# IFN-γ-VERMITTELTE INFEKTABWEHR VON *TOXOPLASMA GONDII* IN MURINEN SKELETTMUSKELZELLEN *IN VITRO*

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

ANNA CLAUDIA TAKÁCS

aus Hamburg

- Göttingen 2011-

Mitglieder des Betreuungsausschusses:

Referent: Prof. Dr. Uwe Groß
Koreferent: Prof. Dr. Jörg Stülke

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2011

Ich habe den Weg zur Wissenschaft gemacht wie Hunde,
die mit ihren Herren spazieren gehen,
hundertmal dasselbe vorwärts und rückwärts,
und als ich ankam, war ich müde.

- G. CHR. LICHTENBERG -

An vorderster Stelle möchte ich meinem Anleiter, Prof. Dr. Carsten G. K. Lüder sehr herzlich danken für seine exzellente Betreuung, anhaltende Diskussionsbereitschaft und stetige Unterstützung.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Uwe Groß für interessante Anregungen, die Übernahme des Referats meiner Doktorarbeit und meine Aufnahme in sein Institut.

Prof. Dr. Jörg Stülke, der das Koreferat dieser Dissertation innehat, danke ich für seine diesbezüglichen Mühen und für fruchtbare Diskussionen während meiner Jahresberichte.

Mein Dank gilt außerdem den weiteren Mitgliedern meines Prüfungskomitees:
Prof. Dr. Gregor Bucher, Prof. Dr. Ralf Heinrich, PD Dr. Rolf Daniel und PD Dr. Michael Hoppert.

Vielen lieben Dank auch meinen Kollegen am „Institut für Medizinische Mikrobiologie“ und allen meinen anderen Freunden, die immer für mich da waren und mich aufgeheitert haben, wenn es nötig war.
Besonders erwähnen möchte ich dabei Kristin Graumann – möp, du bist auch bald durch!

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, darunter besonders meinen Eltern Dr. Anne-Elisabeth Otto und Reinhard Otto, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich unterstützt haben, wo immer es nötig war.

Mange tak og kys til min kæreste Dr. Johannes ”Marsvin” Aastrup. Han var altid der for mig, men også gav mig nok tid til mig selv, når jeg havde brug for det. Alt vil være fint – snart!

Diese Dissertation wurde durch das „Bundesministerium für Bildung und Forschung“ über das ToxoNet-Projekt finanziert. Vielen Dank!

Toxonet 02
eine Initiative von Human- und Veterinärmedizinern
zur Erforschung der Toxoplasmose

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| α | Alpha, hier: anti, gegen |
| Abb. | Abbildung |
| AIDS | „Aquired Immune Deficiency Syndrome“ (eng.) |
| APS | Ammoniumperoxosulfat |
| BSA | Rinderserum-Albumin |
| βAkt | βAktin |
| bzw. | beziehungsweise |
| B-Zellen | Lymphozyten aus dem Knochenmark |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Cp | „Crossing point“ (eng.) |
| CPRG | Chlorophenolrot β-D Galaktopyranosid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| DZ | Dendritische Zelle |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eng. | englisch |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPase | Guaninnukleotid-bindendes Protein |
| $CD4^+$ / $CD8^+$ | Zellen mit Rezeptoren für „cluster of differentiation“ 4 oder 8 |
| DMEM | Dulbeccos Modifiziertes Eagle-Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| HBSS | „Hank’s Buffered Salt Solution“ (eng.) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HFF | „Human Foreskin Fibroblast“ (eng.) |
| H + L | Schwere und leicht Kette von Immunglobulinen |
| hpi | Stunden nach Infektion |
| hps | Stunden nach Aussäen |
| IDO | Indolamin 2,3-Dioxygenase |
| IFN-γ | Interferon-γ |

| | |
|---|---|
| IFT | Immunfluoreszenztest |
| Ig | Immunglobulin |
| IRG | „immunity related GTPases“ (eng.) |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase |
| $LD_x$ | Letale Dosis bei der x% der Versuchsmäuse sterben |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| L-NIL | L-$N^6$-(1-Iminoethyl)-lysinehydrochloride |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MHC | „major histocompatibility complex“ (eng.) |
| mRNA | „messenger ribonucleic acid“ (eng.) |
| Myf5 | Myogener Faktor 5 |
| MyoD | Myogener Faktor 3 |
| MyHC | Myosin Abschnitt schwere Kette |
| NAD | Nikotin-amid-adenin-dinukleotid |
| NADP | Nikotin-amid-adenin-dinukleotid-phosphat |
| NF-κB | Nuklear Faktor κB |
| NK Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NMRI-Maus | Labormauslinie aus dem „Naval Medical Research Institute“ |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| *NOS2* | Gen für die murine „Nitric Oxide Synthase 2“/iNOS |
| OligodT | Primer aus desoxy-Thyminen |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| Pfa | Paraformaldehyd |
| PV | parasitophore Vakuole |
| PVM | Membran der parasitophoren Vakuole |
| RelA | Rel-Homologie-Domäne A |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROP | Rhoptrien-Protein |
| RPMI | Zellkulturmedium, entwickelt im Roswell Park Memorial Institut |
| RT | Reverse Transkription |
| SAG | „surface antigen“-Protein |
| SEM | Standardfehler |

| | |
|---|---|
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SMCs / SMZ | Skelettmuskelzellen |
| SOCS | „suppressors of cytokine signalling“ (eng.) |
| STAT | „signal transducers and activators of transcription“ (eng.) |
| s.o. | siehe oben |
| T75-Flasche | Zellkulturflasche mit 75cm$^2$ Bodenfläche |
| Tab. | Tabelle |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| T-Lymphozyt | Lymphozyt aus dem Thymus |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| Trp | Tryptophan |
| *T. gondii* | *Toxoplasma gondii* |
| z.B. | zum Beispiel |

# 1. Inhaltsverzeichnis

*Danksagung* V
*Abkürzungsverzeichnis* VI

**1. Inhaltsverzeichnis** 1

**2. Einleitung** 7

2.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii* 7

*2.1.1 Typische Merkmale und Anatomie* 7
*2.1.2 Lebenszyklus* 8
*2.1.3 Die Bedeutung von* T. gondii *als Pathogen des Menschen* 10

2.2 Übertragung von *Toxoplasma gondii* 11

*2.2.1 Orale Übertragung der einzelnen* Toxoplasma-*Stadien* 11

2.3 Skelettmuskel – eine besondere Mikroumgebung 12

*2.3.1 Immunabwehr im Muskelgewebe* 12
*2.3.2* Toxoplasma *im Muskelgewebe* 12

2.4 Die Immunabwehr von *Toxoplasma gondii* 13

*2.4.1 Humorale Immunantwort* 14
*2.4.2 Zelluläre Immunität* 14
*2.4.3 Zytokine in der Abwehr von* T. gondii 14
a) Interferon-γ – Haupt-Induktor der intrazellulären Immunabwehr von *T. gondii* 15
b) Tumor Nekrose Faktor – mehr als nur ein Synergist zu IFN-γ? 15
c) Interleukine – Regulatoren der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort 15
*2.4.4 Zelluläre Abwehrmechanismen, die durch IFN-γ ausgelöst werden* 16
a) Zytotoxisches Stickstoffmonoxid 16
b) Disruption der parasitophoren Vakuole durch die IRG-Proteine 17
c) Tryptophan-Deprivation durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) 17

2.5 Evasionsmechanismen 18

*2.5.1 Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten* 18

*2.5.2 Schutz in der parasitophoren Vakuole und Bildung von Gewebszysten* 18
*2.5.3 Beeinflussung von Signalwegen des Wirtes* 19
*2.5.4 Inhibition der Apoptose durch* Toxoplasma gondii 19
*2.5.5 Egress aus der Wirtszelle –* Toxoplasma *auf der Flucht* 20

2.6 Zielsetzung dieser Doktorarbeit 21

**3. Material und Methoden** 22

3.1 Material 22

*3.1.1 Verbrauchsmaterialien* 22
*3.1.2 Lösungen und Chemikalien* 22
*3.1.3 Geräte* 26
*3.1.4 Kits* 27
*3.1.5 Lebendes Material* 27
*3.1.6 Antikörper* 28
*3.1.7 Primer* 29

3.2 Methoden 29

*3.2.1 Zellkulturarbeiten* 29
a) Kultivierung von L929-Zellen als Vermehrungsgrundlage von *Toxoplasma* 29
b) Subkultivierung der Toxoplasmen 30
c) Isolierung von Toxoplasmen für Experimente 30
d) Kultivierung von permanenten Skelettmuskelzellen (C2C12-Zellen) 31
e) Differenzierung von C2C12-Zellen 31
f) Kultivierung der Kontroll-Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) 32
g) Isolation und Kultivierung von primären Skelettmuskelzellen 32
h) Einfrieren und Auftauen von Wirtszellen 33
i) Einfrieren und Auftauen von Toxoplasmen 34
*3.2.2 Aktivierung und Haltung der Zellen während der Experimente* 34
*3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung* 34
a) Immunfluoreszenztest – Versuchsablauf 35
b) Mikroskopie und Aufnahme von Bildern 36
c) Bestimmung der Vakuolengrößen 36
d) Bestimmung der Infektionsraten 37

e) Bestimmung der Stadienkonversionsraten 37
*3.2.4 Quantitative PCR* 37
a) Zellkultur und Infektion mit *Toxoplasma* 37
b) RNA-Isolierung und Herstellung der cDNA 38
c) Quantitative PCR der cDNA-Proben 38
d) Auswertung 39
*3.2.5 Proteinnachweis mittels Westernblot* 39
a) Proteinisolierung und Aufbereitung 40
b) Gelelektrophorese 40
c) Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran 41
d) Detektion der Proteine 41
*3.2.6 Nitritnachweis* 42
a) Durchführung des Nitritnachweises 42
b) Verwendung des iNOS-Inhibitor L-NIL 43
*3.2.7 Wachstumsversuche* 43
*3.2.8 LDH-Assay* 44

3.3 Verwendete Software 44

*3.3.1 Elektronische Datenverarbeitung* 44
*3.3.2 Statistische Analysen* 45
*3.3.3 Quantitative „real time“-PCR* 45
*3.3.4 Mikroskopie* 45
*3.3.5 Bildbearbeitung* 45

**4. Ergebnisse** 46

4.1 Vorarbeiten: Überprüfung der Fähigkeit zur Differenzierung bei den verwendeten Myoblastenlinien 46

*4.1.1 Überprüfung der Differenzierung von primären Skelettmuskelzellen* 46
*4.1.2 Überprüfung der Differenzierung von permanenten Skelettmuskelzellen* 47
a) Regulation muskelzellspezifischer RNA in permanenten SMZ 48
b) Nachweis muskelzellspezifischer Proteine in differenzierenden permanenten SMZ 49
c) Lokalisation muskelzellspezifischer Proteine in differenzierenden permanenten SMZ 50

4.2 Einfluss von IFN-γ und TNF auf die Abwehr von *T. gondii* in SMZ 51

*4.2.1 Wachstum von* T. gondii *in Abhängigkeit von IFN-γ* 51

*4.2.2 Wachstum von Toxoplasma in SMZ nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen* 54

*4.2.3 Mikroskopische Untersuchungen von Toxoplasmen in nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten* 54

a) Vakuolengrößen von *T. gondii* in differenzierten SMZ sowie in Fibroblasten 55

b) Infektionsraten differenzierter SMZ und Fibroblasten ohne und nach IFN-γ-Aktivierung 57

c) Stadienkonversion von *T. gondii* in differenzierten SMZ und Fibroblasten unter Einfluss von IFN-γ 59

*4.2.4 Nachweis des Einflusses von IFN-γ auf das Parasitenwachstum auf Proteinebene* 61

*4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse* 62

4.3 Untersuchungen zur induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase als IFN-γ-induzierter Mechanismus in der Abwehr von *T. gondii* 63

*4.3.1 Expression des murinen iNOS-Genes NOS2* 63

*4.3.2 Einfluss von IFN-γ auf die NO-Produktion in Zellkulturüberständen von differenzierten SMZ und Fibroblasten* 64

*4.3.3 Parasitenwachstum und Replikation bei Hemmung der iNOS* 66

*4.3.4 Einfluss der Inhibierung von iNOS auf das Parasitenwachstum* 67

*4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse* 70

4.4 Rolle von p47-GTPasen in der durch IFN-γ vermittelten Parasitenabwehr 70

*4.4.1 Regulation der Transkription der IRG-Gene Irga6 und Irgm3 durch IFN-γ in differenzierten SMZ bzw. in Fibroblasten* 71

a) Regulation von *Irga6* und *Irgm3* durch IFN-γ in nicht infizierten Wirtszellen 71

b) Regulation der Transkription von *Irga6* und *Irgm3* durch IFN-γ in infizierten Zellen 72

*4.4.2 Nachweis von Irga6 auf den Membranen von Toxoplasma-haltigen PV in differenzierten SMZ sowie Fibroblasten* 74

*4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse* 79

4.5 Egress des Parasiten aus der Wirtszelle 79

4.5.1 Durch Parasiten-Egress verursachte Zytotoxizität 79

4.5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse 81

**5. Diskussion** 82

5.1 Muskelzellen *in vitro* – ein Modell zur Untersuchung der Entwickung von *Toxoplasma gondii* in Skelettmuskulatur 82

*5.1.1 Primäre versus permanenten SMZ in der Untersuchung der Parasitenentwicklung* 83

*5.1.2 Bestätigung der Eignung der verwendeten SMZ* 84

5.2 Infektabwehr in Skelettmuskelzellen 85

*5.2.1 Abwehr von Parasiten, die im Muskel auftreten* 86

*a) Trypanosoma cruzi – ein Parasit in Herz- und Skelettmuskel* 86

*b) Neospora caninum – eine Verwandter von Toxoplasma* 87

*c) Trichinella spiralis – ein intrazellulärer Nematode in Muskelzellen* 87

*5.2.2 Toxoplasma gondii in Skelettmuskelzellen* 88

*5.2.3 IFN-γ führt in Muskelzellen zur Abwehr von Toxoplasma gondii* 89

*5.2.4 Eine synergistische Wirkung von TNF zu IFN-γ wurde nur in permanenten SMZ durch eine geringe Wachstumshemmung von T. gondii gezeigt* 92

*5.2.5 Einfluss von IFN-γ und TNF auf die Stadienkonversion zu Bradyzoiten in SMZ* 93

5.3 IFN-γ-regulierte antiparasitäre Effektormechanismen 94

*5.3.1 Stickstoffmonoxid ist an der Abwehr von T. gondii in SMZ beteiligt* 94

*5.3.2 IRG-Proteine werden nach IFN-γ-Aktivierung in SMZ exprimiert und lagern sich an die PV von T. gondii an* 97

5.4 Immunevasion von *T. gondii* in Skelettmuskelzellen 100

*5.4.1 T. gondii hemmt die IFN-γ-induzierte Transkription von NOS2 in SMZ* 101

*5.4.2 T. gondii greift in die Transkription der IRG-Proteine in SMZ ein* 102

5.5 Ausblick 104

**6. Zusammenfassung** 106

6.1 Zusammenfassung 106

6.2 Summary 108

**7. Literatur** 111

**8. Lebenslauf** 132

# 2. Einleitung

## 2.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* ist ein eukaryotischer Mikroorganismus, der dem Phylum der Apikomplexa angehört. Er ist mit dem Erreger der Malaria, *Plasmodium*, verwandt und lebt wie dieser als obligat intrazellulärer Parasit. Im Gegensatz zu *Plasmodium* kann *Toxoplasma* jedoch nahezu jeden Zelltyp warmblütiger Tiere, Vögel und des Menschen infizieren und ist deshalb weit verbreitet. Im Menschen wird ein Durchseuchungsgrad von 25% bis 30% angenommen (JOYNSON & WREGHITT, 2001).

Meist werden die Toxoplasmen in drei klonale Linien eingeteilt, die in Europa und Nordamerika auftreten und zu etwa 95% genetisch identisch sind. Dennoch unterscheiden sich diese Linien in Bezug auf ihre Virulenz. Parasiten des Typ I sind die virulentesten Stämme von *T. gondii* (SIBLEY & AJIOKA, 2008). Die letale Dosis, bei der 100% der infizierten Labormäuse sterben ($LD_{100}$), ist hier ungefähr 1, wohingegen bei Typ II- und Typ III-Toxoplasmen die mittlere $LD_{50}$ bei $\geq 10^5$ liegt (HOWE ET AL., 1996; MORDUE ET AL., 2001). Die Linien in Südamerika sind wesentlich diverser und umfassen 11 Haplogruppen (KHAN ET AL., 2007). Menschen in Europa und Nordamerika sind am häufigsten mit Typ II-Toxoplasmen infiziert, wobei jedoch in Nutztieren oft auch Typ III-Parasiten gefunden werden (SIBLEY ET AL., 2009; HONORÉ ET AL., 2000).

### *2.1.1 Typische Merkmale und Anatomie*

*Toxoplasma gondii* ist nur etwa 6 x 3 µm groß und weist die typischen anatomischen Merkmale der Apikomplexa auf (Abb. 2.1). Dazu gehören die gestreckte Form und eine Apikalregion, die besondere Organellen enthält. Der so genannte Apikalkomplex besteht unter anderem aus den Mikronemen, die Proteine für die Erkennung, Anheftung und Invasion der Wirtszellen enthalten (CARRUTHERS & TOMLEY, 2008; CARRUTHERS ET AL., 2000) und den Rhoptrien, die spezielle Proteine u.a. für die Beeinflussung des Wirtsstoffwechsels enthalten (NICHOLS ET AL., 1983; SAEIJ ET AL., 2007). Ebenfalls sekretorische Organellen sind die Dichten Granula, die an der Bildung und Modifikation der Membran der parasitophoren Vakuole (PV) beteiligt sind (MERCIER ET AL., 2005). Die PV-Membran trennt den Parasiten nach der Invasion vom Zytosol des Wirtes. Ein weiteres für die Apikomplexa typisches

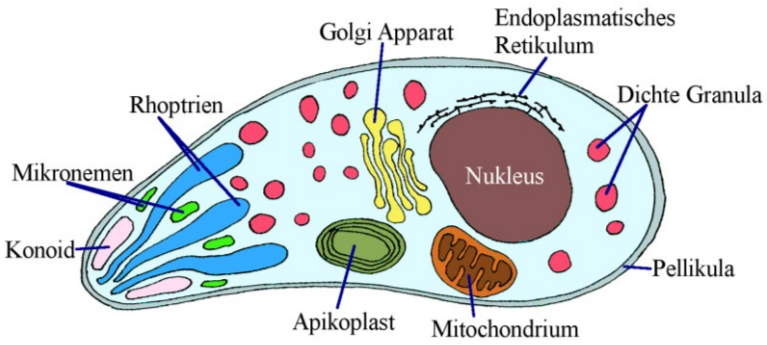


**Abb. 2.1: Aufbau von *T. gondii***
*T. gondii* ist von der Pellikula umgeben und enthält am apikalen Ende die sekretorischen Mikronemen und Rhoptrien. Weitere Organellen sind neben dem Nukleus das endoplasmatische Retikulum, die Dichte Granula, der Apikoplast, ein Mitochondrium und das Konoid.

Plastid-ähnliches Organell mit eigner DNA ist der Apikoplast, der mit der Fettsäuresynthese von *T. gondii* in Verbindung gebracht wird (SATO, 2011). *Toxoplasma* ist von einer Hülle, der Pellikula, umgeben, die eng mit seinem Zytoskelett assoziiert ist und Proteine wie z.B. die SAG-Proteine (surface antigens) enthält. SAG1 ist beispielsweise an der Anheftung des Parasiten beteilig, Hauptimmunogen der humoralen Immunantwort gegen den Parasiten (LEKUTIS ET AL., 2001) und wird oft zur Detektion des Parasiten herangezogen.

### *2.1.2 Lebenszyklus*

Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* untergliedert sich in die drei verschiedenen Entwicklungsstadien der Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten, die alle infektiös sind.
Die geschlechtliche Vermehrung von *Toxoplasma* erfolgt ausschließlich im Dünndarmepithel von Katzen und Katzenartigen, den Endwirten (Abb. 2.2). Daraus gehen die Oozysten hervor, die etwa 10 bis 13 µm groß sind. Nach einer Primärinfektion kann eine Katze über 100 Millionen Oozysten mit der Fäzes ausscheiden. Die Oozysten sind sehr resistent gegen Umwelteinflüsse und bleiben bis zu 18 Monate in Erde oder Sand infektiös. Sie sind weitgehend impermeabel und sehr resistent gegenüber Desinfektionsmitteln (FRENKEL, 2000). Außerhalb des Wirtes sporulieren sie innerhalb von wenigen Tagen und enthalten dann die infektiösen Sporozoiten (DUBEY, 1998a).
Sporulierte Oozysten werden überwiegend oral aufgenommen. Nach der Passage des Magens invadieren die Sporozoiten das intestinale Epithel und wandeln sich in die schnell replizierenden Tachyzoiten um. Diese verbreiten sich über verschiedene Wege im Wirt.
Dort können sie ein breites Spektrum an verschiedenen Zelltypen infizieren. Wenn der Parasit ungestört wachsen kann, repliziert er bis die Wirtszelle rupturiert, woraufhin die freigesetzten Tachyzoiten neue Wirtszellen infizieren (BLACK & BOOTHROYD, 2000;

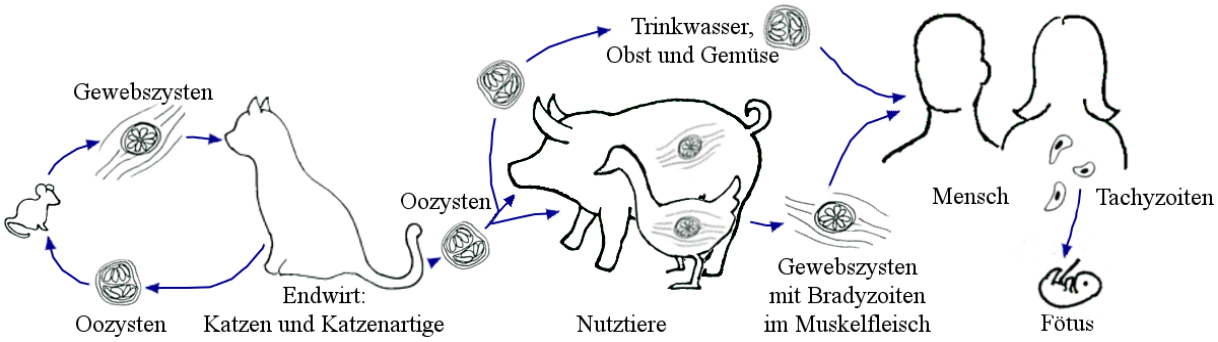


**Abb. 2.2: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii***

Die geschlechtliche Vermehrung von *Toxoplasma* findet im Darm des Endwirtes, Katzen und Katzenartigen, statt. Die entstehenden Oozysten werden dann mit der Fäzes der Tiere ausgeschieden. Die sporulierten Oozysten können nun über kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser vom Zwischenwirt, jedem Säuger, Vogel oder dem Menschen, aufgenommen werden. Im Zwischenwirt werden aus den Oozysten Toxoplasmen freigesetzt, die sich im Organismus verbreiten und enzystieren. Diese Gewebszysten sind häufig im Muskelfleisch zu finden und ein weiterer Infektionsweg für Karnivore. Besondere klinische Bedeutung hat die diaplazentare Übertragung des Tachyzoiten-Parasitenstadiums von der Mutter auf das ungeborene Kind.

DUBEY, 1998a). Innerhalb der Wirtszelle ist *T. gondii* von der parasitophoren Vakuole (PV) umgeben, die eine Barriere zwischen ihm und dem Zytosol des Wirtes darstellt.

In immunkompetenten Wirten wirken je nach infiziertem Gewebstyp verschiedene Mechanismen auf den Parasiten ein. Die meisten extrazellulären Tachyzoiten werden dabei durch die zelluläre Immunabwehr eliminiert (MILLER ET AL., 2009). Allerdings hat der Parasit die Fähigkeit, in ein weiteres Entwicklungsstadium, den Bradyzoiten, zu konvertieren.

