie und Diagnostika bei Dr. Montag-Lessing zur Erlernung grundlegender molekularbiologischer Arbeitstechniken

Zusatzqualifikation

Sprachen	Englisch:	gut und fließend
	Latein:	großes Latinum
	Deutsch:	Muttersprache

EDV-Kenntnisse	Windows XP:	ständig in Anwendung
	Textverarbeitung MS Word:	ständig in Anwendung
	Textverarbeitung MS Powerpoint:	ständig in Anwendung
	Tabellenkalkulationen MS Excel:	gut

Obertshausen, den 15.09.2008