Bradyzoiten haben einen ähnlichen Grundaufbau wie Tachyzoiten und stellen eine Art Ruhestadium des Parasiten und den ersten Schritt zur Persistenz dar. Der Stoffwechsel und die Proliferation der Bradyzoiten sind im Vergleich zu denen der Tachyzoiten stark reduziert. Durch ihre intrazelluläre Lebensweise und ein verändertes Antigenspektrum sind sie weniger angreifbar für das Immunsystem des Wirtes (WEISS & KIM, 2000). Letzten Endes finden sich die Bradyzoiten vor allem im Hirn, aber auch im Muskelgewebe in den Gewebszysten, und können so lebenslang als latente Infektion im Wirt persisitieren (ALIBERTI, 2005; DUBEY ET AL., 1998). So ist die Konversion zu Bradyzoiten der Schlüssel zur Etablierung einer chronischen Infektion. Die Zystenwand wird durch Modifikationen der PV gebildet. Die Gewebszysten können wiederum durch den Genuss von rohem oder unzureichend gegartem Fleisch von einem neuen Wirt, wie beispielsweise dem Endwirt, der Katze, aber auch dem

Menschen, aufgenommen werden. Die Gewebszysten rupturieren gelegentlich und setzen Parasiten frei, die bei einer supprimierten Immunabwehr tödliche Folgen haben können (MONTOYA & LIESENFELD, 2004; HEGAB & AL-MUTAWA, 2003; DUBEY ET AL. ,1998).

### *2.1.3 Die Bedeutung von* T. gondii *als Pathogen des Menschen*

Der Durchseuchungsgrad von *Toxoplasma* schwankt innerhalb der Bevölkerung von Europa stark. Man geht in Deutschland von einer prozentualen Seroprävalenz aus, die analog zum Lebensalter ist (PAPPAS ET AL., 2009; GROß, 2004).

Im gesunden Menschen stellt eine Infektion mit *Toxoplasma* normalerweise keine große Gefahr dar. Die Symptome einer akuten Infektion treten bei 1 bis 5% der Infizierten auf, sind meist unspezifisch und denen einer Erkältung ähnlich (HILL & DUBEY, 2002).

Die Infektion mit *T. gondii* kann jedoch bei Suppression des Immunsystems wie z.B. bei AIDS-Patienten oder bei einer Organtransplantation lebensbedrohlich sein (NISSAPATORN, 2009; DEROUIN ET AL., 2008; BARSOUM, 2006). Hier vermehrt sich der Parasit unkontrolliert, was neben dem Befall unterschiedlicher Organe in zerebraler Toxoplasmose resultiert, die sogar zum Tod führen kann. Gefährlich ist hierbei besonders die Reaktivierung einer latenten Infektion (KASPER, 2004; LUFT & REMINGTON, 1992; BERTOLI ET AL., 1995). Dabei wandeln sich die in den Gewebszysten ruhenden Bradyzoiten wieder in Tachyzoiten um und vermehren sich unter Lyse der Wirtszellen stark.

Ebenfalls gefährlich ist eine Erstinfektion mit *Toxoplasma* im Verlauf einer Schwangerschaft (PAPPAS ET AL., 2009). Die Tachyzoiten werden bei einer Erstinfektion noch nicht gut vom Immunsystem der Mutter kontrolliert und über die Plazenta auf das ungeborene Kind, das noch kein ausgereiftes Immunsystem hat, übertragen. Dabei können sich in Abhängigkeit vom Stadium der Schwangerschaft neben Abort Symptome wie Hydrozephalus, intrazerebrale Verkalkungen oder weitere Organschäden entwickeln (GROß, 2004).

Eine weitere Manifestation einer *Toxoplasma*-Infektion ist die okuläre Toxoplasmose. Dabei entstehen Läsionen der Netzhaut und Chorioidea, einem Abschnitt der hinteren Augenhaut, die das Sehvermögen beeinträchtigen und bei Vernarbung zur Erblindung führen können (COMMODARO ET AL., 2009). Diese Retinochorioiditis kann sich im ungeborenen Kind, aber auch noch im Erwachsenenalter nach einer asymptomatischen konnatalen oder aber auch einer postnatal erworbenen *Toxoplasma*-Infektion entwickeln (PLEYER ET AL., 2007).

## 2.2 Übertragung von *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma* kann über verschiedene Wege auf Nutztiere und den Menschen übertragen werden. Generell erfolgt die Ansteckung konnatal oder auf oralem Weg. Letzteres geschieht durch die Aufnahme von sporulierten Oozysten durch kontaminiertes Trinkwasser oder Nahrungsmittel (JONES & DUBEY, 2010), aber auch besonders über Gewebszysten, die in unzureichend gegartem Muskelfleisch von infizierten Tieren persistieren (DZIERZINSKI ET AL., 2004; FERGUSON, 2004; TENTER, 2000; TENTER ET AL., 2009). Dabei ist es von der jeweiligen Spezies abhängig, wie sich die Infektion manifestiert und wie viele Gewebszysten entstehen. Ebenso beeinflusst das Essverhalten der verschiedenen menschlichen Ethnien den Durchseuchungsgrad der jeweiligen Bevölkerung (PAPPAS ET AL., 2009).

### *2.2.1 Orale Übertragung der einzelnen* Toxoplasma-*Stadien*

Eine orale Infektion mit Tachyzoiten ist unwahrscheinlich, da Toxoplasmen in diesem Stadium nicht säureresistent sind und im Magen normalerweise schnell zerstört werden. Sonst werden Tachyzoiten vor allem über die Plazenta übertragen (HIDE ET AL., 2009).

Eine Kontamination von Trinkwasser oder Nahrungsmitteln mit Oozysten kann über infizierte Hauskatzen oder wilde Felinen erfolgen. Die Oozysten können leicht durch Wind, Regen, Oberflächenwasser und Ernteprodukte verbreitet werden. Nutztiere können über Heu, Stroh oder Getreide infiziert werden, das mit Katzenexkrementen kontaminiert ist (ELMORE ET AL., 2010; BUXTON, 1990; HIEPE & BUCHWALDER, 1991; CHINCHILLA ET AL., 1994). Für Menschen ist die Übertragung durch kontaminiertes ungewaschenes Obst oder Gemüse (PETERSEN ET AL., 2010; KAPPERUD ET AL., 1996) und durch den Kontakt mit kontaminiertem Erdboden bei der Gartenarbeit von Bedeutung (COOK ET AL., 2000).

Das Fleisch aller zur Nahrung bestimmten Säuger und Geflügel kann *Toxoplasma*-Gewebszysten enthalten. Eine Übertragung durch Gewebszysten in Muskelfleisch ist häufig, da die Zystenwand relativ resistent gegen Magensäure ist (TENTER ET AL., 2000; DUBEY ET AL., 1998b).

## 2.3 Skelettmuskel – eine besondere Mikroumgebung

*Toxoplasma gondii* persistiert besonders effektiv im Skelettmuskel (SIBLEY, 1993), welcher eine spezielle immunologische Mikroumgebung für den Parasiten bietet (STREILEIN, 1995; WIENDL ET AL., 2005a).

### *2.3.1 Immunabwehr im Muskelgewebe*

Skelettmuskelzellen (SMZ) sind nicht nur Zielzellen von Immunreaktionen, sondern nehmen auch aktiv an Immunreaktionen teil (LIGHTFOOT ET AL., 2009). Myoblasten exprimieren „major histocompatibility complex“ (MHC) Moleküle der Klassen I und II, die Peptide von Antigenen auf der Zelloberfläche präsentieren, damit diese von T-Lymphozyten wie $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen erkannt werden können. Dies wird durch die Stimulation der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interferon γ (IFN-γ) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) verstärkt (WIENDL ET AL., 2000; MICHAELIS ET AL., 1993). Muskelzellen können diese proinflammatorischen Zytokine auch dauerhaft sezernieren, was eine chronische Entzündung zur Folge haben kann (WIENDL ET AL., 2005b; Cheng et al., 2008). Um jedoch Schäden durch eine übersteigerte Immunreaktion zu vermeiden, werden in Muskelzellen auch Faktoren exprimiert, die die Produktion von weiteren Zytokinen durch die $CD4^+$ und den zytotoxischen Effekt von $CD8^+$ Zellen inhibieren (WIENDL ET AL., 2003, 2005a, 2005b). Ebenso sind professionelle antigen-präsentierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder Dendritische Zellen im Muskelgewebe verteilt oder werden bei einer Inflammation rekrutiert (PAGE ET AL., 2004; ROSTASY ET AL., 2004). *In vitro* werden geschädigte Muskelfasern und Myoblasten durch Nekrose eliminiert, da während einer Inflammation anti-apoptotische Proteine hochreguliert werden (BEHRENS ET AL., 1997; NAGARAJU ET AL., 2000; LI & DALAKAS, 2000).
Die Immunreaktionen können vom Differenzierungsgrad der Muskelzellen abhängen, wobei frühe Stadien in dieser Hinsicht als aktiver angesehen werden (WIENDL ET AL., 2005a).

### *2.3.2* Toxoplasma *im Muskelgewebe*

Es gibt Studien, die belegen, dass 30 bis 63% der konnatalen Toxoplasmose-Fälle auf eine Infektion der Mutter durch unzureichend gegartes Fleisch zurückzuführen ist (COOK ET AL., 2000). Ebenfalls wird der Verzehr von nicht ausreichend gegartem oder gepökeltem Fleisch als einer der Hauptübertragungswege von *Toxoplasma* angesehen (BOYER ET AL., 2005; COOK

ET AL., 2000; ROGHMAN ET AL., 1999; BUFFOLANO ET AL., 1996; KAPPERUD ET AL., 1996). Die Bildung von Gewebszysten kann von Spezies zu Spezies und auch unter den Organen in einer Spezies sehr unterschiedlich sein. Ein hoher Antikörpertiter (Seroprävalenz) gegen *T. gondii* ist nicht automatisch ein Zeichen für ein hohes Ansteckungsrisiko beim Verzehr des Fleisches der entsprechenden Spezies (TENTER ET AL., 2000; DUBEY & JONES, 2008). In Deutschland wird vor allem nicht durchgebratenem Schweinfleisch wie z.B. in der Form von Mett eine hohe Bedeutung für die Übertragung von *T. gondii* beigemessen (TENTER ET AL., 2000).
Bisher ist allerdings nur wenig über die Mechanismen bekannt, die dazu führen, dass der Parasit effektiv im Muskelgewebe persistiert. Es wurde jedoch gezeigt, dass wenig virulente Typ II-Toxoplasmen in SMZ spontan von Tachyzoiten zu Bradyzoiten konvertieren, auch wenn die Wirtszellen nicht zusätzlich mit z.B. Zytokinen stimuliert sind. Dies passiert in SMZ deutlich häufiger, als in Fibroblasten (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009b) und widerspricht der ursprünglichen Vermutung, dass das Wirtszell-Gewebe keinen Einfluss auf die Stadienkonversion und die Zystenbildung hat (LINDSAY ET AL., 1991). SMZ scheinen außerdem ein optimales Umfeld für die Zystenbildung zu bieten, da auch hochvirulente Toxoplasmen von Tachyzoiten zu Bradyzoiten konvertieren, was sonst eher ungewöhnlich ist (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009a; DE CHAMPS ET AL., 1997).

## 2.4 Die Immunabwehr von *Toxoplasma gondii*

In der akuten Phase einer Toxoplasmose werden vor allem die extrazellulären Tachyzoiten vom Immunsystem des Wirtes erkannt und bekämpft. Jedoch hat *T. gondii* hat im Laufe seiner Entwicklungsgeschichte die Fähigkeit erlangt, von den schnell replizierenden Tachyzoiten in sein Ruhestadium, die weitgehend Stoffwechsel-inaktiven Bradyzoiten in den Gewebszysten, überzugehen. Dieses Ruhestadium sorgt dafür, dass der Parasit nicht unkontrolliert seine Wirtszellen lysiert, sondern innerhalb der Gewebszysten eine lebenslange Persistenz im Wirt aufrechterhalten kann (WEISS & KIM, 2000; DUBEY ET AL., 1998). Eine Persistenz von *Toxoplasma* wurde besonders in Nervengewebe und im Muskel nachgewiesen (SIBLEY, 1993).
Nichtsdestotrotz kommen die Abwehrmechanismen des Wirts-Immunsystems auch bei einer chronischen Infektion immer wieder zum Tragen, da vereinzelt Gewebszysten rupturieren, dabei Bradyzoiten freigesetzt werden, diese in Tachyzoiten konvertieren und bekämpft werden müssen (WEISS & KIM, 2000; DUBEY ET AL., 1997; DUBEY, 1998a). Hierbei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle, die gewebsspezifisch auf den Parasiten einwirken.

### *2.4.1 Humorale Immunantwort*

Eine Antikörper-vermittelte Abwehr von *T. gondii* spielt während einer akuten Infektion nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings verhindert die Bedeckung des Parasiten mit Antikörpern (Opsonisierung) seine Anheftung an die Wirtszelle und sorgt für eine effektive Phagozystose des Parasiten. Dies ist wahrscheinlich auch für eine Immunität gegen eine Reinfektion mit neuen Toxoplasmen mitverantwortlich (HEGAB & AL-MUTAWA, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Antikörper-produzierende B-Zellen essentiell für das Überleben von Mäusen in der späten Phase einer Infektion mit Gewebszysten oder Tachyzoiten sind (KANG ET AL., 2000; SAYLES ET AL., 2000). In der Diagnostik werden Antikörper als Anzeiger für eine akute oder chronische Infektion mit *Toxoplasma* herangezogen (SWITAJ ET AL., 2005).

### *2.4.2 Zelluläre Immunität*

Die Kontrolle der Ausbreitung und Erhaltung der Latenz von *T. gondii* wird weitgehend durch die zelluläre Immunantwort bestimmt. Sofort nach dem ersten Kontakt des Wirtes mit *Toxoplasma* beginnt eine unspezifische Aktivierung der Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) zur Abwehr des Parasiten (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).
An der Erhaltung der Immunprotektion sind hauptsächlich $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten beteiligt (LANG ET AL., 2007; DENKERS & GAZZINELLI, 1998; KASPER & BUZONI-GATEL, 1998; GAZZINELLI ET AL., 1991; SUZUKI & REMINGTON, 1988). Es wird davon ausgegangen, dass in der akuten Phase ein zyototoxischer Effekt durch die $CD8^+$ Lymphozyten erfolgt und diese zusätzlich IFN-γ produzieren, was sich besonders gegen Tachyzoiten und infizierte Zellen richtet (MILLER ET AL., 2009; SUBAUSTE ET AL., 1991; YANO ET AL., 1989). Dagegen kommt in der chronischen Phase eher die Wirkung der $CD4^+$ Zellen zum Tragen, die ebenso wie die $CD8^+$ Zellen IFN-γ produzieren (HERION & SAAVEDRA, 1993).

### *2.4.3 Zytokine in der Abwehr von* T. gondii

Zytokine sind lösliche Faktoren, die in sehr geringen Konzentrationen wirksam sind und sowohl von Zellen ausgeschieden werden, die keine Spezifiät für Antigene besitzen, als auch von Antigen-spezifischen T-Zellen. Dabei wirken sie sowohl lokal autokrin und parakrin auf verschiedene Zelltypen, als auch systemisch. Es gibt in der Toxoplasmose sowohl protektive als auch regulatorische Zytokine.

a) Interferon-γ – Haupt-Induktor der intrazellulären Immunabwehr von *T. gondii*

IFN-γ war das erste Zytokin, das mit der Resistenz gegen *Toxoplasma* in Verbindung gebracht wurde und hat eine Schlüsselrolle in der protektiven Immunität gegen den Erreger (ALIBERTI, 2005; RYTEL & JONES, 1966; MCCABE ET AL., 1984; SUZUKI ET AL., 1988). IFN-γ wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten (siehe 2.4.2), aber auch nicht-hematopoietischen Zellen produziert (SUZUE ET AL., 2003) und sorgt unter anderem für die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen sowie die Induktion von MHC Klasse II Molekülen (ZHOU, 2009; BOEHM ET AL., 1997). IFN-γ-Rezeptoren können auf nahezu jeder Zellart gefunden werden, wodurch diverse Antworten ausgelöst werden können (siehe 2.4.4).

b) Tumor Nekrose Faktor – mehr als nur ein Synergist zu IFN-γ?

TNF wird von T-Lymphozyten, basophilen Mastzellen und monozytäre Makrophagen produziert und übt einen frühen protektiven Effekt aus. TNF ist außerdem ein pyrogener Faktor, induziert Apoptose und die Sekretion von Proteinen der akuten inflammatorischen Phase (HEHLGANS & PFEFFER, 2005).
Während einer *Toxoplasma*-Infektion kann TNF in Synergie mit IFN-γ Makrophagen aktivieren und die Parasitenreplikation sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase inhibieren (DENKERS, 2003; DEROUICH-GUERGOUR ET AL., 2001). Zusätzlich stimuliert TNF die Sekretion von IFN-γ durch NK-Zellen, was vor allem während der frühen, unspezifischen Immunantwort auf den Parasiten von Bedeutung ist (DENKERS, 2003; SHER ET AL., 1993; TRIPP ET AL., 1993). Dennoch ist die Rolle von TNF während einer *Toxoplasma*-Infektion umstritten.

c) Interleukine – Regulatoren der T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort

Interleukine sind Stimulatoren der Komponenten der zellulären und humoralen Immunabwehr und können sowohl als Aktivatoren, als auch als Hemmer wirken. In der akuten Phase einer *Toxoplasma*-Infektion spielt IL-12 (Interleukin 12) eine wichtige Rolle und wird während der Antigenstimulation von Makrophagen und dendritischen Zellen ausgeschieden (TRIPP ET AL., 1993). Es aktiviert die Produktion von IFN-γ durch Natürliche Killerzellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten (HUNTER ET AL., 1995). Ebenfalls ist IL-12 in der chronischen Phase einer Infektion essentiell, wo es für die Aufrechterhaltung der Langzeit-Immunantwort zuständig ist (YAP ET AL., 2000).

IL-10 ist im Gegensatz zu IL-12 kein protektives, sondern ein regulatorisches Zytokin. Es wird von $CD4^+$ T-Lymphozyten, Makrophagen und bestimmten B-Lymphozyten produziert, inhibiert die Proliferation der $CD4^+$ T-Lymphozyten und deren Sekretion von Zytokinen. Außerdem inhibiert IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF durch Monozyten bzw. Makrophagen, die normalerweise zur Zerstörung von *T. gondii* führen (GAZZINELLI ET AL., 1992). So wird allerdings auch eine gewebsschädigende übersteigerte Immunantwort verhindert (LIESENFELD ET AL., 1999; LIESENFELD, 1999).

### *2.4.4 Zelluläre Abwehrmechanismen, die durch IFN-γ ausgelöst werden*

Die Inhibition der *Toxoplasma*-Replikation bzw. die Zerstörung des Parasiten innerhalb der Wirtszelle gehen auf verschiedene Effektormechanismen zurück, von denen einige durch IFN-γ beziehungsweise TNF ausgelöst oder verstärkt werden.

#### a) Zytotoxisches Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch das Enzym iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) nach der Stimulation durch IFN-γ produziert. Das Enzym existiert in nahezu allen Zelltypen (XIE ET AL., 1992). NO ist aber nicht nur zytotoxisch für Pathogene, sondern in höherer Konzentration auch in unterschiedlichem Ausmaß für die Wirtszelle selbst und hat daher einen großen Einfluss auf die Symptomatik einer *Toxoplasma*-Infektion (YAP & SHER, 1999; LIESENFELD ET AL., 1999; SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1997).

NO wirkt über verschiedene Mechanismen zytotoxisch. So kann NO Enzyme mit einem Eisen-Schwefel-Zentrum blockieren, mit Superoxidanionen unter Bildung von oxydierenden Substanzen reagieren und so die Lipidmembranen zerstören oder DNA-Mutationen durch Deaminierung von DNA-Basen auslösen (LYONS, 1995; LIU & HOTCHKISS, 1995). NO ist jedoch nicht nur ein Effektor-Molekül, sondern spielt auch in der angeborenen Immunität eine Rolle (BOGDAN ET AL., 2000). Ohne NO erhöhen sich beispielsweise die Level von IFN-γ und TNF (FLORQUIN ET AL., 1994; HUANG ET AL., 1998). Außerdem kann NO den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslösen (IDRISS & NAISMITH, 2000).

b) Disruption der parasitophoren Vakuole durch die IRG-Proteine

Die IRG-Proteine (immunity-related GTPases, früher: p47-GTPasen) sind eine Proteinfamilie, deren Mitglieder hauptsächlich durch Interferone aktiviert werden (BOEHM ET AL., 1998; ZERRAHN ET AL., 2002). Sie umfasst Mitglieder wie Irgd, Irgm1, Irgm2, Irgm3 (IGTP), Irga6 und Irgb6, die alle eine Größe von etwa 47 kDa aufweisen. Sie werden mit der Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene wie *Toxoplasma gondii*, aber auch Viren in Verbindung gebracht (TAYLOR ET AL., 2000; CARLOW ET AL., 1998). Im Menschen wurden zwei putativ funktionelle Homologe gefunden, jedoch ist bisher nicht geklärt, ob sie im Menschen tatsächlich aktiv sind (LI ET AL., 2009). Daher gibt es keinen Beweis für IRG-Protein basierte Resistenz gegen *T. gondii* im Menschen (BEKPEN ET AL., 2005).

Während einer *Toxoplasma*-Infektion relokalisieren die meisten IRG-Proteine schnell zum vakuolären Kompartiment (BUTCHER ET AL., 2005; MARTENS ET AL., 2005). Nachdem sich IRG-Proteine auf der Membran der PV abgelagert und zu deren Ruptur und Permeabilisierung geführt haben, wird der Parasit ins Wirts-Zytoplasma freigesetzt, woraufhin er in den meisten Fällen abstirbt (MARTENS ET AL., 2005; ZHAO ET AL., 2009b).

c) Tryptophan-Deprivation durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Tryptophan (Trp) ist essentiell für *Toxoplasma* und muss durch den Parasiten aus dem Wirt aufgenommen werden. Dementsprechend wurde gezeigt, das *T. gondii* bei verringertem Trp-Gehalt schlechter wächst (MACKENZIE ET AL., 2007; FUJIGAKI ET AL., 2003). Umgekehrt muss für die Eindämmung des *Toxoplasma*-Wachstums in Fibroblasten umso mehr IFN-γ zugegeben werden, je mehr Trp im Kulturmedium enthalten ist (PFEFFERKORN, 1986). Trp wird normalerweise über mehrere Schritte durch verschiedene Enzyme unter anderem zu Acetyl CoA und NAD oder NADP abgebaut. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) ist eines dieser Enzyme, kommt ubiquitär in nicht hematopoietischen Organen von Säugern vor und zeigt die höchste Aktivität in Lunge und Plazenta (SHIMIZU ET AL., 1978; YAMAZAKI, 1985). Das Enzym wird von IFN-γ (MCKENZIE ET AL., 2007; DÄUBENER & MACKENZIE, 1999) und LPS (OBERDÖRFER ET AL., 2003) induziert. TNF kann die IFN-γ-vermittelte Induktion von IDO steigern (DÄUBENER & MACKENZIE, 1999).

Es wurde gezeigt, dass die Abwehr von *T. gondii* über eine Trp-Deprivation durch IDO vor allem in humanen phagozytotischen Zellen erfolgt (CÉRAVOLO ET AL., 1999; CHAVES ET AL.,

2001; NAGINENI ET AL., 1996). Außerdem erhöhen sich in *Toxoplasma*-infizierten Mäusen durch endogenes IFN-γ der IDO-mRNA-Gehalt und die Trp-Degradation in Lunge, Hirn und Serum (SUZUKI ET AL., 2003; DA SILVA ET AL., 2001).

## 2.5 Evasionsmechanismen

Obwohl die Abwehrmechanismen der Wirte gegen *T. gondii* vielfältig und oftmals gewebsspezifisch unterschiedlich sind, ist es ein sehr erfolgreicher Parasit. Dies nicht zu letzt deshalb, weil *Toxoplasma* in der Lage ist, auf die Abwehr durch den Wirt zu reagieren. Dafür kann es nicht nur in das ruhende Bradyzoitenstadium übergehen und sich in Gewebszysten „verbergen“, sondern auch aktiv in Wirtssignalwege, die Genexpression und die Apoptose der Wirtszelle eingreifen sowie Immunzellen „für eigene Zwecke missbrauchen“.

### *2.5.1 Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten*

Die IFN-γ vermittelte Immunantwort tötet die Mehrheit der Tachyzoiten in der akuten Phase ab und kontrolliert außerdem die chronische Phase (LANG ET AL., 2007; SUZUKI ET AL., 1988, 1989). Ebenso werden extrazelluläre Toxoplasmen schnell vom Immunsystem eliminiert (MCCABE & REMINGTON, 1988). Unter dem Immundruck konvertiert *T. gondii* daher von Tachyzoiten zu den weniger-immunogenen, ruhenden Bradyzoiten, die sich im Gewebe enzystieren (DUBEY ET AL., 1998; WEISS & KIM, 2000); siehe auch 2.1.2.

### *2.5.2 Schutz in der parasitophoren Vakuole und Bildung von Gewebszysten*

Die parasitophore Vakuole umgibt den Parasiten, bietet ein stabiles Umfeld für die Parasitenreplikation und eine Plattform für die Modulation der Wirtszellfunktionen, die die Parasitenreplikation unterstützen (BEYER ET AL., 2002). Die PV wird während der Invasion des Parasiten modifiziert und besteht sowohl aus Parasiten- als auch Wirtsmembran unter Ausschluß von Transmembranproteinen des Wirtes, weswegen sie nicht mit Lysosomen fusioniert (CHARRON & SIBLEY, 2004; MORDUE ET AL., 1999; JOINER ET AL., 1990). Diese Fusionsinkompetenz ist irreversibel und unabhängig davon, ob der Parasit innerhalb der PV lebendig ist oder nicht (JOINER ET AL., 1990). Die PV-Membran ist durchlässig für kleine Moleküle wie Nukleobasen, Kofaktoren, Aminosäuren und Zucker, die teilweise essentiell für *Toxoplasma* sind (SCHWAB ET AL., 1994).

Innerhalb von 6-7 Tagen nach der *Toxoplasma*-Infektion findet eine natürliche Bildung von Gewebszysten statt, die lebenslang im Wirt persistieren können (DUBEY ET AL., 1998). Gewebszysten kommen besonders häufig im Zentralnervensystem (SUZUKI, 2002), den Augen und dem Muskelgewebe vor (DUBEY, 1998a). Warum diese Gewebe eine solche Sonderstellung haben, ist nicht genau bekannt. Möglicherweise bedingen der Immunstatus beziehungsweise die Mikroumgebung dieser Gewebe eine verlangsamte Bekämpfung der Tachyzoiten.

### *2.5.3 Beeinflussung von Signalwegen des Wirtes*

Es wurde gezeigt, dass einige *Toxoplasma*-Proteine die Fähigkeit haben, in den Nukleus der Wirtszelle zu translozieren und dort die Gentranskription beeinflussen.
So können beispielsweise einige der Rhoptrienproteine aus Typ I- oder Typ III-Toxoplasmen die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT6 verhindern, wenn sie in Typ II-Parasiten exprimiert werden (SAEIJ ET AL., 2007). Dies resultiert in einer gehemmten Steigerung der IL-12 Produktion bei einer Infektion mit Typ II-Toxoplasmen, was eine Hemmung der IFN-γ-Produktion zur Folge hat (SAEIJ ET AL., 2006; ROBBEN ET AL., 2004). Zusätzlich können STAT1-abhängige Promotoren durch *T. gondii* blockiert werden (LANG ET AL., 2006; KIM ET AL., 2007; LÜDER ET AL., 2003). Dies führt in verschiedenen Zellen zu der Blockierung der IFN-γ-induzierten Expression von MHC Klasse II-Molekülen (LÜDER ET AL., 2003, 1998), die normalerweise Proteinfragmente intrazellulärer Pathogene auf der Oberfläche präsentieren. Dadurch ist die Aktivierung der $CD4^+$ Zellen vermindert (LÜDER 2001), was erklären könnte, warum diese Zellen in der frühen Phase einer Infektion von geringerer Bedeutung sind als die $CD8^+$ Zellen. Das frühe Ausschalten der IFN-γ-vermittelten Immunantwort ist demnach maßgeblich für die Virulenz von Toxoplasmen. Bei Typ III-Toxoplasmen spielen offensichtlich noch andere Faktoren eine Rolle wie z.B. eine niedrige Expression von ROP18, was die Replikationsrate verringert (TAYLOR ET AL., 2006; EL HAJJ ET AL., 2007).

### *2.5.4 Inhibition der Apoptose durch* Toxoplasma gondii

Programmierter Zelltod bzw. Apoptose ist eine Reaktion von Zellen, die mit Viren, Bakterien oder eukaryotischen Pathogenen infiziert sind (TORCHINSKY ET AL., 2010). So wird die

Replikation und Ausbreitung des Pathogens verhindert. Die Vorgänge führen in der Wirtszelle zu der Proteinspaltung, Abbau des Nukleus, DNA-Degradation, dem Kollaps des Zytoskeletts und zur Veränderung der Zelloberfläche, wodurch die betroffenen Zellen durch umgebende Zellen und Makrophagen erkannt werden (EARNSHAW ET AL., 1999). Der apoptotische Prozess involviert eine Kaskade von Zystein-Proteasen, den Caspasen, die für die Regulation und Exekution der Apoptose eine wichtige Vorraussetzung sind (GREEN & REED, 1998). Sie werden je nach ihrer Funktion in Initiator- (Amplifikation des Signals) und Ausführungs-Caspasen unterteilt (FISCHER ET AL., 2003).

Es gibt drei Hauptwege der Apoptose, für die *T. gondii* jeweils einen Evasionsmechanismus entwickelt hat (LÜDER & GROß, 2005). So wirkt der Parasit antagonistisch gegen die Initiator-Caspase im Todes-Rezeptor-Weg (VUTOVA ET AL., 2007) und aktiviert antiapoptotische Proteine im mitochandrialen / intrinsischen Weg (GOEBEL ET AL., 2001; MOLESTINA ET AL., 2003; KELLER ET AL., 2006). Im Verlauf des Granzym- / Perforin-Wegs wird Kalzium ausgeschüttet, was neben der Apoptose der Wirtszelle auch einen Egress des Parasiten auslöst und ihm hilft, in benachbarte Zellen und einwandernde Immunzellen zu disseminieren (MOUDY ET AL., 2001; PERSSON ET AL., 2007).

### *2.5.5 Egress aus der Wirtszelle –* Toxoplasma *auf der Flucht*

*In vitro* durchlaufen Toxoplasmen im Lauf von 2 bis 3 Tagen 5 bis 7 Teilungszyklen, bevor sie letzten Endes die Wirtzelle lysieren und einen neuen Infektionszyklus beginnen (BLACK & BOOTHROYD, 2000). Der Egress kann aber auch durch die Zugabe verschiedener Substanzen wie Kalzium-Ionophoren und DTT induziert werden (BLACK ET AL., 2000; MOUDY ET AL., 2001; CALDAS ET AL., 2007; ARRIZABALAGA ET AL., 2004). Das gleiche gilt für Induktoren der Apoptose wie Perforin oder Fas-Liganden (PERSSON ET AL., 2007). *In vitro* kann der Mechanismus des induzierten von dem des spontanen Egress abweichen (LAVINE & ARRIZABALAGA, 2008), was Hinweise darauf gibt, dass es sich beim induzierten Egress um eine *Toxoplasma*-eigene Funktion handelt.

Ein Auslöser des Egress kann beispielsweise die Reaktion auf IRG-Proteine sein, die sich auf der PV abgelagert und zu deren Permeabilisierung und Ruptur geführt haben. Bei einer Infektion von aktivierten Astrozyten mit virulenten Typ I-Parasiten ist der Parasit in der Lage, die Anlagerung der IRG-Proteine auf der PV-Membran zu überstehen und die Wirtszelle zu verlassen, ohne sie zu zerstören (MELZER ET AL., 2008).

## 2.6 Zielsetzung dieser Doktorarbeit

*Toxoplasma gondii* persistiert bevorzugt im Muskelgewebe innerhalb der Gewebszysten. Über diese wird der Parasit beim Genuss von unzureichend gegartem Fleisch auf den Menschen übertragen. Daher ist es von großer Wichtigkeit, mehr über die Mechanismen herauszufinden, die zu der Bildung dieser Gewebszysten im Muskelgewebe von chronisch infizierten Nutztieren führen.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in der das Projekt bearbeitet wurde, weisen interessanterweise auf eine besonders effektive Differenzierung des Parasiten in primären Skelettmuskelzellen *in vitro* hin (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009a, 2009b). Die Faktoren und molekularen Mechanismen, die die Differenzierung und Persistenz des Parasiten in Muskelzellen begünstigen, sind bis heute jedoch weitgehend unbekannt.

Es ist bekannt, dass das Zytokin IFN-γ - teilweise in Synergie mit TNF - eine wichtige Rolle in der Abwehr des Parasiten in Makrophagen, Fibroblasten oder Astrozyten spielt (MILLER ET AL., 2009; SUZUKI ET AL., 1988). Auf der anderen Seite ist *Toxoplasma* in der Lage, mit der durch IFN-γ ausgelösten Signaltransduktion seiner Wirtszellen zu interferieren (LÜDER ET AL., 2009).

Aufgrund dessen wurde im Lauf dieser Dissertation untersucht, welche Bedeutung IFN-γ und TNF als proinflammatorische Zytokine in der Infektabwehr in SMZ zukommt. Mögliche Effektormechanismen, die nach Stimulation mit diesen Zytokinen induziert werden könnten, wurden analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob *Toxoplasma* in diesen Zellen in der Lage ist, mit den induzierten Mechanismen zu interferieren und so der Immunantwort des Wirtes zu entgehen.

Dies sollte zu neuen Erkenntnissen über die Besonderheiten von SMZ beitragen, die dazu führen, dass der Parasit besonders dort persistiert. Dies könnte im ToxoNet-Projekt zur „Toxoplasmose bei Mensch und Tier in Deutschland: Pathogenese, Risikofaktoren und Kontrolle“, in dessen Rahmen diese Dissertation angefertigt wurde, zum Verständnis der Übertragung von *Toxoplasma gondii* über kontaminierte Lebensmittel beitragen.

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

### *3.1.1 Verbrauchsmaterialien*

| | Beschreibung | Hersteller |
|---|---|---|
| Cryoröhrchen | Nunc, 2 mL | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Filterpapier | Whatman Grade 4 | Rettberg, Göttingen |
| Glasplättchen | ∅ 13 mm | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Objektträger | 76 x 26 mm, Mattrand | Knittel Gläser, Braunschweig |
| Nitrozellulosemembranen | Hybond ECL | GE Healthcare, München |
| Petrischalen | ∅ 94 mm | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Reaktionsröhrchen | 1,5 und 2 mL | Sarstedt, Nümbrecht |
| | 15 und 50 mL | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Skalpelle | Technocut | HMD Healthcare, Hereford |
| Spatel | Zellschaber 24 cm | Biochrom, Berlin |
| Zellkulturflaschen | T75 (75 $cm^2$) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturschalen | Cellbind 96-Napfplatten (für die primären Zellen) | Corning; New York |
| | sonstige Napfplatten | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

### *3.1.2 Lösungen und Chemikalien*

| Lösung/Substanz | Rezept/Konzentrationen | Hersteller |
|---|---|---|
| Basiskulturmedium DMEM | Pulvermedium ohne Na-Pyruvat<br>2 mM HEPES<br>1,6 mM $NaHCO_3$<br>pH 7,2 | alles Biochrom, Berlin |
| Basiskulturmedium RPMI | RPMI 1640 Pulvermedium<br>2 g/L $NaHCO_3$<br>pH 7,2 | alles Biochrom, Berlin |

Spezielle Kulturmedien

| | | |
|---|---|---|
| - für C2C12-Zellen | DMEM | s.o. |
| | 10% Hyclone FCS | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| | 100 U/mL Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 0,1 mg/mL Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| - für Differenzierung von C2C12-Zellen | DMEM | s.o. |
| | 2% Pferdeserum | Biochrom, Berlin |
| | 100 U/mL Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 0,1 mg/mL Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| - für L929-Zellen | DMEM | s.o. |
| | 3% Hyclone FCS | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| | 1% NEAA | Biochrom, Berlin |
| | 1 mM Na-Pyruvat | Biochrom, Berlin |
| | 100 U/mL Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 0,1 mg/mL Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| - für NIH3T3-Zellen | siehe C2C12-Zellen | |
| - für primäre SMZ (Skelett-muskelzellen) | DMEM | s.o. |
| | 5% Hyclone FCS | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| | 9% Pferdeserum | Biochrom, Berlin |
| | 2,5 mM $CaCl_2$ | Roth, Karlsruhe |
| | 100 U/mL Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 0,1 mg/mL Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| - für *Toxoplasma* | RPMI | s.o. |
| | 1% Hyclone FCS | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| | 100 U/mL Penicillin | Biochrom, Berlin |
| | 0,1 mg/mL Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Aminocapronsäure | 40 mM 6-Aminohexansäure | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxosulfat | 10% APS | Merck, Mannheim |
| Acryl-Bisacrylamid | Rotiphoresegel 30 | Roth, Karslruhe |

| | | |
|---|---|---|
| Blockierlösung für Westernblot | 5% Magermilchpulver | Sucofin |
| | 0,2% Tween-20 | Sigma-Aldrich, München |
| | 0,02% $NaN_3$ | Merck, Mannheim |
| | in PBS pH 7,4 | Biochrom, Berlin |
| Blot-Waschlösung | 0,05% Tween-20 | Sigma-Aldrich, München |
| | in PBS pH 7,4 | Biochrom, Berlin |
| Borat-Puffer | 0,125 M Borat pH 7,4 | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | 200 mg/L | Amresco, Solon |
| BSA | Rinderserum Albumin Fraktion V | Biomol, Hamburg |
| Collagen | Collagen I, rat tail | BD, Heidelberg |
| CPRG-Fixativ | 4% Formaldehyd | Sigma-Aldrich, München |
| | 250 mM NaCl | Merck, Mannheim |
| | 25 mM NaOH | Merck, Mannheim |
| | in HBSS (Gibco) pH 7,4-8 | Invitrogen, Darmstadt |
| CPRG-Reagenz | 1% TX-100 | Sigma-Aldrich, München |
| | 0,1 mM CPRG | Sigma-Aldrich, München |
| | 5 mM $MgCl_2$ | Merck, Mannheim |
| | in HBSS (Gibco) | Invitrogen, Darmstadt |
| DMSO | 20% Dimethylsulphoxid | Sigma-Aldrich, München |
| ECL-Detektionsreagenz | ECL Westernblotting Detection Reagents | GE Healthcare, München |
| EDTA-Lösung | 1% (w/v) w/o $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ | Biochrom, Berlin |
| Essigsäure | $CH_3COOH$ abs. | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | $C_2H_5OH$ abs. | Merck, Mannheim |
| Salzsäure | HCl 37% | Merck, Mannheim |
| IFN-γ | recombinant mouse IFN-γ | R&D, Wiesbaden |
| Immersionsöl | 518N | Zeiss, Göttingen |
| Inkubationslösung für IFT | 0,1 mg/mL Saponin | Sigma-Aldrich, München |
| | 1% BSA | Biomol, Hamburg |
| | in PBS | Biochrom, Berlin |
| Inkubationslösung für Westernblot | 5% Magermilchpulver | Sucofin |
| | 0,05% Tween-20 | Sigma-Aldrich, München |
| | in PBS pH 7,4 | Biochrom, Berlin |

| | | |
|---|---|---|
| Laminin | Laminin mouse | BD, Heidelberg |
| L-NIL | L-$N^6$-(1-Iminoethyl)-lysinehydrochloride | Sigma-Aldrich, München |
| Methanol | $CH_3OH$ abs. | Roth, Karlsruhe |
| Mowiol | 7,6 g/mL Mowiol | Merck, Mannheim |
| | 20% Glyzerin | Avantor, Deventer |
| | in Tris/HCl pH 8,5 | Merck, Mannheim |
| Natriumazid | 2% $NaN_3$ | Merck, Mannheim |
| $NH_4Cl$-Lösung | 50 mM $NH_4Cl$ | Merck, Mannheim |
| | in PBS-Puffer | Biochrom, Berlin |
| Griess-Reagenz | 0,5% Sulphanilamid | Sigma-Aldrich, München |
| | 0,05% Naphthyldiamin-dihydrochlorid | Sigma-Aldrich, München |
| | in 5% $H_3PO_4$ | Merck, Mannheim |
| PBS | PBS Dulbecco w/o $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ | Biochrom, Berlin |
| PBS-Saponin-Lösung | 0,1 mg/mL Saponin | Sigma-Aldrich, München |
| | in PBS | Biochrom, Berlin |
| Permeabilisierungs-/ | 0,1 mg/mL Saponin | Sigma-Aldrich, München |
| Blockierungslösung für IFT | 1% BSA | Biomol, Hamburg |
| | in PBS | Biochrom, Berlin |
| PonceauS | 14% PonceauS | Roth, Karlsruhe |
| Propidiumjodid | 5 µg/mL | Sigma-Aldrich, München |
| Zell-Lysepuffer | 1% Triton X-100 | Sigma-Aldrich, München |
| | 0,15 M NaCl | Merck, Mannheim |
| | 50 mM Tris pH 8,0 | Merck, Mannheim |
| | 50 mM NaF | Merck, Mannheim |
| | 5 mM Na-Pyrophosphat | Sigma-Aldrich, München |
| | 1 mM PMSF | Sigma-Aldrich, München |
| | 1 mM Na-Orthovanadate | Sigma-Aldrich, München |
| | 5 µg/mL Pepstatin | Sigma-Aldrich, München |
| | 5 µg/mL Leupeptin | Sigma-Aldrich, München |
| | 5 µg/mL Aprotinin | Sigma-Aldrich, München |
| | 1 mM EDTA pH 8 | Merck, Mannheim |

| | | |
|---|---|---|
| Proteinmarker | Prestained Protein Marker | NEB, Frankfurt a. M. |
| Ringer-Medium | 154 mM NaCl | Roth, Karlsruhe |
| | 3,35 mM KCl | Merck, Mannheim |
| | 1,7 mM $CaCl_2$ | Roth, Karlsruhe |
| Pfa-Lösung | 4% Paraformaldehyd | Merck, Mannheim |
| | 0,1 M Na-Cacodylat | Roth, Karlsruhe |
| | auf pH 7,4 mit HCl | Merck, Mannheim |
| poly-Ornithin | poly-DL-Ornithin-Hydrobromid | Sigma-Aldrich, München |
| RNasin | 40 U/µL RNasin | Promega, Madison |
| SDS | 10% Sodiumdodecylsulfat | Serva, Amstetten |
| SDS-Laufpuffer 10 x | 30,3 g/L Tris | Merck, Mannheim |
| | 144,1 g/L Glycin | Roth, Karlsruhe |
| | 10 g/L SDS | Serva, Amstetten |
| | pH 8,3-8,5 mit Glycin | |
| SDS-Probenpuffer 2 x | 40 g/L SDS | Serva, Amstetten |
| | 10 g/L DTT | Sigma-Aldrich, München |
| | 200 mg/L Bromphenolblau | Amresco, Solon |
| | 8% Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| | in 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | Merck, Mannheim |
| TEMED | | Roth, Karlsruhe |
| TNF | recombinant mouse TNF | BD, Heidelberg |
| Trypsin-Lösung | 0,25% in PBS w/o $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ | Biochrom, Berlin |
| Trypsinier-Lösung | 0,01% EDTA | alles Biochrom, Berlin |
| | 0,05% Trypsin | |
| | in PBS | |

### *3.1.3 Geräte*

| Gerätbeschreibung | Typ | Hersteller |
|---|---|---|
| Binokulares Mikroskop | DMIL | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Brutschrank | BB 6220 CU | Heraeus, Hanau |
| Geldokumentationsanlage | ImageQuant LAS-4000 | Fujifilm, Düsseldorf |

| | | |
|---|---|---|
| Konfokales Laserscanmikroskop | TCS SPII | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Mikroliterpipetten | Research (variabel) | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroplattenleser | Victor$^3$V | PerkinElmer, Rodgau |
| Mikroskop | Axiostar Plus | Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen |
| Mikrozentrifuge | Centrifuge 5424 | Eppendorf, Hamburg |
| Plattenphotometer | LP 400 | Sanofi, Frankfurt a. M. |
| Powersupply | Electrophoresis Power Supply EPS 500/400 | Pharmacia Biotech, Wien |
| SDS-PAGE System | Protean | BioRad, München |
| Semidry-Blotgerät | Semidry-Electroblotter | Sartorius, Göttingen |
| Sterilwerkbank | | BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen |
| Thermocycler | LightCycler | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Zählkammer | Neugebauer | Roth, Karlsruhe |
| Zentrifuge | Megafuge 2.0 | Heraeus, Hanau |

### *3.1.4 Kits*

| Anwendung | Name | Hersteller |
|---|---|---|
| Messung Zytotoxizität | Cytotoxicity Detection Kit$^{PLUS}$ (LDH) | Roche, Mannheim |
| quantitative PCR | LightCycler® FastStart DNA Master$^{PLUS}$ SYBR Green I (Set) | Roche, Mannheim |
| reverse Transkription | Omniscript® RT Kit | Qiagen, Hilden |
| RNA-Isolation | GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit | Sigma-Aldrich, München |

### *3.1.5 Lebendes Material*

| Zellinien | Beschreibung | Bezogen von |
|---|---|---|
| C2C12-Zellen | permanente murine Skelettmuskelzellen | ATCC, Wesel |
| NIH3T3-Zellen | murine permanente Fibroblasten | ATCC, Wesel |
| L929-Zellen | murine permanente Fibroblasten | Institutseigene Charge |
| primäre SMZ | primäre murine Skeletmuskelzellen | eigene Isolation |

| Parasitenstämme | |
|---|---|
| p-CC-NTE | klinisches Isolat, Typ II Toxoplasmen |
| RH HxQ sag LacZ | transgene Typ I Toxoplasmen, enthalten *LacZ* |

Mäuse: NMRI, bezogen von Charles River, Erkrath.

### *3.1.6 Antikörper*

| Primäre Antikörper | Beschreibung | Hersteller |
|---|---|---|
| αAktin | Maus, zur Verfügung gestellt von | J. Lessard, Cincinnati |
| CC2 | monoklonal Ratte anti-Bradyzoiten-enthaltende parasitophore Vakuolen | eigene Herstellung |
| αDesmin | monoklonal Maus $IgG_{2b}$ anti-Desmin | BD, Heidelberg |
| αIrga6 | Kaninchen 16s, zur Verfügung gestellt | von J. Howard, Köln |
| αMyoD | monoklonal Maus $IgG_1$ anti-MyoD | BD, Heidelberg |
| αMyogenin | monoklonal Maus $IgG_1$ anti-Myogenin | |
| αMyosin HC | MHC (H-300): sc-20641 | Santa Cruz, Delaware |
| α*Toxoplasma* | Polyklonal, Kaninchen | eigene Herstellung |
| α*Toxoplasma* | Polyklonal, Maus | eigene Herstellung |
| αSAG1 | Maus | eigene Herstellung |

| Sekundäre Antikörper | Hersteller |
|---|---|
| Cy™3-konjugiertes Esel $F(ab')_2$-Fragment anti-Maus IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch/ dianova, Hamburg |
| Cy™3-konjugiertes Esel $F(ab')_2$-Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L) | s.o. |
| Cy™2-konjugiertes Esel $F(ab')_2$-Fragment anti-Maus IgG (H+L) | s.o. |
| Cy™2-konjugiertes Esel $F(ab')_2$-Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L) | s.o. |
| Cy™2-konjugiertes Esel $F(ab')_2$-Fragment anti-Ratte IgG (H+L) | s.o. |
| Peroxidase-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (H+L) | s.o. |
| Peroxidase-konjugiertes Esel anti-Kaninchen IgG (H+L) | s.o. |

### *3.1.7 Primer*

| Für | Name | Sequenz | Anlagerungs T [°C] |
|---|---|---|---|
| βAktin | mActβ_for | GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC | 72 |
| | mActβ_rev | TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG | 72 |
| Irgm3 (IGTP) | mIGTP_for | TGAACAAGTTCCTCAGGGTTC | 63 |
| | mIGTP_rev | TGAAGGAACGGGCTATTACAG | 63 |
| Irga6 | mIrga6_for | TTCCCTAGCTGGCAATCGTCAA | 72 |
| | mIrga6_rev | GGCTTTATGTGGGTTCTGGGTATC | 72 |
| MyoD | mMyoD1_forNEU | GCGCCGCTGCCTTCTACG | 72 |
| | mMyoD1_revNEU | CTCGACACAGCCGCACTCTTC | 72 |
| Myf5 | mMyf5_forNEU | TGCCATCCGCTACATTGAG | 72 |
| | mMyf5_revNEU | CTGGACACGGAGCTTTTATCTG | 72 |
| Myogenin | mMyog_for_NEU | AGCGGCTGCCTAAAGTGGA | 72 |
| | mMyog_revNEU | CAGCCGCGAGCAAATGAT | 72 |
| NOS2 | mNOS2_for | CGAGGAGCAGGTGGAAGACTATTT | 72 |
| | mNOS2_rev | GAGAGGGGAGGGAGGAGAGGA | 72 |

## 3.2 Methoden

### *3.2.1 Zellkulturarbeiten*

Alle verwendeten Parasiten und Zelllinien wurden sowohl für die Subkultivierung als auch bei Experimenten im Brutschrank bei 37°C und einer $CO_2$-Spanne von 5% gehalten.

a) Kultivierung von L929-Zellen als Vermehrungsgrundlage von *Toxoplasma*

Um die intrazellulären Toxoplasmen für Infektionsversuche dauerhaft in Kultur zu halten, mussten die für die Subkultivierung verwendeten murinen Fibroblasten (L929-Zellen) auch uninfiziert propagiert werden.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich aus den 6-Napfschalen mit einem Spatel abgeschabt, resuspendiert und je nach Dichte der Zellen mit vier bis sechs Tropfen pro Napf in einer neuen 6-Napfschale ausgesät. Nach der Zugabe von 3 mL vorgewärmtem L929-Kulturmedium je Napf wurden sie im Brutschrank inkubiert.

b) Subkultivierung der Toxoplasmen

Die Toxoplasmen wurden zweimal wöchentlich mit L929-Wirtszellen subkultiviert. Dafür wurden sowohl L929-Zellen als auch Parasiten nach einem Gradienten-Schema ausgesät, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Näpfe mit für Experimente tauglichen Parasiten zu haben (Abb. 3.1).

Zunächst wurden die L929-Zellen wie unter a) beschrieben abgelöst und nach dem Schema in 12-Napfschalen verteilt. Nun wurden etwa 14 mL vorgewärmtes *Toxoplasma*-Kulturmedium gleichmäßig in die Näpfe gegeben. Daraufhin wurden am Binokular aus den 12-Napfschalen Toxoplasmen ausgewählt, die bereits extrazellulär, aber nicht abgerundet, sondern noch bananenförmig und somit lebendig waren. Diese Parasiten wurden nach dem Schema in die 12-Napfschale mit den frischen L929-Zellen gegeben.

| | Toxoplasmen ($*10^6$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2,4 ↓ | 1,6 ↓ | 1,6 ↓ | 0,8 ↓ |
| L929-Zellen ($*10^5$) 1,5 → | | | | |
| 1 → | | | | |
| 0,5 → | | | | |

**Abb. 3.1: Schema für die Subkultivierung von *Toxoplasma***
Für die Subkultivierung wurden die Toxoplasmen und Wirtszellen in einem Gradienten in 12-Napfschalen ausgesät.

c) Isolierung von Toxoplasmen für Experimente

Für Experimente mussten die Toxoplasmen aus den Subkulturen weitgehend von den Wirtszellen getrennt werden. Dies wurde durch differentielle Zentrifugationsschritte erreicht.

Im ersten Schritt wurden das Parasiten/L929-Zellgemisch resuspendiert und die Wirtszellen bei 350 x g 5 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den Parasiten wurde in einem neuen Gefäß 10 min bei 1314 x g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und das Parasitenpellet mit 10 mL *Toxoplasma*-Kulturmedium gewaschen, indem er resuspendiert und dann erneut 10 min bei 1314 x g zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde je nach Größe in 200-800 µL *Toxoplasma*-Kulturmedium aufgenommen. Die Parasitenzahl wurde von jeweils einer Verdünnung von 1:40 und 1:80 mit Hilfe der Neugebauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Daraufhin wurde die *Toxoplasma*-Konzentration für das jeweilige Experiment mit dem verwendeten Wirtszell-Kulturmedium eingestellt und die Wirtszellen infiziert. Infektionsdosen siehe bei der Beschreibung des jeweiligen Versuchs.

d) Kultivierung von permanenten Skelettmuskelzellen (C2C12-Zellen)

Die C2C12-Zellen wurden trypsinisiert, um eine schonende Isolierung der Zellen zu erreichen. Zu beachten war auch, dass die C2C12-Zellen der Subkultur nicht konfluent wurden, da sie sonst anfingen, zu differenzieren und ihre Fähigkeit zur Proliferation verloren.

Für die Isolierung der Zellen wurde zweimal die Woche das Kulturmedium aus den T75-Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 3 mL EDTA-Lösung gespült. Diese wurde ebenfalls abgesaugt und 3 mL vorgewärmtes Trypsin auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun durch kräftiges Klopfen der T75-Flasche gegen den Handballen abgelöst, was am Binokular-Mikroskop kontrolliert wurde. Zu den 3 mL Trypsin/Wirtszellmischung wurden 7 mL vorgewärmtes C2C12-Kulturmedium gegeben, der Boden der T75-Flasche gespült, die Suspension in ein 50 mL-Röhrchen überführt und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einem angemessenen Volumen C2C12-Medium resuspendiert und mikroskopisch mit der Neugebauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Für die Subkultivierung der Zelllinie wurden jeweils Zellen in zwei neuen T75-Flaschen ausgesät. Die Zellmengen lagen dabei pro Flasche und je nach beabsichtigtem Wachstumszeitraum bei 2 bis 4 x $10^4$ Zellen in 25 mL vorgewärmtem C2C12-Kulturmedium. Die Anzahl der ausgesäten Zellen für Experimente ist jeweils bei der entsprechenden Versuchsbeschreibung zu finden.

Da C2C12-Zellen nicht stark adhärierten, wurden verwendete Glasplättchen vor dem Aussäen der Zellen mit Collagen beschichtet. Dafür wurde 50 µg/mL Collagen in 0,02 N Essigsäure gelöst und die Glasplättchen mit der Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Aussäen der C2C12-Zellen wurden die Glasplättchen zweimal mit sterilem PBS-Puffer gespült.

e) Differenzierung von C2C12-Zellen

Die verwendeten C2C12-Zellen wurden als undifferenzierte Myoblasten subkultiviert und für Experimente *in vitro* differenziert.

Dies geschah, indem die Zellen in ausreichender Dichte ausgesät wurden (Zell-Zellkontakt beschleunigte die Differenzierung; in 96-Napfschalen $0{,}4*10^4$ Zellen/Napf, in 24-Napfschalen $4*10^4$ Zellen/Napf und in 6-Napfschalen $10*10^4$ Zellen/Napf). Außerdem wurde das Kulturmedium 24h nach dem Aussäen (hps) durch Differenzierungsmedium ausgetauscht. Für die Dauer der Differenzierung bis zur Infektion wurde anhand von

Voruntersuchungen ein Zeitraum von 120 h gewählt und die Proben vor der Infektion auf die Bildung synzytialer Myotuben überprüft.

f) Kultivierung der Kontroll-Fibroblasten (NIH3T3-Zellen)

Die NIH3T3-Zellen dienten als Kontrollzellen zu den SMZ und wurden für die Subkultivierung im gleichen Medium gehalten wie C2C12-Zellen.
Die Fibroblasten wurden wie für C2C12-Zellen beschrieben aus den T75-Kulturflaschen isoliert (s. 3.2.1 d). Für die Weiterführung der Zellen wurden sie in Verdünnungen von 1:8 bis 1:14 in neue T75-Flaschen ausgesät.
In Experimenten wurde das Kulturmedium zeitgleich mit der Infektion dem der jeweiligen Skelettmuskelzelllinie angepasst. Die Zellen wurden gewöhnlich drei Tage vor der Infektion ausgesät, die verwendeten Zellmengen sind jeweils bei den entsprechenden Experimenten beschrieben.

g) Isolation und Kultivierung von primären Skelettmuskelzellen

Die primären SMZ wurden aus Maus-Embryonen in einem Alter von ca. 16-18 Tagen nach Konzeption präpariert und isoliert.
Zunächst wurden die Muttertiere in einer $CO_2$-Kammer bis zur Ohnmacht betäubt. Dann wurden sie durch Überstreckung des Rückgrates und Genickbruch getötet. Alle weiteren Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.
Die Mäuse wurden auf einer Styropor-Platte festgesteckt, die Bäuche mit 70% Ethanol desinfiziert, die Haut mit einer Schere geöffnet und vom Peritoneum abgetrennt. Mit einer neuen Schere wurde nun der Bauchraum geöffnet, nach Entfernung etwaiger Fettlappen der Uterus herausgetrennt und dieser in eine Petrischale mit kaltem Ringer-Medium überführt.
Daraufhin wurden die Embryonen aus dem Uterus herausgetrennt, von den Fruchtblasen befreit, zum Töten dekapitiert und wiederum in eine neue Petrischale mit kaltem Ringer-Medium gebracht. Hier wurden die Hinterbeine der Embryonen auf Fußhöhe mit einer Pinzette gepackt und dicht am Leib abgetrennt. Die Füße wurden ebenfalls entfernt und nur die Oberschenkel in eine neue Petrischale mit Ringer-Medium auf Eis transferiert.
Die Oberschenkel wurden dann von der Haut befreit und mit einem Skalpell in sehr kleine Stücke geschnitten, wobei auch die Knochen entfernt wurden. Das gewonnene Gewebematerial wurde in einem 50 mL-Röhrchen zweimal kräftig mit eiskaltem Ringer-Medium durch Pipettieren gewaschen. Nach Absinken der Gewebebröckchen wurde der

Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Probe wurde auf die gleiche Art einmal mit PBS-Puffer gewaschen.
Zum Gewebematerial wurden 5 mL vorgewärmter Trypsinier-Lösung gegeben, durch Pipettieren kräftig resuspendiert und das Gemisch 3 min im Wasserbad bei 37°C geschwenkt. Das Gewebe wurde absinken gelassen und der erste Überstand verworfen. Die Trypsinierung wurde vier- bis fünfmal mit jeweils 10 mL wiederholt und der Überstand zum Abstoppen der Trypsinier-Reaktion in DMEM, 10% FCS auf Eis überführt. Das zunehmende Herauslösen der Zellen wurde parallel mikroskopisch verfolgt.
Das Zellmaterial wurde nun 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, das Pellet resuspendiert und in eine T75-Kulturflasche mit 25 mL vorgewärmten primär-SMZ-Kulturmedium überführt. Die Zellsuspension wurde zur Selektion der primären SMZ im Inkubator bebrütet, um den noch in der Probe enthaltenen Fibroblasten Zeit zu geben, sich an den Flaschenboden anzuheften. Nach 45 min wurde der weitgehend nur primäre SMZ enthaltende Überstand abgenommen und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem geringen Volumen vorgewärmten Zellmediums gelöst, in einer Neugebauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und den geplanten Experimenten entsprechend die Zellen in primär-SMZ-Kulturmedium ausgesät. Für genaue Zahlen siehe die jeweiligen Experimente.
Die Proliferation der primären SMZ wurde an Tag 1-2 und die Differenzierung an Tag 3-4 beobachtet. Die primären SMZ wurden alle drei Tage mit frischem Kulturmedium versehen und sechs Tage nach der Isolation infiziert, wenn eine deutliche Differenzierung der Zellen sichtbar war.

Für eine bessere Anhaftung der primären SMZ wurden alle Kulturgefäße vor dem Aussäen der Zellen über Nacht steril bei 4°C mit 0,5 mg/mL poly-Ornithin in 125 mM Borat-Puffer pH 7,4 beschichtet. Nach kurzem Waschen mit sterilem PBS-Puffer folgte eine Beschichtung mit 15 µg/mL Laminin für ca. 6 h bei Raumtemperatur.

h) Einfrieren und Auftauen von Wirtszellen

Von den verwendeten permanenten Zellen wurden Stabilate hergestellt, die über lange Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Frühzeitige Stabilate waren vor allem sinnvoll bei den verwendeten C2C12-Zellen, da diese mit steigender Passagen-Zahl zunehmend schlechter proliferierten.

Für die Herstellung von Zell-Stabilaten wurden die Zellen wie bereits beschrieben isoliert, ausgezählt und auf 6 x $10^6$ Zellen/mL mit normalem Medium eingestellt. Das Einfriermedium bestand aus 40% DMEM und 40% FCS, denen vorsichtig 20% DMSO frisch hinzugefügt worden war.
Die Zellsuspension und das Einfriermedium wurden vorsichtig 1:2 gemischt, zu je 1 mL in Cryoröhrchen gegeben und langsam über Nacht im Styroporblock bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Stabilate wurden diese im 37°C-Wasserbad angetaut, in 50 mL vorgewärmtes Kulturmedium gegeben und 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, in eine T75-Flasche überführt und dort in 25 mL Kulturmedium bis zur gewünschten Dichte kultiviert.

i) Einfrieren und Auftauen von Toxoplasmen

Das Einfrieren der Toxoplasmen wurde wie das von Wirtszellen durchgeführt, nur dass RPMI statt DMEM verwendet und 1 x $10^7$ Zellen eingefroren wurden.

Beim Auftauen wurden die *Toxoplasma*-Stabilate im 37°C-Wasserbad angetaut, in 50 mL vorgewärmtes Kulturmedium gegeben und 5 min bei 1314 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in *Toxoplasma*-Kulturmedium resuspendiert und in mehrere T25-Flaschen mit HFF-Wirtszellen überführt. Nach der Wirtszelllyse wurden die Toxoplasmen wie weiter oben beschrieben isoliert und auf L929-Zellen subkultiviert.

### *3.2.2 Aktivierung und Haltung der Zellen während der Experimente*

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte die Aktivierung der Wirtszellen mit 100 U IFN-γ/mL bzw. 100 pg TNF/mL Kulturmedium zeitgleich mit der Infektion und wurde alle 24 h aufgefrischt. Während laufenden Infektionsversuchen wurde das Kulturmedium alle 48 h erneuert.

### *3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung*

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde in dieser Arbeit die Lokalisation verschiedener Proteine bzw. von Toxoplasmen innerhalb der Wirtszellen dargestellt.

Hierfür wurden die Wirtszellen wie folgt in 24-Napfplatten ausgesät: 2,3 x $10^4$ C2C12-Zellen auf Collagen-beschichtete Glasplättchen sechs Tage vor Infektion, ab 24 hps Kultivierung in Differenzierungs-Medium; 3 x $10^4$ primäre SMZ in primär-SMZ-Kulturmedium auf poly-Ornithin/Laminin-beschichtete Glasplättchen sechs Tage vor Infektion und 3 x $10^4$ NIH3T3-Zellen auf unbeschichtete Glasplättchen drei Tage vor Infektion, letztere ab der Infektion im Kulturmedium der Vergleichsmuskelzellen.
Die Infektion erfolgte mit 6,5 x $10^4$ Parasiten parallel zur teilweisen Aktivierung mit IFN-γ und TNF.

a) Immunfluoreszenztest – Versuchsablauf

Die Proben auf den Glasplättchen wurden nach der Kultivierung zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Fixierung erfolgte daraufhin in 4% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und konnten nach der Zugabe von 0,02% $NaN_3$ zum Puffer im Kühlschrank gelagert werden.
Nach der Lagerung wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und 10 min in $NH_4Cl$-Lösung inkubiert, um eventuell durch Paraformaldehyd verstärkte Hintergrundfärbung zu dämpfen. Die Proben wurden danach 5 min in PBS-Puffer gewaschen, bevor sie 1 h bei Raumtemperatur in Permeabilisierungs-/ Blockierungslösung inkubiert wurden, um die Zellen zu permeabilisieren und unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.
Die Inkubation mit ein bis zwei Primär-Antikörpern erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur, indem die Glasplättchen mit der Zellseite nach unten auf einen 30 µL Tropfen des in IFT-Inkubationslösung verdünnten Antikörpers gelegt wurden (Tabelle 3.1). Die Proben wurden nach der Inkubation dreimal 10 min in PBS-Saponin-Lösung gewaschen und dann analog zum ersten Antikörper für 1 h mit den Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpern behandelt (Tabelle 3.2). Danach wurden die Präparate wiederum dreimal 10 min mit PBS-Saponin-Lösung und einmal mit PBS-Puffer gewaschen.
Optional wurden die Nukleinsäuren in den Präparaten mit Propidiumjodid gefärbt, um in rot die Gesamtzellpopulation darzustellen. Dafür wurden die Glasplättchen bis maximal 5 min mit 5 µg/mL Propidiumjodid-Lösung inkubiert und die Substanz durch zweimal Waschen mit PBS-Puffer für je 5 min entfernt.

**Tabelle 3.1: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenztests**

| Antikörper | Verdünnung | Herkunftsorganismus |
|---|---|---|
| αDesmin | 1:100 | Maus |
| CC2 (αPV mit Bradyzoiten) | 1:50 | Ratte |
| αIrga6 | 1:4.000 | Kaninchen |
| αMyHC | 1:100 | Kaninchen |
| αMyoD | 1:100 | Maus |
| αMyogenin | 1:100 | Maus |
| α*Toxoplasma* | 1:1000 | Kaninchen |
| α*Toxoplasma* | 1:100 | Maus |

**Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenztests**

| Antikörper | Verdünnung | Herkunftsorganismus |
|---|---|---|
| Cy3-konjugiertes anti-Kaninchen IgG | 1:800 | Esel |
| Cy3-konjugiertes anti-Maus IgG | 1:400 | Esel |
| Cy2-konjugiertes anti-Kaninchen IgG | 1:100 | Esel |
| Cy2-konjugiertes anti-Maus IgG | 1:50 | Esel |
| Cy2-konjugiertes anti-Ratte IgG | 1:50 | Esel |

Die Präparate wurden nun mit entmineralisiertem Wasser gespült, von der überschüssigen Flüssigkeit befreit und mit 10 µL Mowiol pro Glasplättchen auf Objektträgern eingedeckelt.
Nach einer Aushärtungszeit über Nacht konnten die Präparate mikroskopisch untersucht und im Kühlschrank gelagert werden.

b) Mikroskopie und Aufnahme von Bildern

Alle Immunfluoreszenzpräparate wurden am Konfokalen Laserscanmikroskop (Leica) ausgewertet und mit der Hersteller-Software Bilder erstellt.
Es wurde dafür das 63er Objektiv mit Immersionsöl benutzt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Line averaging von 8 bei den Anregungswellenlängen von 433 und 543 nm und einer Detektion bei 500-530 und 555-615 nm.

c) Bestimmung der Vakuolengrößen

Die Größe der parasitophoren Vakuolen (PV) wurde als Merkmal für die Replikationsfähigkeit des Parasiten herangezogen.

Sie wurden bestimmt, indem am Mikroskop die Anzahl der Parasiten in hundert PV ermittelt und die durchschnittliche Parasitenzahl pro PV errechnet wurde.

d) Bestimmung der Infektionsraten

Die Infektionsraten ergeben sich aus der Fähigkeit des Parasiten, in eine Wirtszelle einzudringen und wurden ermittelt, indem der prozentuale Anteil infizierter Zellen an fünfhundert Wirtszellen mikroskopisch bestimmt wurde. Dabei war zu beachten, dass mehrfach infizierte Zellen nur einmal gezählt wurden.

e) Bestimmung der Stadienkonversionsraten

Die Stadienkonversion des Parasiten von den schnell replizierenden Tachyzoiten zu den ruhenden Bradyzoiten ist ein Maß für den durch die Wirtszelle ausgeübten Abwehrdruck auf den Parasiten.
Die Stadienkonversionsraten ergaben sich aus den für Bradyzoiten-Proteine positiv gefärbten PV unter hundert Vakuolen und wurden ebenfalls mikroskopisch bestimmt.

### *3.2.4 Quantitative PCR*

Die Aktivität einzelner Gene gibt Rückschlüsse auf die aktuell in der Zelle ablaufenden Vorgänge. Daher wurde hier die Differenzierung von C2C12-Zellen auch anhand der Regulation der muskelspezifischen Gene *Myf5*, *MyoD* und *Myogenin* untersucht. Ebenfalls wurde analysiert, wie eine Aktivierung nicht infizierter und infizierter Wirtszellen mit IFN-γ die Regulation der Gene *NOS2*, *Irga6* und *Irgm3* beeinflusst.
Dies wurde am Lightcycler durch „real time“-PCR erreicht. Dabei wurde aus der cDNA einer Probe mit Primern ein spezifisches Produkt amplifiziert und die in doppelsträngige DNA eingebaute fluoreszierende Substanz SYBR Green in Echtzeit proportional zur Produktmenge gemessen. Als Anzahl der Zyklen zu Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation wurden die durch den LightCycler bestimmten Crossingpoints verwendet und als Grundlage für die späteren Berechnungen verwendet.

a) Zellkultur und Infektion mit *Toxoplasma*

Für die Versuche wurden die Wirtszellen wie folgt in 6-Napfplatten ausgesät: 10 x $10^4$ C2C12-Zellen, Wechsel zum Differenzierungsmedium 24 hps; 14,3 x $10^4$ primäre SMZ und 15 x $10^4$ NIH3T3-Zellen, wobei letztere am Tag des Versuches im Kulturmedium der

im Vergleich verwendeten SMZ-Linie überführt wurden. Abgesehen von den Versuchen zur Expression muskelzellspezifischer Proteine wurden die permanenten und primären SMZ sechs Tage und die Fibroblasten drei Tage nach Aussäen in Experimenten eingesetzt. Die Zellen wurden gegebenenfalls mit 30 x $10^4$ Toxoplasmen infiziert, die Aktivierung mit IFN-γ und TNF erfolgte parallel dazu. Die Zytokine wurde alle 24 h frisch zugegeben und das Kulturmedium alle 48 h gewechselt.

b) RNA-Isolierung und Herstellung der cDNA

Die RNA wurde zu den untersuchten Zeitpunkten aus den Zellen mittels des GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kits (SIGMA) gemäß Herstellerempfehlung isoliert.
Die reverse Transkription zur Herstellung der cDNA erfolgte über Nacht bei 37°C in folgendem Ansatz:

| | |
|---|---|
| 3 µL | 10 x RT-Puffer |
| 4 µL | dNTPs jeweils 5 mM |
| 0,4 µL | OligodT 50 µM |
| 1 µL | RNasin 10 U/µL |
| 1 µL | Reverse Transkriptase |
| 60 ng | RNA-Template |
| 1,6 µL | PCR-geeignetes $H_2O$ |

c) Quantitative PCR der cDNA-Proben

In der qPCR wurden jeweils zwei Verdünnungen pro Probe cDNA eingesetzt. Das waren die Verdünnungen 1:2 und 1:20 bei *NOS2* bzw. 1:5 und 1:50 bei *MyoD*, *Myf5*, *Myogenin*, *βAktin*, *Irga6* und *Irgm3*. Da teilweise bei *NOS2* kein Produkt detektiert werden konnte, wurden hier auch unverdünnte Proben eingesetzt.
Nachdem der Mastermix des verwendeten Kits nach Hersteller-Protokoll angesetzt war, wurde der PCR-Mix wie folgt pipettiert:

| | |
|---|---|
| 4 µL | LightCycler Mastermix |
| 1 µL | Vorwärts-Primer 10 mM |
| 1 µL | Rückwärts-Primer 10 mM |
| 5 µL | cDNA-Probe (evtl. verdünnt) |
| 9 µL | PCR-geeignetes $H_2O$ |

Das Programm im Lightcycler setzte sich abgesehen von der spezifischen Anlagerungs-Temperatur x für die jeweiligen Primer wie folgt zusammen:

| Schritt | T [°C] | t [m:s] | Messung | Wiederholungen |
|---|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95 | 10:00 | - | |
| Amplifikation | 95 | 0:10 | - | |
| | x | 0:5 | - | 45 |
| | 72 | 0:15 | einzeln | |
| Schmelzkurve | 95 | 0:00 | - | |
| | 60 | 0:15 | - | |
| | 99 | 0 | kontinuierlich | |
| Ende | 40 | 0:10 | - | |

Die Anlagerungstemperaturen der Primer sind unter 3.1.6 aufgeführt.

d) Auswertung

Zur Auswertung wurden die Crossingpoints (Cp) der Proben zu Zeitpunkt 0 ($t_0$) und x ($t_x$) der Probennahme herangezogen.

Für die Muskelmarker wurde zur Bestimmung der Hochregulierung folgende Formel verwendet:

$$Ratio_{\frac{Gen(t_x)}{Gen(t_0)}} = \frac{2^{Cp_{Gen(t_0)} - Cp_{Gen(t_x)}}}{2^{Cp_{Aktin(t_0)} - Cp_{Aktin(t_x)}}}$$

Die Berechnung der Hochregulierung von *NOS2*, *Irga6* und *Irgm3* in nicht infizierten und infizierten Proben erfolgte durch

$$Ratio_{\frac{Gen(+\ FN-)}{Gen(-\ FN-)}} = \frac{2^{Cp_{Gen(-\ FN-)} - Cp_{Gen(+\ FN-)}}}{2^{Cp_{Aktin(-\ FN-)} - Cp_{Aktin(+\ FN-)}}}$$

Aus den verschiedenen Verdünnungen bzw. Experimenten wurden dann die Mittelwerte gebildet und der Standardfehler berechnet.

### *3.2.5 Proteinnachweis mittels Westernblot*

Das Vorhandensein von muskelzelltypischen und parasitären Proteinen wurde durch Westernblot dargestellt. Hierfür wurden Totallysate aus Zellen hergestellt, diese durch SDS-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, elektrophoretisch auf

eine Nitrozellulose-Membran übertragen und dann mit Hilfe von Antikörperfärbungen die jeweiligen Proteine sichtbar gemacht.

a) Proteinisolierung und Aufbereitung

Die Wirtszellen wurden wie in 3.2.4 a) beschrieben in 6-Napfplatten ausgesät, aktiviert und infiziert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Näpfe jeweils mit 300 µL EDTA gespült und die Probe mit 300 µL Trypsin-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst. Nach der Zugabe von 700 µL Kulturmedium zum Abstoppen der Trypsinierung wurden die Proben 5 min bei 400 x g und 4°C abzentrifugiert und die Überstände verworfen.
Die Probenpellets wurden nun in 50 µL Zell-Lysepuffer resuspendiert. Während der Lyse wurden die Reaktionsgefäße auf Eis inkubiert und alle 10 min kräftig gevortext. Nach 1 h wurde der Überstand nach 5-minütiger Zentrifugation bei 18.407 x g entweder eingefroren oder weiterverabeitet.

b) Gelelektrophorese

Alle Westernblots in dieser Arbeit wurden mit 10%igen SDS-Gelen durchgeführt (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele zur Proteinanalyse

| | *Trenngel* | *Sammelgel* |
|---|---|---|
| Tris/HCl pH 8,8 | 0,4 M | - |
| Tris/HCl pH 6,8 | - | 0,125 M |
| SDS | 0,2% | 0,2% |
| Acrylamid | 10% | 5% |
| Bisacrylamid | 0,25% | 0,1% |
| APS | 0,04% | 0,04% |
| TEMED | 0,2% | 0,4% |
| Bromphenolblau | - | 3 µg |

Vor dem Laden auf das polymerisierte SDS-Gel wurde eine adäquate Menge der Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und parallel zum Protein-Größenmarker 5 min bei 95°C aufgekocht. Das Gel wurde mit dem Gemisch beladen und die Proteine in der Elektrophoreseapparatur bei 30 mA (ein Gel) oder 50 mA (zwei Gele) in SDS-

Laufpuffer aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Lauffront gerade eben aus dem Gel herausgelaufen war.

c) Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran erfolgte mit einem Semidry-Blotgerät. Die verwendeten Filterpapiere waren zuvor in verschiedenen Pufferlösungen getränkt worden und das „Blotsandwich“ wie folgt aufgebaut:

Kathode (-)
9 Filterpapiere mit 40 mM Aminocapronsäure/20% Methanol
SDS-Gel
Nitrozellulose-Membran
3 Filterpapiere mit 25 mM Tris-HCl/20% Methanol
6 Filterpapiere mit 0,3 M Tris-HCl/20% Methanol
Anode (+)

Die Proteine wurden für 1,5 h bei 32 mA je Gel auf die Membran übertragen.

d) Detektion der Proteine

Die Nitrozellulose-Membranen wurden aus dem Blotgerät entnommen, 1 min mit PonceauS gefärbt, um die Qualität der Übertragung der Proteine zu überprüfen und danach wieder 5 min mit $ddH_2O$ entfärbt.
Danach wurden unspezifische Proteinbindungsstellen für 1,5 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung blockiert. Die Membran wurde kurz mit Blot-Waschlösung gespült und dann über Nacht bei 4°C in dem in Inkubationslösung verdünnten primären Antikörper inkubiert (s. Tabelle 3.4).
Nach diesem Schritt wurden die Membranen 3 x 10 min in Blot-Waschlösung gespült und 1 h bei Raumtemperatur in dem in Inkubationslösung verdünnten sekundären Antikörper inkubiert (s. Tabelle 3.5). Nachdem die Membranen erneut 3 x 10 min gewaschen worden waren, wurden die beiden Komponenten des ECL-Detektionsreagenzes im gleichen Verhältnis gemischt, auf die Membranen gegeben und 1 min einwirken gelassen.
Die überschüssige Lösung wurde mit einem Papiertuch aufgesaugt und die Membran in der Geldokumentationsanlage exponiert, um von der Chemilumineszenz auf der Membran ein digitales Photo zu erstellen.

Tabelle 3.4: Im Westernblot eingesetzte primäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung / Konzentration | Herkunftsorganismus |
|---|---|---|
| αAktin | 1:10.000 | Maus |
| α*Toxoplasma* | 1:1000 | Kaninchen |
| αMyoD | 1,5 µg/mL | Maus |
| αMyogenin | 1,5 µg/mL | Maus |
| αMyosin HC | 1:1000 | Kaninchen |
| αSAG1 | 1:1000 | Kaninchen |

Tabelle 3.5: Im Westernblot eingesetzte sekundäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Herkunftsorganismus |
|---|---|---|
| Peroxidase-konjugiertes anti-Kaninchen IgG | 1:5000 | Esel |
| Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgG | 1:2000 | Ziege |

### *3.2.6 Nitritnachweis*

Ein Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegen intrazelluläre Pathogene ist die Produktion von NO durch das Enzym iNOS.

NO wurde hier durch einen indirekten Test nachgewiesen, da es aufgrund seiner Reaktivität schnell unter Bildung von Nitrit zerfällt. Das Nitrit wurde in den Überständen von Zellkulturen durch die Griess-Reaktion nachgewiesen.

a) Durchführung des Nitritnachweises

Für die Nitritnachweise wurden Wirtszellen analog zu den Immunfluoreszenztests in 24-Napfplatten ausgesät, teilweise aktiviert und infiziert (siehe 3.2.3). Zu den untersuchten Zeitpunkten wurden die Zellkulturüberstände der einzelnen Proben abgenommen und durch Zentrifugation für 5 min bei 18.407 x g von möglicherweise noch vorhandenen Wirtszellen und Parasiten befreit. Die Überstände konnten an dieser Stelle bei -80°C gelagert werden.

Die Proben wurden, falls sie eingefroren waren, auf Eis wieder aufgetaut und vor dem Einsatz gevortext. Es wurden jeweils Duplikate und Nitrit-Standards von 100 µL je Napf in eine 96-Napfplatte pipettiert und der frisch angesetzte Nitritnachweis-Mix in gleichem Volumen zugesetzt.

Nach ca. 5 min wurde die Extinktion der Proben mit einem Plattenphotometer bei 560 nm gemessen und die Werte der Standards in einem Graphen aufgetragen. Mit Hilfe der sich

ergebenden Geradengleichung wurden aus den Mittelwerten der Extinktionen die einzelnen Konzentrationen berechnet.

b) Verwendung des iNOS-Inhibitor L-NIL

Um den Effekt der Hemmung der iNOS in den Wirtszellen zu untersuchen, wurde der potente iNOS-Inhibitor L-NIL für weitere Experimente eingesetzt.
Er wurde dem erneuerten Zellkulturmedium mit einer Endkonzentration von 100 µM 1 h vor Versuchsbeginn zugesetzt und mit diesem im Lauf der Versuchstage alle 48 h frisch auf die Zellen gegeben.
Das weitere Vorgehen erfolgte wie in 3.2.6 a) beschrieben.

### *3.2.7 Wachstumsversuche*

Das Wachstum von *Toxoplasma gondii* konnte mittels transgener RH-Toxoplasmen bestimmt werden, die das *LacZ*-Gen enthielten. Durch dieses Gen waren die RH-Toxoplasmen in der Lage, β-Galaktosidase zu exprimieren. Das Enzym wurde in den Versuchen dazu genutzt, CPRG (Chlorophenolrot β-D Galaktopyranosid) zu spalten. Die Färbung der Proben durch das freigesetzte Chlorophenolrot konnte in einem kolorimetrischen Test am Plattenphotometer bei 560 nm gemessen und so direkt von der Intensität der Färbung auf die Veränderung der Parasitenmenge geschlossen werden.

Zunächst wurden die Wirtszellen als Triplikate in 96-Napfplatten kultiviert. Dabei wurden 0,4 x $10^4$ C2C12-Zellen und 1,4 x $10^4$ primäre SMZ pro Napf jeweils sechs Tage und 2 x $10^4$ NIH3T3-Zellen drei Tage vor Versuchsbeginn in 100 µL Kulturmedium ausgesät. Die C2C12-Zellen wurden ab 24 hps differenziert. Die Wirtszellen wurden für die Versuche, in denen das Wachstum des Parasiten bei inaktivierter iNOS untersucht werden sollte, vor Versuchsbeginn teilweise mit L-NIL behandelt (s. 3.2.6 b). Ebenso wurde ein Teil der Proben zeitgleich mit 2,5 x $10^4$ Toxoplasmen infiziert und mit IFN-γ und TNF aktiviert. Die Zytokine wurden alle 24 h und das Kulturmedium alle 48 h erneuert.
Nach dem gewünschten Inkubationszeitraum wurden die Proben fixiert, indem 100 µL CPRG-Fixativ zusätzlich zum Kulturmedium in den Napf gegeben und darin für 20 min belassen wurden. Die Lösung wurde danach abgesaugt und durch HBSS-Puffer ersetzt, mit dem die Proben 15 min inkubiert wurden.

Nach erneutem Absaugen wurden die Proben mit 100 µL CPRG-Reagenz versetzt und im Inkubator bei 37°C belassen, bis eine deutliche Färbung einiger Näpfe sichtbar war. Nun wurde die Extinktion bei 560 nm mit einem Plattenphotometer gemessen.
Die Mittelwerte der Extinktionen der nicht mit Zytokinen aktivierten, infizierten Proben wurden je Versuch gleich hundert Prozent gesetzt und alle anderen Werte daraufhin umgerechnet.

### *3.2.8 LDH-Assay*

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass IFN-γ einen Egress des Parasiten auslösen kann, der häufig in der Zerstörung der Wirtszelle resultiert (MARTENS ET AL., 2005; LING ET AL., 2006; ZHAO ET AL., 2009b).

Um zu untersuchen, ob dies auch in C2C12-Zellen der Fall ist, wurden die Überstände von teilweise infizierten und aktivierten Zellen auf Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) getestet, das aus zerstörten Zellen freigesetzt wird. Die Zellen wurden wie in den Wachstumsversuchen (siehe 3.2.6) in Triplikaten in 96-Napfplatten ausgesät, teilweise aktiviert und infiziert. Für den Nachweis wurde ein Zytotoxizitäts-Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zur Bestimmung der maximalen LDH-Aktivität wurde ein Teil der nicht infizierten Zellen zur vollständigen Lyse mit 5 µL Lysis-Lösung behandelt und 15 min im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden allen Näpfen 100 µL Reaktions-Mix zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach kurzem Schütteln der Platten wurden die Extinktionen der Proben bei 490 nm mit einem Mikroplattenleser gemessen. Die Werte der vollständig lysierten Vergleichszellen wurden als maximale LDH-Aktivität gewertet und gleich hundert Prozent gesetzt. Die anderen Werte wurden dementsprechend umgerechnet.

## 3.3 Verwendete Software

### *3.3.1 Elektronische Datenverarbeitung*

Alle Versuchsdaten wurden in Excel eingegeben. Dort erfolgten die Bildung der Mittelwerte und die Berechnung des Standardfehlers aus der Formel

$$\text{SEM} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Anzahl Experimente}}}$$

Die Ratios der quantitativen PCR wurden ebenfalls mit Excel berechnet, die jeweiligen Formeln sind in der Methode beschrieben.
Die statistischen Ausreißer wurden nach DIXON (aus: SACHS, 1984) mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ ermittelt.
Alle Diagramme in dieser Arbeit wurden ebenfalls mit Excel erstellt.

### *3.3.2 Statistische Analysen*

Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde das Programm Statistica Version 9.0 von StatSoft verwendet. In den durchgeführten t-Tests wurde von unabhängigen Stichproben ausgegangen.

### *3.3.3 Quantitative „real time"-PCR*

Zur Messung der entstehenden Fragmente bei der PCR am LightCycler wurde das vom Hersteller mitgelieferte Auswertungsprogramm verwendet.

### *3.3.4 Mikroskopie*

Für die Erstellung der mikroskopischen Bilder wurde die mit dem konfokalen Mikroskop TCS SPII von Leica mitgelieferte Software Version 2.61 Build 1537 verwendet.

### *3.3.5 Bildbearbeitung*

Die Zusammenstellung der mikroskopischen Aufnahmen sowie der Westernblot-Bilder wurde mit dem „GNU Image Manipulation Program" GIMP Version 2.4.4 vorgenommen.

# 4. Ergebnisse

## 4.1 Vorarbeiten: Überprüfung der Fähigkeit zur Differenzierung bei den verwendeten Myoblastenlinien

Die in dieser Arbeit verwendeten murinen Skelettmuskelzellen (SMZ) wurden als nicht differenzierte Satellitenzellen aus Maus-Embryonen isoliert (primäre SMZ) oder in Kultur als permanente Myoblasten gehalten (C2C12-Zellen), da differenzierte Muskelzellen nicht oder nur in geringem Maße proliferieren. Dies bedeutete, dass die Zellen für die Experimente *in vitro* differenziert werden mussten.

Daher wurde zunächst mit Hilfe von muskelzelltypischen Markern überprüft, ob beide Zelllinien *in vitro* differenzierbar waren. Bei den untersuchten Markern handelte es sich um MyoD und Myf5, Myogenin, MyHC (Myosin heavy chain) und Desmin.
MyoD und Myf5 sind Transkriptionsfaktoren, die früh in der Entwicklung von SMZ in Myoblasten exprimiert werden und weitere Myoblasten-Gene induzieren. Myogenin ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der in Myotuben vorkommt und essenziell für die Differenzierung der Myoblasten ist. MyHC bezeichnet eine Gruppe Aktin-basierter Motor-Proteine, die in Muskelzellen vorkommen, Desmin ist ein muskelzelltypisches Intermediärfilament.
Außerdem wurden die Differenzierungs-Analysen durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für eine Infektion mit *Toxoplasma* zu bestimmen. Die Zellen sollten frisch differenziert sein, da die Infektionsversuche gewöhnlich eine Woche dauerten. In älteren SMZ-Kulturen lösten sich die Zellen häufig von den Kulturschalen ab und neigten dazu, sich zusammenzuballen. Dies bereitete vor allem bei den primären SMZ Schwierigkeiten, weswegen sie nicht in allen Experimenten verwendet wurden.

### *4.1.1 Überprüfung der Differenzierung von primären Skelettmuskelzellen*

Die Isolation und Kultivierung der primären Skelettmuskelzellen wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Diese Zellen differenzierten für gewöhnlich in dem verwendeten Kulturmedium im Verlauf von Tagen ohne weitere Behandlung. Dennoch wurde nochmals kontrolliert, ob sich in den Zellen unter den hier verwendeten Kulturbedingungen die muskelzelltypischen Proteine Desmin, Myogenin und MyoD nachweisen ließen. Dafür wurden primäre SMZ zu verschiedenen Zeitpunkten nach

dem Aussäen fixiert und in einem Immunfluoreszenztest mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt.

Alle drei Proteine wurden bereits ab 72 Stunden nach Aussäen der Zellen (hps) detektiert (Abb. 4.1). Dabei waren das Filament Desmin im Zytosol und die beiden Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin erwartungsgemäß jeweils im Nukleus lokalisiert. Das bedeutete, dass schon zu diesem frühen Zeitpunkt die Mechanismen zur Differenzierung der Myoblasten zu Muskelfasern aktiv waren. Dies spiegelte sich auch in der Form der Zellen wieder, die myotubentypisch lang gestreckt war. Ab 168 hps waren außerdem mehrkernige Zellen in den Präparaten enthalten, was ebenfalls für Muskelzellen typisch ist.

### *4.1.2 Überprüfung der Differenzierung von permanenten Skelettmuskelzellen*

Die permanenten Skelettmuskelzellen (C2C12-Zellen) wurden mit verschiedenen Methoden auf ihre Fähigkeit zur *in vitro* Differenzierung getestet.

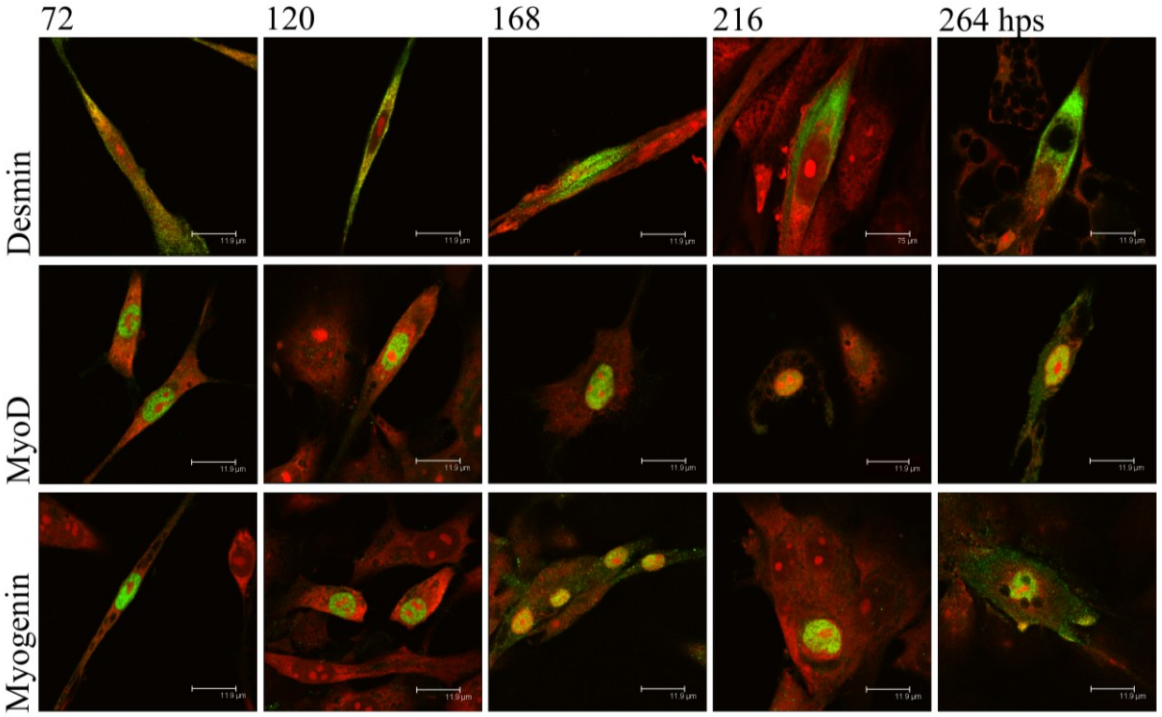


**Abb. 4.1: *In vitro* Differenzierung von primären Skelettmuskelzellen.**
Frisch isolierte primäre SMZ wurden 72, 120, 168 und 216 h nach dem Aussäen (hps) fixiert und dann in einem Immunfluoreszenztest gefärbt: die muskelzelltypischen Proteine Desmin, MyoD und Myogenin in grün, in rot die Färbung der Nukleinsäuren, um die Gesamtpopulation der Zellen sichtbar zu machen; Maßstab 11,9 µm.

Das Differenzierungsmedium wurde unter den in der Literatur beschriebenen Medien anhand der Bildung von verschmolzenen, mehrkernigen Zellen (Überprüfung am Binokular, Daten nicht gezeigt) ausgewählt und jeweils ab 24 hps für die Kultur der Zellen verwendet.

a) Regulation muskelzellspezifischer RNA in permanenten SMZ

Zur Überprüfung der Differenzierung der permanenten SMZ wurde zunächst die Transkription der muskelzellspezifischen Gene *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin* analysiert. Nach der Isolierung der mRNA aus C2C12-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussäen wurde diese in cDNA umgeschrieben, anschließend durch „real-time"-PCR quantifiziert und ins Verhältnis zu Aktin gesetzt.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten einen 5-fachen Anstieg der Transkription von *MyoD* ab 72 hps, die ab 168 hps weiter bis zur 25-fachen Steigerung zu 264 hps

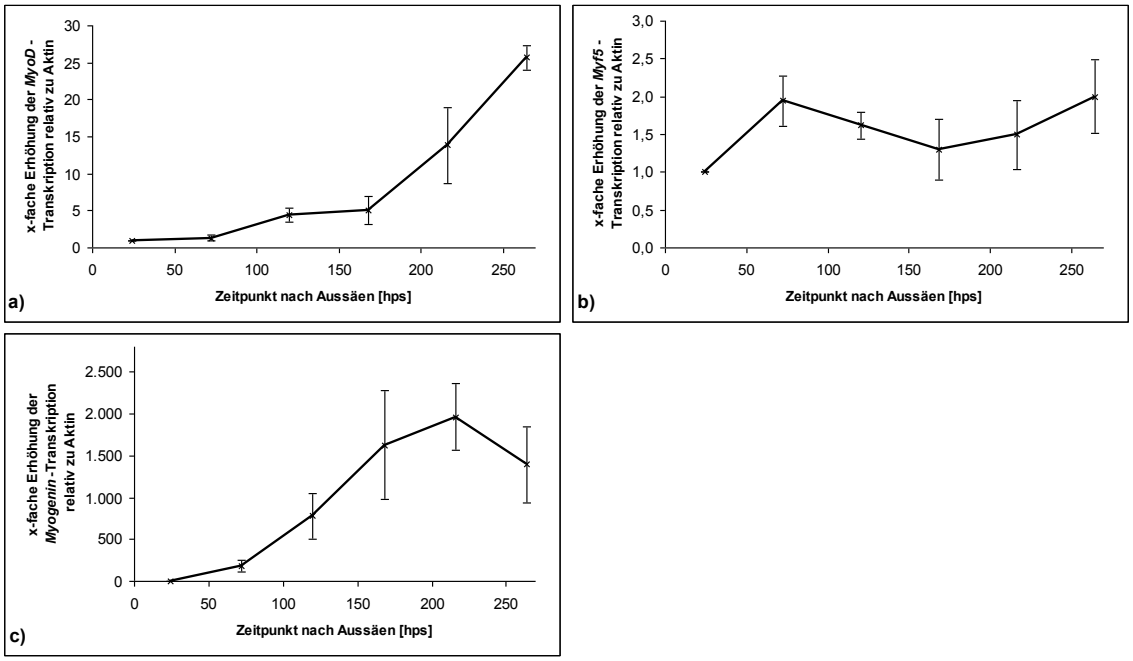


**Abb. 4.2: Regulation der muskelzellspezifischen Gene *MyoD* (a), *Myf5* (b) und *Myogenin* (c) in permanenten SMZ relativ zu Aktin.**

C2C12-Zellen wurden ausgesät und ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium kultiviert. 24, 72, 120, 168, 216 und 264 hps wurde aus ihnen mRNA gewonnen, daraus cDNA hergestellt und in einer quantitativen PCR sowohl Aktin als auch MyoD, Myf5 oder Myogenin amplifiziert. Die Genregulation wurde anhand der Formel $R = \frac{2^{(Cp_{Gen\,24h} - Cp_{Genxh})}}{2^{(Cp_{Aktin\,24h} - Cp_{Aktinxh})}}$ aus den Crossingpoints der Proben bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

zunahm (Abb. 4.2). Die Transkription von *Myf5* war zu 72 hps verdoppelt und blieb bis 264 hps um diesen Faktor erhöht. Eine deutliche Steigerung der Transkription von *Myogenin* um das 180-fache fand bereits bis 72 hps statt, sie erreichte etwa ab 168 hps bei einer Steigerung auf das 1.600-fache ein Plateau.
Diese Ergebnisse bestätigten eine Erhöhung der Transkription der muskelzellspezifischen Gene *MyoD* und *Myogenin* in den verwendeten C2C12-Zellen. Die *Myf5*-Transkription war im Vergleich zu den beiden anderen Genen mit einer Verdopplung nur schwach hochreguliert. Dies stimmt mit Literatur überein, in der beschrieben wurde, dass Muskelzellen entweder MyoD oder Myf5 exprimieren (OLSON & KLEIN, 1992).

b) Nachweis muskelzellspezifischer Proteine in differenzierenden permanenten SMZ

Die Differenzierung der Myoblasten wurde auch durch den Nachweis spezifischer Proteine im Immunblot untersucht. Hierzu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussäen Proteinextrakte der Zellen hergestellt, diese per Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und die Proteine MyHC, Myogenin, MyoD und Aktin mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Es wurden ebenfalls Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) untersucht, um die Spezifität der Färbung von muskelzellspezifischen Proteinen zu kontrollieren.

Der muskelzellspezifische Transkriptionsfaktor MyoD wurde in permanenten SMZ schon vor Zugabe des Differenzierungsmediums zu 24 hps nachgewiesen (Abb. 4.3). Von MyHC waren zu diesem Zeitpunkt nur sehr geringe Mengen vorhanden, das Protein wurde dann von 72 hps bis 264 hps deutlich nachweisbar exprimiert. Myogenin trat in den SMZ-

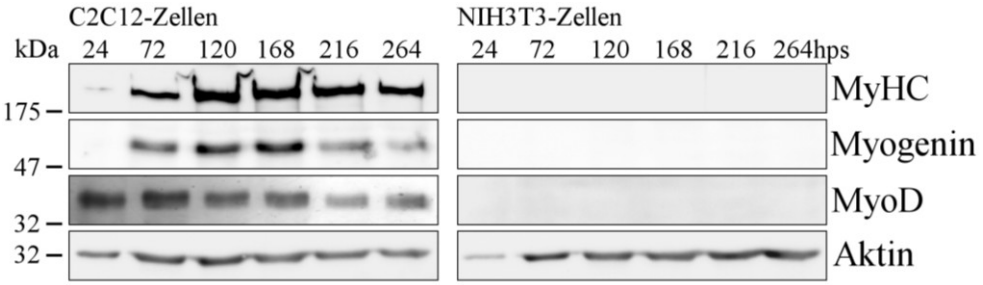


**Abb. 4.3: Nachweis muskelzellspezifischer Proteine in differenzierenden SMZ und in Fibroblasten.** NIH3T3-Fibroblasten und C2C12-Muskelzellen wurden ausgesät und die permanenten SMZ ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium gehalten. 24, 72, 120, 168, 216 und 264 hps wurden Proteinextrakte aus differenzierten permanenten SMZ bzw. Fibroblasten hergestellt, mittels Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern spezifisch für Aktin, MyHC, Myogenin und MyoD analysiert. Repräsentatives Experiment von drei.

Proben erstmals 72 hps auf, die Proteinmengen erreichten bei 120/168 hps ihr Maximum und nahmen dann wieder ab. Dies war analog zur Transkription von Myogenin (s. Abb. 4.2 c) und stimmte mit seiner Funktion als frühem Transkriptionsfaktor überein. Die Aktin-Färbungen dienten zur Überprüfung der Proteinmengen und der gleichmäßigen Auftragung, die in allen Proben außer in NIHT3-Zellen 24 hps erreicht wurde, wo eine leicht geringere Menge Protein aufgetragen war.
In Fibroblasten waren erwartungsgemäß keine MyHC-, Myogenin- oder MyoD-Proteine, aber Aktin nachweisbar.

c) Lokalisation muskelzellspezifischer Proteine in differenzierenden permanenten SMZ

Neben der Transkription typischer Gene differenzierender Muskelzellen und der Produktion muskelzelltypischer Proteine wurde auch die Lokalisation der Proteine MyoD und Myogenin sowie des Muskel-Motorproteins MyHC durch Immunfluoreszenztests mikroskopisch nachgewiesen (Abb. 4.4).

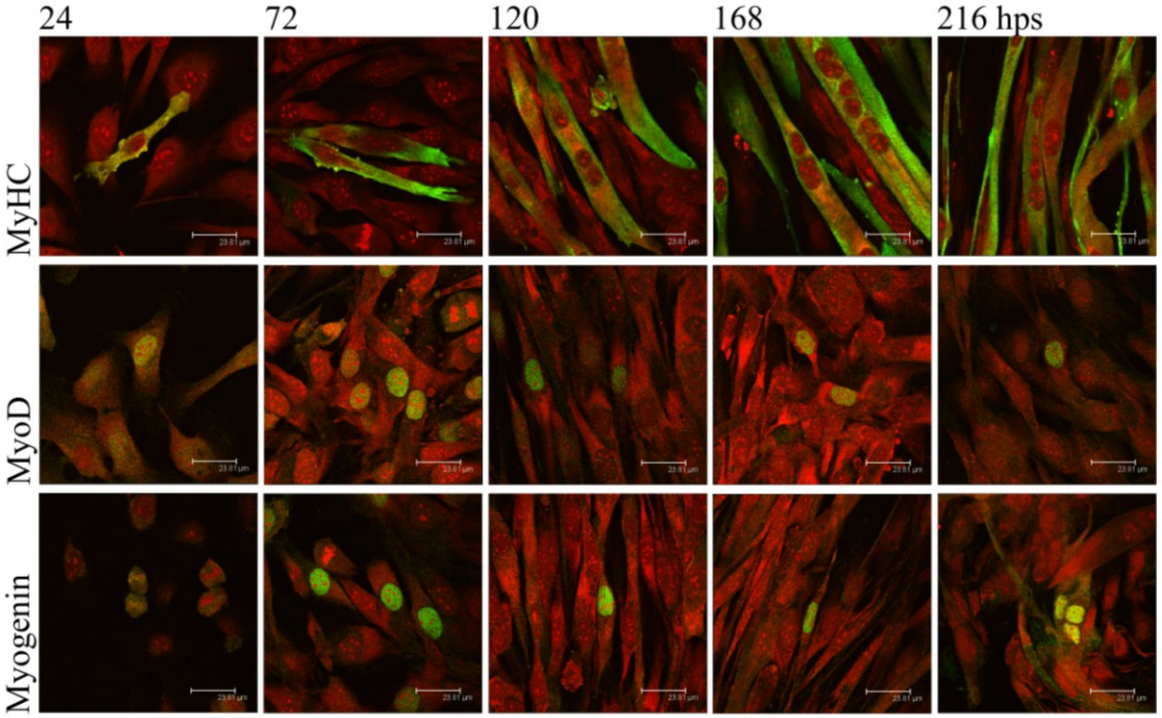


**Abb. 4.4: *In vitro* Differenzierung von permanenten Skelettmuskelzellen.**
C2C12-Zellen wurden ausgesät und ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium kultiviert. Sie wurden 24, 72, 120, 168 und 216 hps fixiert und in einem Immunfluoreszenztest gefärbt: die muskelzelltypischen Proteine MyHC, MyoD und Myogenin in grün, in rot die Nukleinsäuren zur Darstellung der Gesamtpopulation an Zellen; Maßstab 24 µm.

MyHC ist mit dem Zytoskelett assoziiert und wurde von 24 hps an in einer steigenden Anzahl von Zellen nachgewiesen. In den Zellen war ebenfalls die typische Formveränderung der C2C12-Zellen von rundlichen Myoblasten hin zu lang gestreckten, synzytialen Myotuben zu sehen (BUCKINGHAM, 1985).
Das Produkt von *MyoD* war als Transkriptionsfaktor in den Kernen der Zellen lokalisiert. Es wurde zu den Zeitpunkten 24 und 72 hps in etwa der Hälfte der Zellen nachgewiesen, wohingegen ab 120 hps der Anteil der MyoD-positiven Zellen auf unter 10% abnahm. Die höchste Anzahl Myogenin-positiver Zellen wurde 72 hps nachgewiesen, sie betrug etwa 20%. Zu 24 hps lag sie bei etwa 10% und 120, 168 und 216 hps deutlich darunter.

Die Expression muskelzellspezifischer Marker wurde sowohl für primäre SMZ als auch für C2C12-Zellen eindeutig nachgewiesen. Für die folgenden Experimente wurde aufgrund der obigen Ergebnisse für die SMZ ein Alter der Kulturen von 144 hps, bei C2C12-Zellen also 120 h nach Zugabe des Differenzierungsmediums, gewählt.

## 4.2 Einfluss von IFN-γ und TNF auf die Abwehr von *T. gondii* in SMZ

Das Wachstum von *Toxoplasma gondii* in nicht aktivierten Skelettmuskelzellen war Gegenstand früherer Untersuchungen (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009a, 2009b). Im Wirt unterliegt der Parasit jedoch dem Einfluss des Immunsystems, weswegen in dieser Arbeit der Effekt proinflammatorischer Zytokine auf seine Entwicklung untersucht wurde.

IFN-γ ist ein wichtiges Zytokin in der Abwehr einer *Toxoplasma*-Infektion (RYTEL & JONES, 1966; MCCABE ET AL., 1984; SUZUKI ET AL., 1988). Es wirkt dabei teilweise in Synergie mit TNF (LANGERMANNS ET AL., 1992; BLACK ET AL., 1989; JOHNSON, 1992a).
Da für die Entwicklung von *Toxoplasma* in IFN-γ-aktivierten SMZ noch keine Daten vorlagen, wurden zunächst Experimente zur Wirkung dieser Zytokine auf den Parasiten durchgeführt. Diese beinhalteten Immunfluoreszenztests, β-Gal-Reportertests zur Quantifizierung des Parasitenwachstums und Immunoblots.

### *4.2.1 Wachstum von* T. gondii *in Abhängigkeit von IFN-γ*

Zu Beginn der Arbeiten wurde zunächst untersucht, ob eine Aktivierung der differenzierten permanenten SMZ mit IFN-γ tatsächlich einen Einfluss auf das Wachstum des Parasiten hat und inwiefern eine Abhängigkeit zur Zytokindosis besteht. Dabei wurden NIH3T3-

Fibroblasten als Kontrollzellen eingesetzt. Für die Bestimmung wurden die Wirtszellen nicht oder mit verschiedenen Konzentrationen von IFN-γ (0,1 bis 100 U/mL Kulturmedium) aktiviert und zeitgleich mit transgenen RH-Toxoplasmen (Typ I), die das *LacZ*-Gen enthielten, infiziert. Das Wachstum des Parasiten wurde nach Zugabe des durch β-Galaktosidase spaltbaren Substrates CPRG kolorimetrisch bestimmt.

In den differenzierten C2C12-Zellen fand ein deutlich verringertes Wachstum von *Toxoplasma* statt, je höher die IFN-γ-Dosis war. Dies war 48 hpi ab einer IFN-γ-Konzentration von 10 U/mL mit einem Unterschied von 50% zu nicht aktivierten Zellen

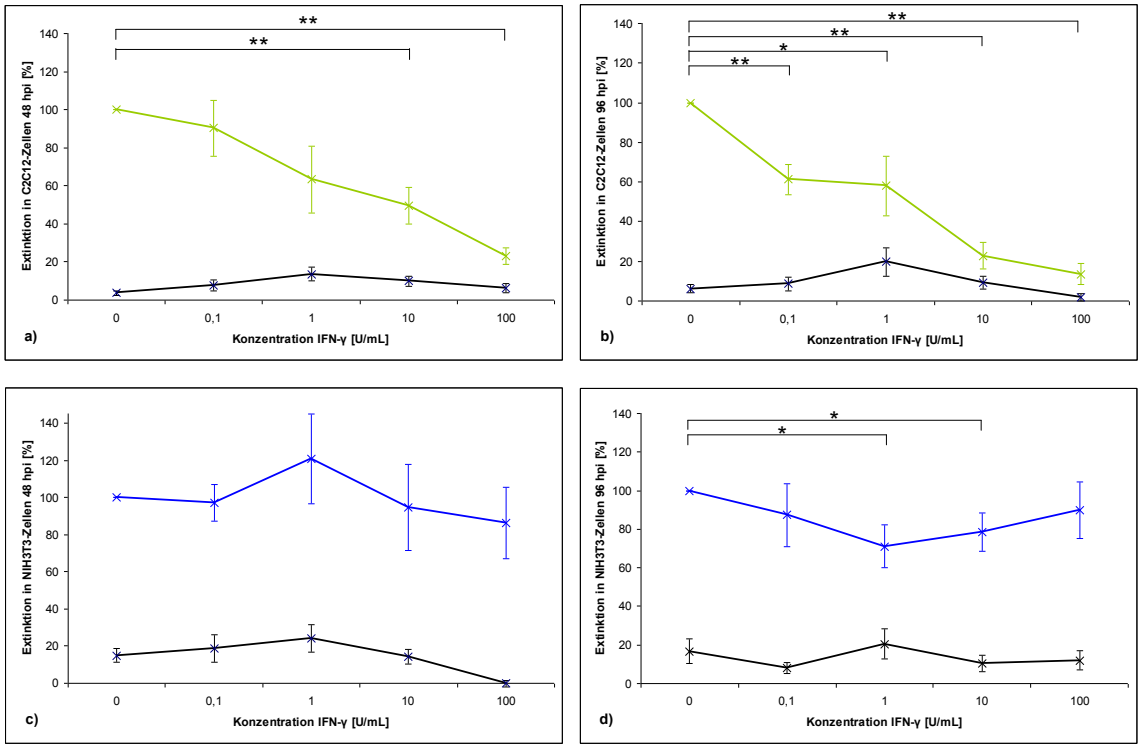


**Abb. 4.5: Abhängigkeit des *Toxoplasma*-Wachstums von der IFN-γ-Dosis in C2C12-Zellen (a, b) und NIH3T3-Zellen (c, d).**

Permanente SMZ wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium gehalten. Nach der Differenzierung wurden die C2C12- sowie NIH3T3-Zellen mit *LacZ*-transgenen RH-Parasiten infiziert (nicht infizierte Zellen schwarz, infizierte Zellen grüne und blaue Linie) und zeitgleich mit unterschiedlichen Dosen IFN-γ (0; 0,1; 1; 10 und 100 U/mL Kulturmedium) behandelt. Das Wachstum der Toxoplasmen wurde 48 (a und c) und 96 hpi (b und d) mit Hilfe eines kolorimetrischen CPRG-Tests bestimmt. Die Extinktion der jeweiligen nicht aktivierten Probe wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt und die weiteren Werte dementsprechend berechnet. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit jeweils drei Proben nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

und 96 hpi ab 0,1 U/mL mit einem Unterschied von 40% statistisch signifikant (Abb. 4.5). Ein statistisch verringertes Wachstum von *Toxoplasma* war in NIH3T3-Zellen nur 96 hpi bei IFN-γ-Konzentrationen von 1 und 10 U/mL festzustellen. Das Parasitenwachstum war aber auch bei diesen Konzentrationen deutlich weniger reduziert (30 bzw. 20%) als bei den permanenten SMZ. Diese Ergebnisse zeigten, dass IFN-γ in C2C12-Zellen mit steigender Dosis das Parasitenwachstum in zunehmendem Maße hemmte. Dagegen war die Wachstumshemmung von *Toxoplasma* durch IFN-γ in NIH3T3-Zellen wesentlich geringer als in C2C12-Zellen.

In folgenden Experimenten wurde aufgrund des starken Effektes und der in der Literatur häufig beschriebenen Konzentrationen eine Aktivierungsdosis von 100 U/mL IFN-γ gewählt.

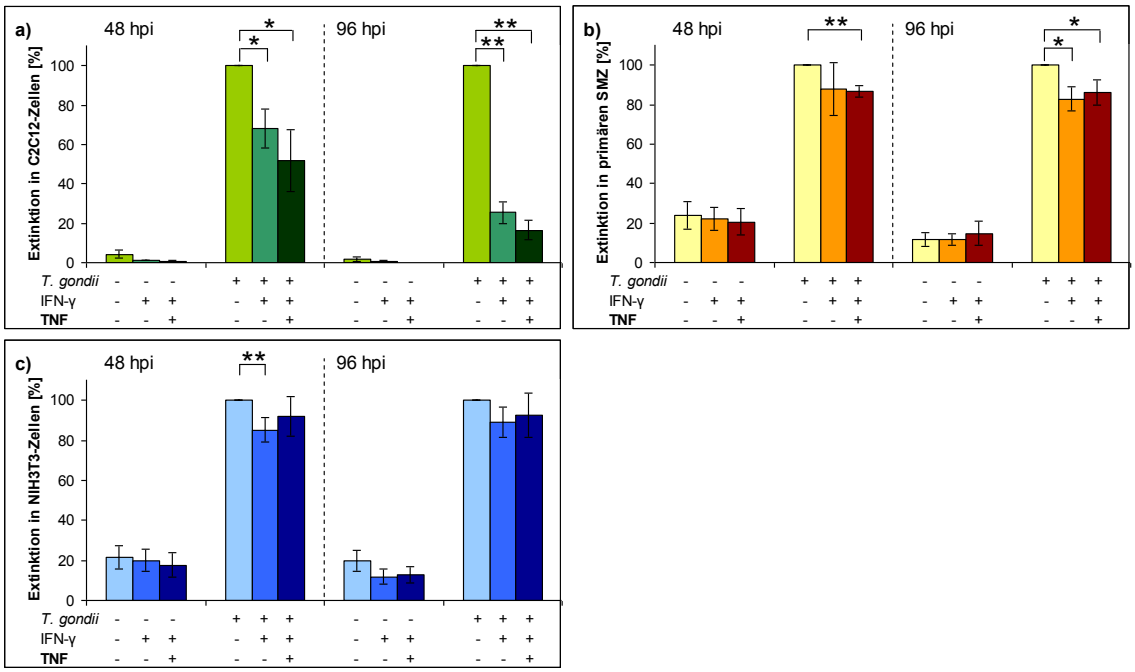


**Abb. 4.6: Wachstum von *Toxoplasma* in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF aktivierten C2C12-Zellen (a), primären SMZ (b) und NIH3T3-Zellen (c).**

C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden teilweise mit *LacZ*-transgenen RH-Toxoplasmen infiziert und mit den Zytokinen IFN-γ und TNF behandelt. Das Wachstum der Parasiten wurde 48 und 96 hpi mit Hilfe eines kolorimetrischen CPRG-Tests bestimmt. Die Extinktion der jeweiligen nicht aktivierten Probe wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt und die weiteren Werte dementsprechend berechnet. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die Ergebnisse stammen aus vier (C2C12-Zellen), fünf (primäre SMZ) oder neun (NIH3T3) Experimenten. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

### 4.2.2 *Wachstum von* Toxoplasma *in SMZ nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen*

Nachdem die zu verwendende IFN-γ-Dosis festgelegt war, wurde nun das Wachstum von *Toxoplasma* ohne oder nach Aktivierung der Wirtzellen mit IFN-γ oder IFN-γ und TNF analysiert. Dies geschah wiederum mittels eines kolorimetrischen Tests mit Hilfe der *LacZ*-transgenen RH-Toxoplasmen.

Das Parasitenwachstum war in IFN-γ-aktivierten differenzierten C2C12-Zellen zu 48 hpi um 30%, aber besonders zu 96 hpi um 70% signifikant gehemmt (Abb. 4.6 a). Dabei war das Wachstum in IFN-γ/TNF-aktivierten Zellen im Mittel um etwa 15 (48 hpi) bzw. 10% (96 hpi) niedriger als in nur mit IFN-γ aktivierten Zellen.

In differenzierten primären SMZ war das Wachstum der transgenen RH-Toxoplasmen in IFN-γ/TNF-aktivierten Zellen zu 48 hpi gegenüber nicht aktivierten Zellen signifikant um 10% verringert. Dies war 96 hpi sowohl bei IFN-γ-aktivierten als auch bei IFN-γ/TNF-aktivierten Zellen der Fall (Abb. 4.6 b).

In Fibroblasten wurde eine signifikante Abnahme des Parasitenwachstums um 10% nur 48 hpi in IFN-γ-aktivierten Zellen nachgewiesen, jedoch war das Parasitenwachstum in IFN-γ-aktivierten Zellen im Mittel um 5-10% niedriger als in nicht aktivierten (Abb. 4.6 c).

In nicht infizierten Zellen wurde nur eine basale Farbreaktion des CPRG-Reagenz gemessen.

IFN-γ hatte deutlich einen hemmenden Einfluss auf das Parasitenwachstum in differenzierten SMZ und hier besonders stark in permanenten Zellen. In Fibroblasten wurde den Zytokinen nur ein geringfügiger bis kein Effekt auf das Wachstum von *Toxoplasma* nachgewiesen.

Das Wachstum in C2C12-Zellen, die zusätzlich zu IFN-γ auch mit TNF aktiviert waren, war gegenüber den nur mit IFN-γ aktivierten Zellen durchschnittlich leicht gesenkt. Dies gab einen Hinweis darauf, dass in dieser Zelllinie möglicherweise ein synergistischer Effekt zwischen den beiden Zytokinen bestand.

### 4.2.3 *Mikroskopische Untersuchungen von* Toxoplasmen *in nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten*

Das reduzierte Wachstum des Parasiten in aktivierten Muskelzellen konnte auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein. So ließen sich nach der kolorimetrischen Bestimmung der Wachstumsraten keine Aussagen darüber machen, ob die geringe Zahl der

Parasiten auf eine beeinträchtigte Infektiosität, eine verringerte intrazelluläre Replikation oder den Übergang in das Ruhestadium von *Toxoplasma*, das Bradyzoiten-Stadium, zurück zu führen war.

Zu diesem Zweck wurden Präparate von teilweise aktivierten Zellen hergestellt, die mit NTE-Parasiten infiziert und mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* und Bradyzoiten-enthaltende parasitophore Vakuolen (PV) gefärbt worden waren. Die Proben wurden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie in Hinsicht auf die Infektionsraten, die Stadienkonversionsraten und die Replikation in Form der Größen der PV analysiert.

a) Vakuolengrößen von *T. gondii* in differenzierten SMZ sowie in Fibroblasten

Eine Zugabe von IFN-γ oder IFN-γ und TNF hemmte die Replikation des Parasiten in differenzierten C2C12-Zellen, wobei sich die Parasitenreplikation in Zellen, die mit IFN-γ alleine oder mit IFN-γ und TNF aktiviert worden waren, nicht deutlich unterschieden

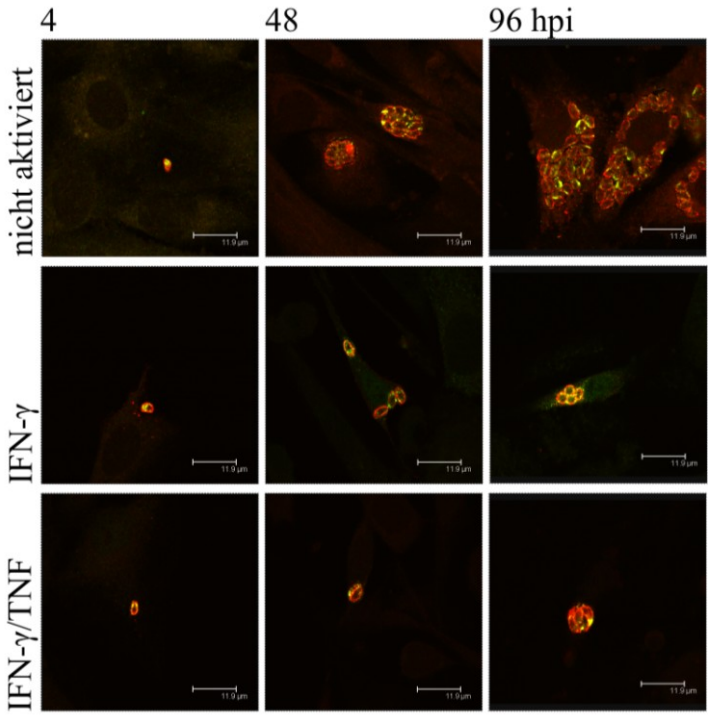


**Abb. 4.7: Vermehrung von *Toxoplasma* in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF behandelten permanenten SMZ.**

C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Die differenzierten Zellen wurden mit Parasiten des Typ II-Toxoplasmenstammes NTE infiziert und zum Infektionszeitpunkt teilweise mit den Zytokinen IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden die Zellen fixiert und in einem Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* und Bradyzoiten-enthaltende PV behandelt. Die Detektion von *Toxoplasma* in rot und der Bradyzoiten-positiven PV in grün erfolgte durch konfokale Laserscanmikroskopie. Maßstab: 12 µm. Bilder eines repräsentativen Experiments von vier.

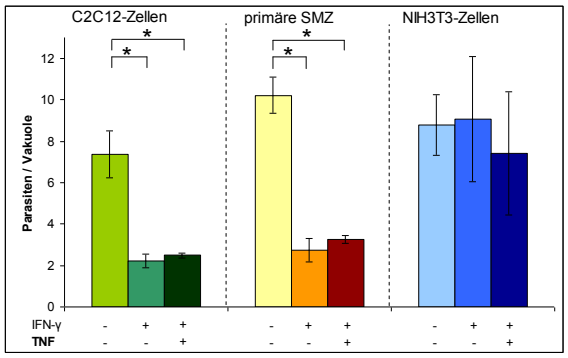


**Abb. 4.8: Vakuolengrößen in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF aktivierten SMZ und Fibroblasten.**

C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium gehalten. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden mit Typ II NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zum Zeitpunkt der Infektion mit IFN-γ und TNF aktiviert. 48 hpi wurden die Zellen fixiert, mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* inkubiert und am konfokalen Laserscanmikroskop die Anzahl Parasiten pro hundert PV bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl Parasiten pro Vakuole wurde nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ berechnet (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Werte aus vier (C2C12-Zellen), drei (primäre SMZ) und sieben (NIH3T3-Zellen) Experimenten. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$.

(Abb. 4.7). Es befanden sich ab 48 hpi wesentlich mehr PV in den nicht aktivierten C2C12-Zellen als in den aktivierten, diese enthielten zum gleichen Zeitpunkt außerdem durchschnittlich fünf Parasiten mehr, was statistisch signifikant war (Abb. 4.8).

Auch in primären SMZ war das Parasitenwachstum durch IFN-γ-Aktivierung der Zellen deutlich gehemmt (Abb. 4.9). So befanden sich in IFN-γ oder IFN-γ/TNF-aktivierten primären SMZ zu 48 hpi durchschnittlich zwei bis drei Parasiten in den PV, in den nicht aktivierten Zellen jedoch über zehn (Abb. 4.8). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

Zwischen nicht aktivierten und aktivierten Fibroblasten gab es zu keinem Zeitpunkt eindeutige Unterschiede bezüglich der Vakuolengröße (Abb. 4.10 und 4.8).

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass nicht aktivierte Skelettmuskelzellen 48 und 96 hpi deutlich mehr Parasiten pro PV enthielten als IFN-γ oder IFN-γ/TNF-aktivierte SMZ (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu wiesen die *Toxoplasma*-Vakuolengrößen in NIH3T3-Zellen ohne oder mit Aktivierung keinerlei statistisch signifikante Unterschiede auf.

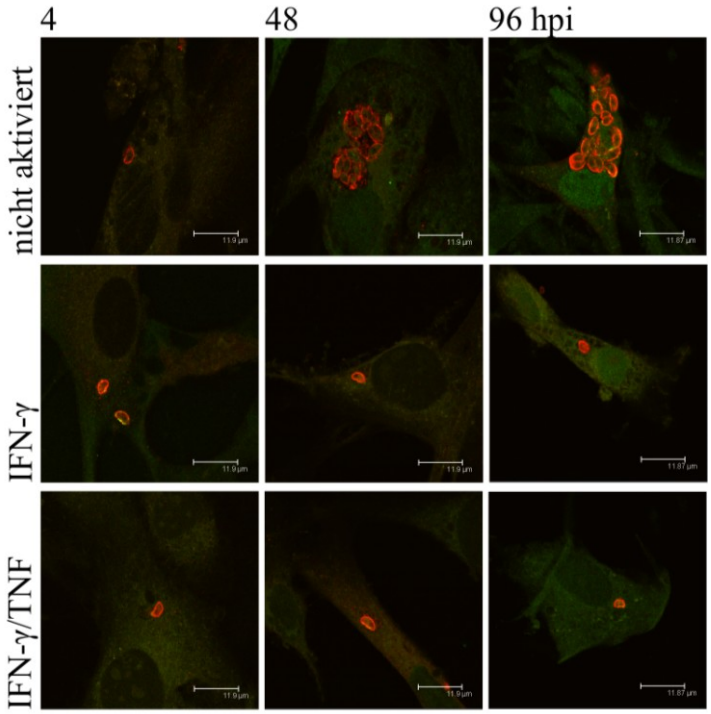


**Abb. 4.9: Vermehrung von *Toxoplasma* in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF behandelten primären SMZ.**

Differenzierte primäre SMZ wurden mit Parasiten des Typ II Toxoplasmenstammes NTE infiziert und zum Infektionszeitpunkt teilweise mit den Zytokinen IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden die Zellen fixiert und in einem Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* und Bradyzoiten-enthaltende PV behandelt. Die Detektion von *Toxoplasma* in rot und der Bradyzoiten-positiven PV in grün erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. Maßstab: 12 µm. Bilder eines repräsentativen Experiments von drei.

In diesen Experimenten hatte IFN-γ somit einen parasitostatischen Effekt auf Toxoplasmen in differenzierten SMZ, aber nicht in Fibroblasten. Bezüglich der Replikation bestanden zwischen den Aktivierungsarten mit IFN-γ oder IFN-γ/TNF sowohl in SMZ als auch Fibroblasten keine Unterschiede.

b) Infektionsraten differenzierter SMZ und Fibroblasten ohne und nach IFN-γ-Aktivierung

Die Infektionsraten ermöglichen Aussagen darüber, wie effizient *Toxoplasma* die Wirtszellen invadieren kann. Sie wurden bestimmt, indem der Anteil infizierter Zellen an fünfhundert Wirtszellen ausgezählt wurde. Zu beachten ist dabei, dass eine Zelle mit mehreren Toxoplasmen infiziert sein konnte, diese aber nur als einfach infizierte Zellen gezählt wurde.

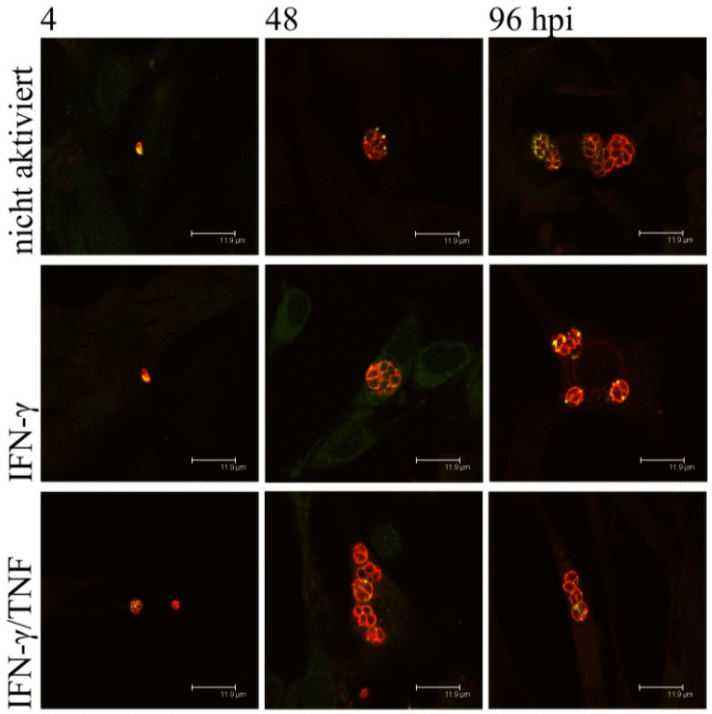


**Abb. 4.10: Vermehrung von *Toxoplasma* in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF behandelten Fibroblasten.**

NIH3T3-Zellen wurden mit Parasiten des Typ II Toxoplasmenstammes NTE infiziert und zum Infektionszeitpunkt teilweise mit den Zytokinen IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden die Zellen fixiert und in einem Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* und Bradyzoiten-enthaltende PV behandelt. Die Detektion von *Toxoplasma* in rot und der Bradyzoiten-positiven PV in grün erfolgte durch konfokale Laserscanmikroskopie. Maßstab: 12 µm. Bilder eines repräsentativen Experiments von sieben.

Die Infektionsraten in nicht aktivierten differenzierten permanenten SMZ waren 48 hpi um 20% und 96 hpi um 70% höher als in IFN-γ oder IFN-γ/TNF-aktivierten Zellen (Abb. 4.11 a). Statistisch signifikante Unterschiede wurden in IFN-γ-aktivierten C2C12-Zellen 48 hpi sowie in IFN-γ- und IFN-γ/TNF-aktivierten Zellen 96 hpi gemessen. In primären SMZ war die Infektionsrate im Mittel 48 hpi um 10% und zu 96 hpi zu 50% gesenkt (Abb. 4.11 b). Ebenfalls hatte eine Aktivierung der NIH3T3-Zellen mit IFN-γ und IFN-γ/TNF 96 hpi eine signifikante Verringerung der Infektionsraten um 30% zur Folge (Abb. 4.11 c).

In den Zellen, die zusätzlich zu IFN-γ mit TNF aktiviert waren, war die Infektionsrate ebenso hoch wie in den Zellen, die nur mit IFN-γ behandelt waren.

IFN-γ hatte somit in SMZ einen deutlich hemmenden Effekt auf die Infektionsrate von NTE-Toxoplasmen, jedoch wurde TNF kein ergänzender Effekt nachgewiesen.

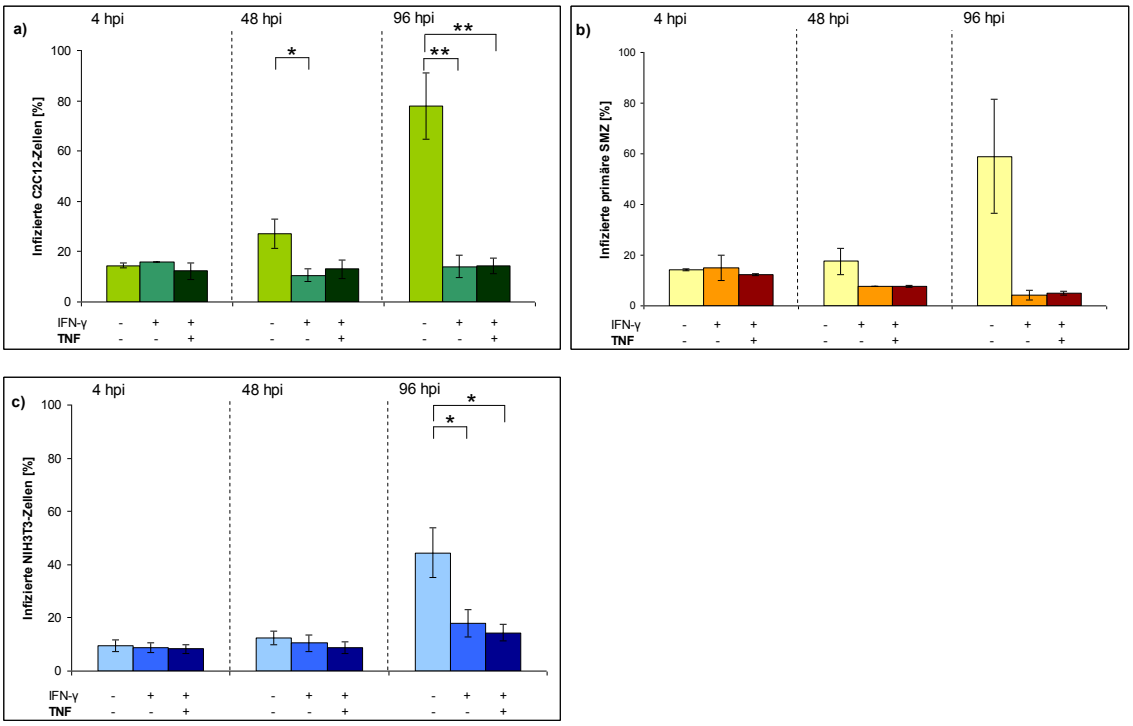


**Abb. 4.11: Infektionsraten in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF aktivierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie NIH3T3-Zellen (c).**

Permanente SMZ wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden mit Typ II NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zum Zeitpunkt der Infektion mit IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden Zellen fixiert, in einem Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* inkubiert und die Anzahl infizierter Zellen pro fünfhundert Wirtszellen mikroskopisch bestimmt. Die Infektionsraten wurden in Prozent nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ berechnet (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Mittelwerte aus vier (C2C12-Zellen), drei (primäre SMZ) und sieben (NIH3T3) Experimenten. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

### c) Stadienkonversion von *T. gondii* in differenzierten SMZ und Fibroblasten unter Einfluss von IFN-γ

*Toxoplasma gondii* geht im Verlauf einer Infektion vom schnell replizierenden Tachyzoitenstadium in das metabolisch inaktive Bradyzoitenstadium über. Bradyzoiten lösen eine geringere Immunantwort im Wirt aus, so dass eine latente Infektion aufrechterhalten werden kann (DUBEY ET AL., 1998a).

Deswegen wurde hier untersucht, inwieweit IFN-γ oder IFN-γ und TNF zu einer solchen Stadienkonversion führte. Dafür wurden die Parasiten in den Immunfluoreszenzpräparaten nicht nur mit einem Antikörper gegen *Toxoplasma* sondern auch gegen Bradyzoiten-

enthaltende PV gefärbt. Die Zellen wurden am Mikroskop analysiert und hundert Vakuolen auf die Anwesenheit von Bradyzoiten-spezifischen Antigenen untersucht.

Die Stadienkonversionsraten waren in IFN-γ- und IFN-γ/TNF-aktivierten C2C12-Zellen und IFN-γ-aktivierten NIH3T3-Zellen zu 48 hpi statistisch signifikant um etwa 20% geringer als in nicht aktivierten Zellen (Abb. 4.12 a). Zusätzlich wurde eine im Mittel gesenkte Stadienkonversion in aktivierten C2C12-Zellen 96 hpi um etwa 15% und in primären SMZ 48 hpi um 10-20% nachgewiesen (Abb. 4.12 a und b). Bis auf primäre SMZ zu 48 hpi fand in Wirtszellen zu 48 und 96 hpi eine um 5-10% gesteigerte Stadienkonversion statt, wenn die Zellen zusätzlich zu IFN-γ auch mit TNF behandelt worden waren.

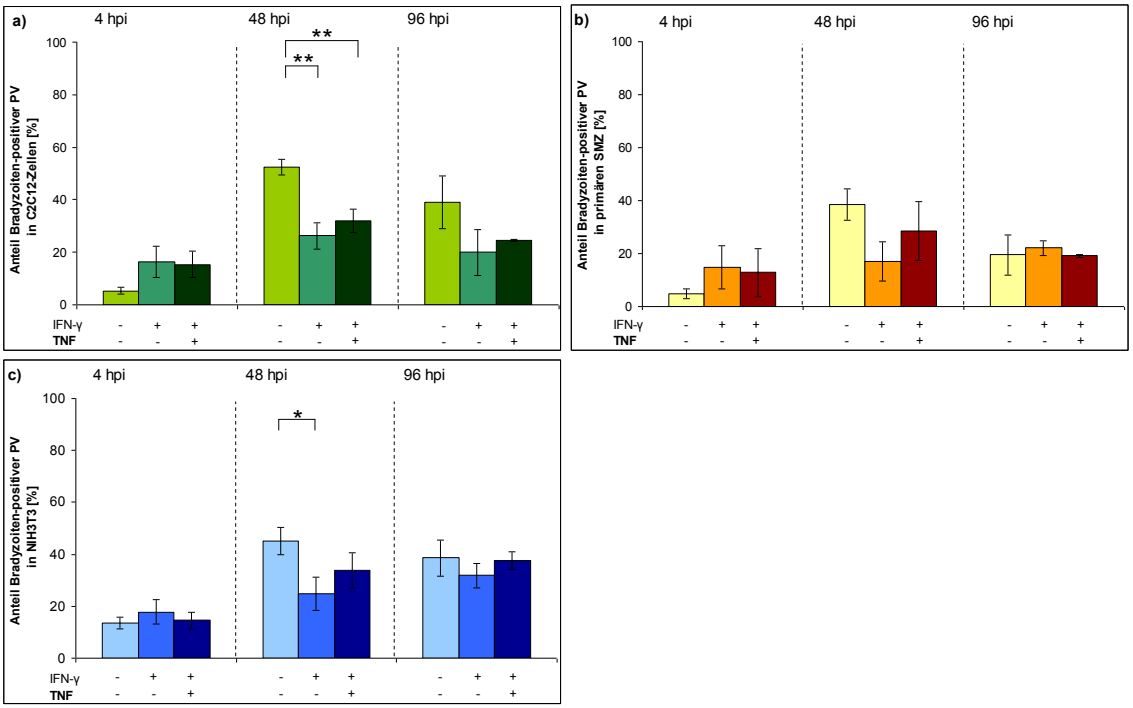


**Abb. 4.12: Stadienkonversionsraten in nicht aktivierten, IFN-γ oder IFN-γ/TNF aktivierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie Fibroblasten (c).**

C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium gehalten. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zeitgleich zur Infektion mit IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden Zellen fixiert, mit Antikörpern gegen Bradyzoiten-positive PV behandelt und durch konfokale Laserscanmikroskopie die Anzahl Vakuolen mit Bradyzoiten-spezifischen Antigenen pro hundert Vakuolen bestimmt. Die Stadienkonversionsrate in Prozent wurde nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ berechnet (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Werte aus vier (C2C12-Zellen), drei (primäre SMZ) und sieben (NIH3T3) Experimenten. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

In diesen Versuchen verursachte eine Aktivierung mit IFN-γ 48 hpi in allen drei Zelllinien so wie 96 hpi in C2C12- und NIH3T3-Zellen eine Hemmung der Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten. Bemerkenswerterweise war die Hemmung der Stadienkonversion in Zellen, die zusätzlich zu IFN-γ auch mit TNF aktiviert waren im Mittel geringer als in Zellen, die nur mit IFN-γ aktiviert waren.

### *4.2.4 Nachweis des Einflusses von IFN-γ auf das Parasitenwachstum auf Proteinebene*

Die Wirkung von IFN-γ auf das Wachstum von NTE-Toxoplasmen wurde auch durch Immunblot analysiert. Dazu wurden Proteinextrakte aus infizierten und nicht aktivierten oder IFN-γ aktivierten differenzierten SMZ sowie Fibroblasten hergestellt und diese elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine MyHC (muskelzellspezifisch), SAG1 (surface antigen 1; p30) und Aktin (als Maß für eine gleichmäßige Proteinmenge) sowie immundominante *Toxoplasma*-Proteine mit einem polyklonalen Antikörper detektiert.

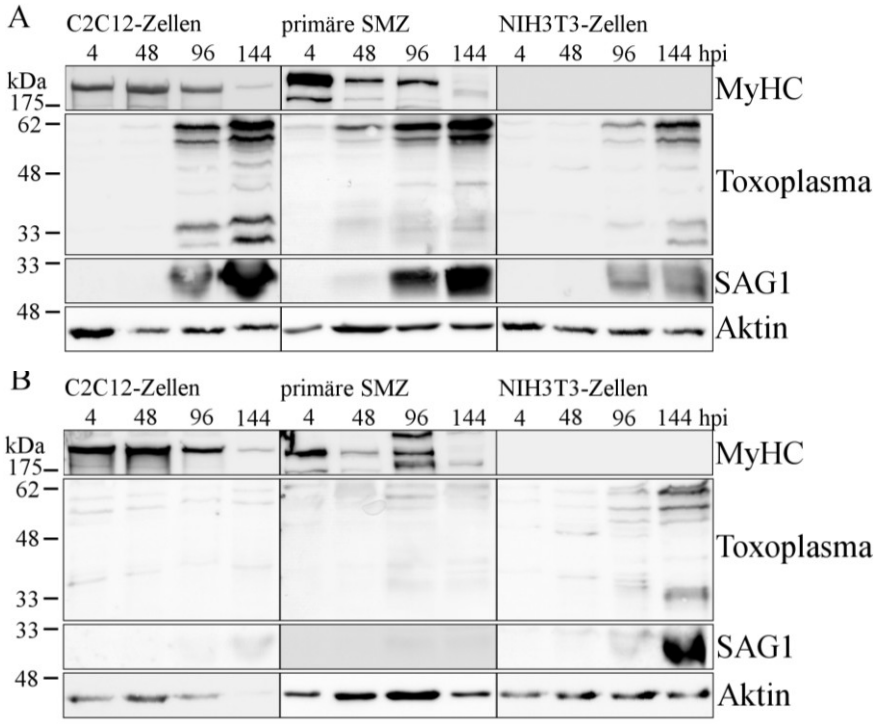


**Abb. 4.13: Expression von Muskel- und *Toxoplasma*-spezifischen Proteinen in infizierten permanenten und primären SMZ sowie NIH3T3-Zellen ohne (a) oder nach Aktivierung mit IFN-γ (b).**

C2C12-Zellen wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie Fibroblasten wurden mit Toxoplasmen des NTE-Stammes (Typ II) infiziert und teilweise zum Zeitpunkt der Infektion mit IFN-γ aktiviert. 4, 48, 96 und 144 hpi wurden Proteinextrakte hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern spezifisch für Aktin, MyHC, *Toxoplasma* und SAG1 analysiert. Repräsentatives Experiment von drei.

In differenzierten permanenten und primären SMZ wurde das Muskelprotein MyHC nachgewiesen, was bestätigte, dass die Zellen zum Zeitpunkt des Versuches differenziert waren. Erwartungsgemäß wurde in NIH3T3-Zellen dagegen kein MyHC detektiert (Abb. 4.13).

*Toxoplasma*-Proteine und SAG1 wurden in nicht aktivierten SMZ ab 96 hpi (C2C12-Zellen) bzw. 48 hpi (primäre SMZ) nachgewiesen. In Fibroblasten waren die Proteine ab 96 hpi detektierbar, jedoch in geringerer Menge als in SMZ.

Nach Aktivierung der SMZ mit IFN-γ waren dagegen kaum *Toxoplasma*-spezifische Proteine nachzuweisen. Dagegen war die Proteinmenge in NIH3T3-Zellen ähnlich groß wie in nicht aktivierten Fibroblasten und in Bezug auf SAG1 sogar noch größer.

In allen Proteinproben wurde außerdem Aktin als Marker für eine gleichmäßige Auftragung nachgewiesen. In aktivierten permanenten SMZ war die aufgetragene Proteinmenge 144 hpi geringer als in den anderen Proben, sowohl der relative Gehalt von MyHC als auch von SAG1 könnten somit stärker ausfallen.

IFN-γ hemmte somit in C2C12-Zellen und primären SMZ die Expression von *Toxoplasma*-Proteinen und SAG1, wohingegen in NIH3T3-Fibroblasten nach IFN-γ-Aktivierung mindestens genauso große Proteinmengen nachgewiesen wurden.

### *4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse*

In den Analysen wurde ein deutlicher Einfluss von IFN-γ auf das Parasitenwachstum in differenzierten SMZ nachgewiesen. So hemmte IFN-γ die *Toxoplasma*-Replikation, die Infektion, die Stadienkonversion und das Wachstum des Parasiten vor allem in C2C12-Zellen und geringfügiger in primären SMZ. In NIH3T3-Zellen waren nach Aktivierung mit Zytokinen das Wachstum, die Stadienkonversion und 96 hpi die Infektionsraten reduziert, aber zu einem geringeren Prozentsatz als in SMZ. IFN-γ und TNF hatten in Fibroblasten keinen Effekt auf die Parasitenreplikation. Die in aktivierten Fibroblasten detektierten erhöhten *Toxoplasma*-Proteinmengen wiesen daraufhin, dass IFN-γ keinen negativen Einfluss auf das Parasitenwachstum hatte. TNF hatte in allen Versuchen keinen signifikanten synergistischen Effekt zu IFN-γ.

Aufgrund der Ergebnisse war davon auszugehen, dass IFN-γ in SMZ wesentlich stärker als Inhibitor der Vermehrung von *Toxoplasma* wirkte als in Fibroblasten. Eine synergistische Rolle von TNF zu IFN-γ wurde hier nicht eindeutig bewiesen.

## 4.3 Untersuchungen zur induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase als IFN-γ-induzierter Mechanismus in der Abwehr von *T. gondii*

Nachdem gezeigt wurde, dass IFN-γ einen deutlich hemmenden Effekt auf die Vermehrung von *T. gondii* in SMZ hatte, wurden nun die durch das Zytokin ausgelösten Mechanismen untersucht.

Es ist bekannt, dass IFN-γ ein Stimulator der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) ist (ADAMS ET AL., 1990; YAP & SHER, 1999). Dieses Enzym produziert reaktives NO, das in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen eine wichtige Rolle spielt (SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1997).
Die Beteiligung von iNOS an der durch IFN-γ ausgelösten Parasitostase in differenzierten SMZ wurde anhand von quantitativer PCR, Nitritnachweis in Zellmediumsüberständen, Quantifizierung des Wachstums β-Gal exprimierender transgener Parasiten und Bestimmung der Vakuolengrößen analysiert. Zusätzlich wurde mit Hilfe des iNOS-Inhibitors L-NIL untersucht, inwieweit eine Hemmung der iNOS auf das Wachstum und die Replikation von *Toxoplasma* einwirkt.

### *4.3.1 Expression des murinen iNOS-Genes NOS2*

Zu Beginn wurde untersucht, ob die Aktivierung von SMZ einen Einfluss auf die Regulation des murinen iNOS-Gens *NOS2* hatte. Hierfür wurde aus nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten, teilweise infizierten differenzierten SMZ sowie Fibroblasten mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und per „real time“-PCR quantifiziert.

Die Transkription von *NOS2* schwankte von Versuch zu Versuch stark (Tabelle 4.1). Es wurde jedoch festgestellt, dass IFN-γ iNOS-mRNA im Mittel in nicht infizierten differenzierten permanenten SMZ deutlich hochregulierte (Tabelle 4.2). In Fibroblasten war die Transkription von *NOS2* 24 h nach Aktivierung mit IFN-γ nicht und 48 h nur 13-fach heraufreguliert. Letzteres entsprach nur knapp 8 % der Regulation in primären und 0,05 % der Hochregulierung in permanenten SMZ. In C2C12- und NIH3T3-Zellen wurde die stärkste Transkription 48 h nach Aktivierung detektiert, in primären SMZ 24 h nach Aktivierung.

**Tabelle 4.1: IFN-γ-induzierte Transkriptlevel von iNOS, Werte einzelner Versuche**

| Aktivierungs | | C2C12-Zellen | | primäre SMZ | | NIH3T3-Zellen | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -dauer | *T. gondii* | V1 | V2 | V3 | V4 | V1 | V2 | V3 | V4 |
| 24 h | - | 1.313 | 17 | 535 | 0 | 0,2 | - | 1 | 10 |
| 24 h | + | 111 | 3 | 44 | 234 | 0,1 | 1 | 6 | 4 |
| 48 h | - | 3.231 | 48.360 | 0 | 339 | 7,7 | - | 0 | 30 |
| 48 h | + | 303 | 8.186 | 0 | 13 | 25 | - | 0 | 3 |

Daten sind x-fache Induktion von iNOS-mRNA durch IFN-γ relativ zur β-Aktin-mRNA. Statistische Ausreißer sind mit - gekennzeichnet.

**Tabelle 4.2: IFN-γ-induzierte Transkriptlevel von iNOS, Mittelwerte mit Standardfehler**

| | | Zelllinie | | |
|---|---|---|---|---|
| Zeitpunkt | *T. gondii* | C2C12-Zellen | primäre SMZ | NIH3T3-Zellen |
| 24 h | - | 665 +/- 648 | 267 +/- 267 | 0 +/- 0 |
| 24 h | + | 57 +/- 54 | 139 +/- 95 | 5 +/- 1 |
| 48 h | - | 25.796 +/- 22.565 | 169 +/- 169 | 13 +/- 9 |
| 48 h | + | 4.245 +/- 3.942 | 13 +/- 6 | 2 +/- 2 |

Daten sind x-fache Induktion von iNOS-mRNA durch IFN-γ relativ zur β-Aktin-mRNA. Statistische Ausreißer wurden entfernt.

Weitere Untersuchungen mit differenzierten permanenten SMZ ergaben, dass eine gleichzeitige Infektion mit Toxoplasmen des NTE-Stammes die IFN-γ-induzierte Hochregulation von iNOS-mRNA 24 hpi im Mittel um 90% und 48 hpi um 85% verringerte (Tabelle 4.2). Ähnliche Unterschiede wurden in primären SMZ gefunden, wo eine Infektion mit *Toxoplasma* die IFN-γ-induzierte Transkription von *NOS2* im Durchschnitt 24 hpi um 50% und 48 hpi um 90% herabsenkte. In NIH3T3-Zellen war die Transkription von *NOS2* durch *Toxoplasma* 48 hpi um 85% gesenkt, wohingegen die Infektion 24 hpi keinen hemmenden Einfluss auf die Transkription von *NOS2* hatte.
Die Versuchsergebnisse zeigten, dass *Toxoplasma* in der Lage war, in SMZ die IFN-γ-induzierte Transkription von *NOS2* zu hemmen.

### *4.3.2 Einfluss von IFN-γ auf die NO-Produktion in Zellkulturüberständen von differenzierten SMZ und Fibroblasten*

Neben der Regulation des murinen *NOS2*-Genes wurde auch das Produkt der iNOS, Stickstoffmonoxid (NO), analysiert. Da NO eine instabile Verbindung ist, die in Zellkulturmedium schnell zu Nitrat und Nitrit zerfällt, wurde letzteres in kolorimetrischen Tests als Maß für die NO-Produktion nachgewiesen (SCHMIDT & KELM, 1996).

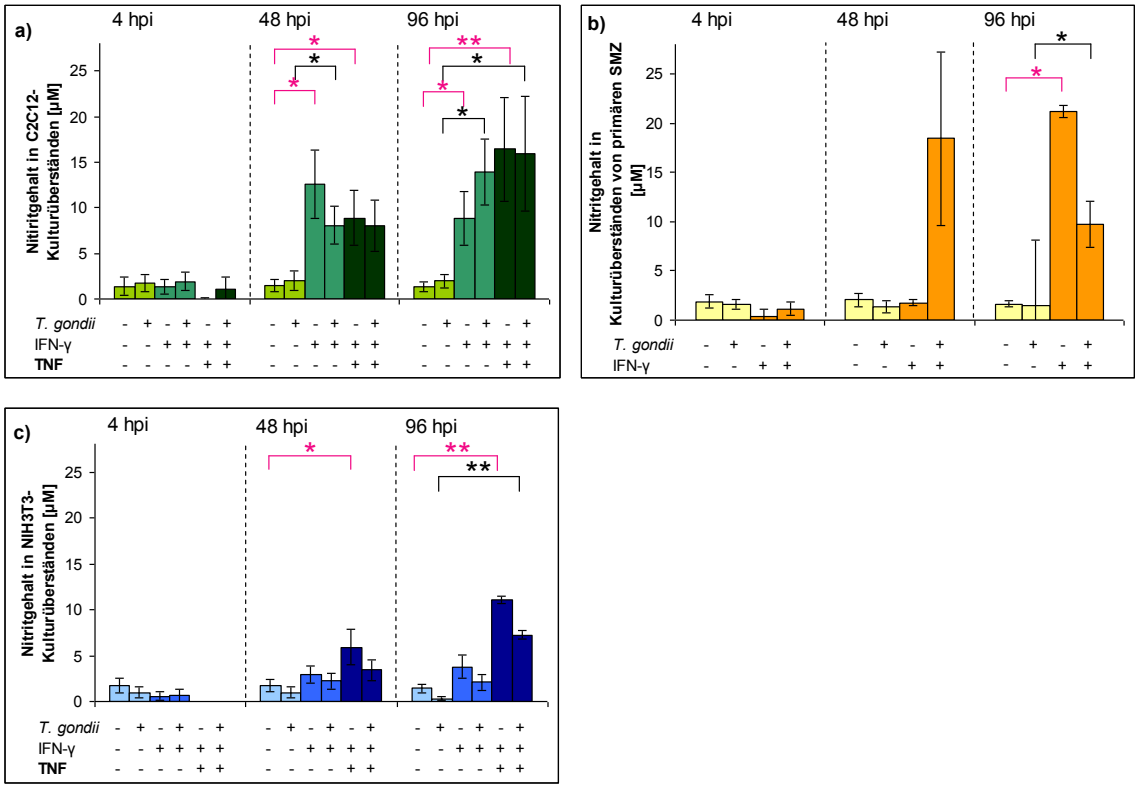


**Abb. 4.14: Nitritgehalt in Überständen von nicht infizierten oder infizierten, nicht aktivierten bzw. aktivierten differenzierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie Fibroblasten (c).**

C2C12-Zellen wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium gehalten. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zeitgleich mit den Zytokinen IFN-γ und TNF behandelt. 4, 48, und 96 hpi wurde in den Kulturüberständen mit Hilfe der Griess-Reaktion Nitrit als Abbauprodukt des instabilen NO nachgewiesen. Die Werte sind Mittelwerte aus sechs (C2C12-Zellen), drei (primäre SMZ) bzw. neun (NIH3T3-Zellen) Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$. Signifikanzklammern für Unterschiede zwischen nicht infizierten Zellen in pink, für infizierte Zellen in schwarz.

IFN-γ steigerte den Nitritgehalt in Zellkulturüberständen von nicht infizierten differenzierten C2C12-Zellen 48 und 96 h nach Aktivierung statistisch signifikant um 10-15 nmol/mL Kulturmedium (Abb. 4.14 a). In primären SMZ war die Nitritkonzentration 96 hpi statistisch signifikant sogar um 20 nmol/mL erhöht (Abb. 4.14 b). In Fibroblasten wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung der Nitritproduktion gemessen, wenn die Wirtszellen mit IFN-γ und TNF (48 h nach Aktivierung) bzw. nur IFN-γ oder IFN-γ und TNF (96 h nach Aktivierung) stimuliert waren (Abb. 4.14 c). Allerdings war die Nitritkonzentration in NIH3T3-Zellkulturüberständen mit maximal 10 µM wesentlich geringer als in primären SMZ, wo die höchste gemessene Konzentration mit 20 µM

doppelt so hoch war. In NIH3T3-Zellen hatte TNF zudem 96 h nach Aktivierung im Mittel einen leicht synergistischen Effekt zu IFN-γ, der den Nitritgehalt um 5 nmol/mL Kulturmedium erhöhte (Abb. 4.14).

Nach Infektion mit NTE-Toxoplasmen wurde ebenfalls eine Steigerung der Nitritkonzentration gefunden, wenn die Wirtszellen zuvor mit Zytokinen aktiviert waren. In primären SMZ waren die Nitritgehalte aktivierter infizierter Zellen zu 96 hpi im Mittel nur halb so hoch wie in den aktivierten nicht infizierten Zellen. Ebenso waren die Nitritgehalte IFN-γ/TNF-aktivierter Fibroblasten nach 48 und 96 h um durchschnittlich 2-3 nmol/mL Kuturmedium gesenkt, wenn die Zellen infiziert waren.

### *4.3.3 Parasitenwachstum und Replikation bei Hemmung der iNOS*

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine Steigerung der Transkription des iNOS-Genes *NOS2* durch IFN-γ sowie eine Erhöhung des Nitritgehaltes in aktivierten differenzierten SMZ festgestellt. Da die Expression von iNOS und die Produktion von NO die IFN-γ-verursachte Hemmung des Parasitenwachstums vermitteln könnten, wurden Experimente durchgeführt, um das Wachstum von *Toxoplasma* bei Inhibition von iNOS zu analysieren. Hierfür wurde L-NIL als Inhibitor der iNOS eingesetzt und zunächst getestet, ob L-NIL auch in den verwendeten Wirtszellen einen hemmenden Effekt auf die

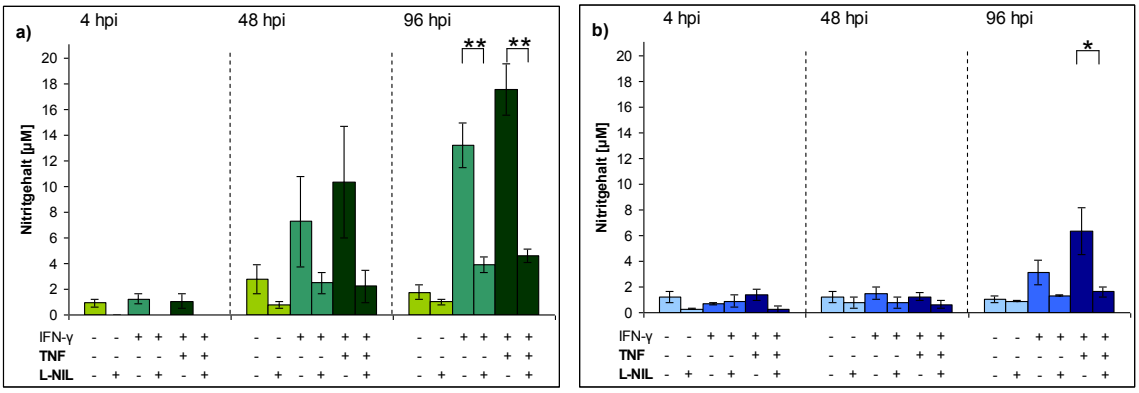


**Abb. 4.15: Nitritgehalt in Überständen von nicht infizierten, nicht aktivierten bzw. aktivierten differenzierten C2C12- (a) und NIH3T3-Zellen (b) mit und ohne iNOS-Inhibitor.**

Die permanenten SMZ wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium gehalten. Differenzierte C2C12- sowie NIH3T3-Zellen wurden mit L-NIL behandelt. 1 h später wurden die Zellen teilweise mit IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 h nach Versuchsbeginn wurde Nitrit als Abbauprodukt des flüchtigen NO mit Hilfe der Griess-Reaktion in einem kolorimetrischen Test in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Die Werte sind Mittelwerte aus vier Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

Nitritproduktion hatte. Die Produktion von Nitrit wurde dafür in Überständen von nicht infizierten Zellen untersucht, die teilweise mit L-NIL behandelt worden waren. Der Nitritgehalt in L-NIL-behandelten C2C12-Zellen war gegenüber Zellen ohne Inhibitor ab 48 h und in NIH3T3-Zellen zu 96 h klar verringert und lag in etwa auf dem Level der nicht aktivierten Zellen (Abb. 4.15). Die Nitritkonzentration in nicht aktivierten C2C12-Zellen war zu 48 h ebenfalls gesenkt.
Zudem wurde in diesen Experimenten ein durchschnittlich leicht erhöhter Nitritgehalt detektiert, wenn die Zellen ohne iNOS-Inhibitor zusätzlich zu IFN-γ auch mit TNF aktiviert worden waren.

### *4.3.4 Einfluss der Inhibierung von iNOS auf das Parasitenwachstum*

Nachdem nachgewiesen worden war, dass L-NIL die IFN-γ-induzierte NO-Produktion in SMZ tatsächlich deutlich verminderte stellte sich die Frage, wie wichtig die Aktivität von iNOS für die Eindämmung des Parasitenwachstums in IFN-γ-aktivierten SMZ war. Der Einfluss der iNOS auf das Parasitenwachstum wurde zunächst mit Hilfe von *LacZ*-transgenen RH-Toxoplasmen und deren Vermehrung in L-NIL-behandelten SMZ untersucht.
Frühere Versuche hatten gezeigt, dass eine Aktivierung mit IFN-γ vor allem der SMZ zu einem klar verringerten Parasitenwachstum führte. Sollte dieser Effekt durch iNOS zustande kommen, müssten die Parasiten bei der Inhibition des Enzyms ähnlich gut wie in nicht aktivierten Zellen wachsen.

In permanenten SMZ und Fibroblasten war das Parasitenwachstum, wie schon in früheren Experimenten gezeigt, zu 48 und 96 hpi signifikant gesenkt, wenn die Zellen mit IFN-γ oder IFN-γ und TNF aktiviert worden waren. Dies war auch in primären SMZ 96 hpi der Fall, 48 hpi führte nur die Aktivierung mit IFN-γ zu einer signifikanten Hemmung des Parasitenwachstums (Abb. 4.16).
In den aktivierten permanenten SMZ war das Parasitenwachstum durch L-NIL-Behandlung im Gegensatz zu den Zellen ohne Inhibitor zu beiden Zeitpunkten durchschnittlich um 20-30% und in IFN-γ-aktivierten primären SMZ 48 hpi um 15% leicht gesteigert. Eine Steigerung wurde für NIH3T3-Fibroblasten nach L-NIL-Behandlung im Gegensatz zu den SMZ nicht gefunden. Dennoch war in permanenten und primären SMZ sowie Fibroblasten das Wachstum von *T. gondii* durch die Zugabe von Zytokinen

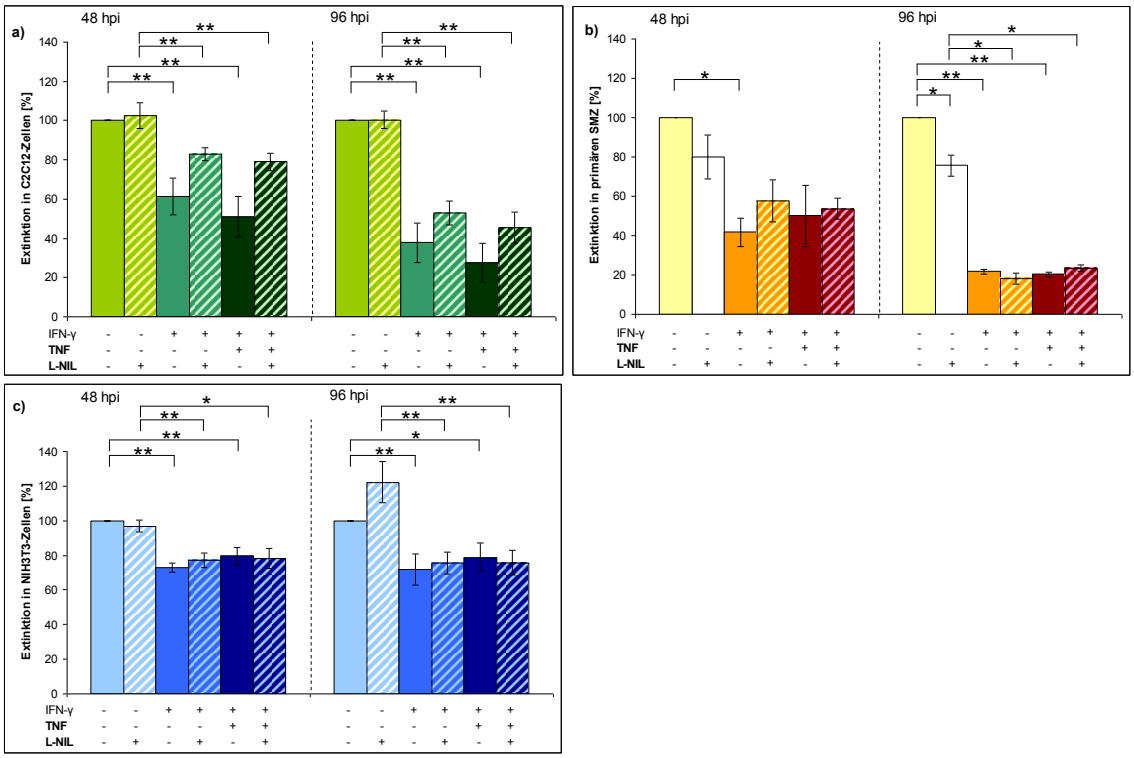


**Abb. 4.16: Wachstum von *Toxoplasma gondii* mit und ohne iNOS-Inhibitor in differenzierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie NIH3T3-Zellen (c) ohne und nach Aktivierung durch IFN-γ oder IFN-γ/TNF.**

C2C12-Zellen wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie Fibroblasten wurden mit L-NIL behandelt. 1 h später wurden sie mit *LacZ*-transgenen RH-Toxoplasmen infiziert und zum Infektionszeitpunkt teilweise mit IFN-γ und TNF aktiviert. 48 und 96 hpi wurde mittels eines kolorimetrischen CPRG-Tests das Wachstum der Parasiten bestimmt. Die Extinktion der jeweiligen nicht aktivierten Probe ohne L-NIL wurde in jedem Experiment gleich 100% gesetzt und die weiteren Werte dementsprechend berechnet. Die Werte sind Mittelwerte nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984) und stammen aus fünf (C2C12-Zellen), zwei (primäre SMZ) oder sieben (NIH3T3-Zellen) Experimenten. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

verglichen mit nicht aktivierten Zellen auch nach Zugabe des iNOS-Inhibitors signifikant gesenkt.

Außerdem wurde die Replikation von NTE-Toxoplasmen in aktivierten Zellen mit und ohne L-NIL-Behandlung analysiert, um den verminderten wachstumshemmenden Effekt bei der Inhibition von aktivierten permanenten SMZ mit Hilfe einer anderen Methode und unter Verwendung eines anderen Parasitenstammes zu untersuchen. Dafür wurde die durchschnittliche Anzahl von Parasiten in hundert parasitophoren Vakuolen mikroskopisch bestimmt.

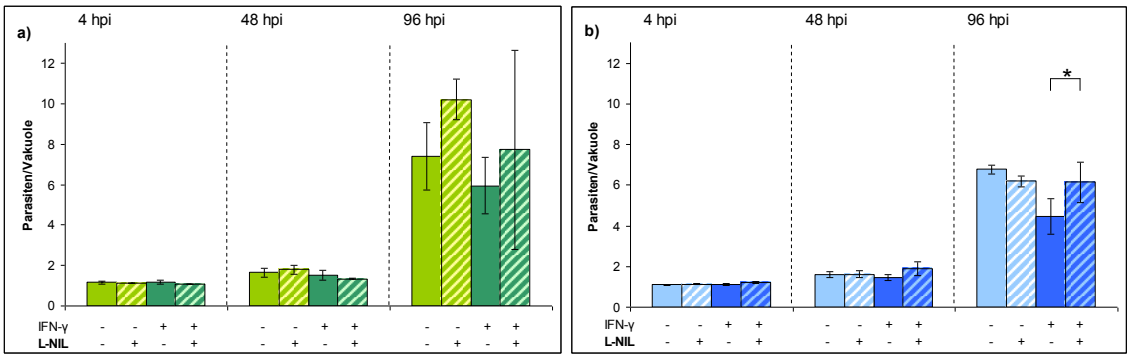


**Abb. 4.17: Größen der PV von *Toxoplasma* ohne und mit iNOS-Inhibitor in nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten permanenten differenzierten SMZ (a) und Fibroblasten (b).**

Die permanenten SMZ wurden ab 24 hps zur Differenzierung in Differenzierungsmedium gehalten. Differenzierte C2C12- sowie NIH3T3-Zellen wurden mit L-NIL behandelt und 1 h später mit NTE-Toxoplasmen infiziert. Teilweise wurden die Wirtszellen zeitgleich zur Infektion mit IFN-γ aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurden die Zellen fixiert und die Parasiten in einem Immunfluoreszenztest mit einem polyklonalen Antikörper gegen *Toxoplasma* markiert. Daraufhin wurde die Parasitenanzahl pro PV in hundert Vakuolen mikroskopisch bestimmt und daraus der Durchschnitt berechnet. Die Werte sind die Mittelwerte aus vier Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.
Signifikanzen: * für $p < 0{,}05$; ** für $p < 0{,}01$.

Sowohl in permanenten SMZ als auch in Fibroblasten enthielten die Vakuolen unabhängig von der Aktivierung mit IFN-γ zu 4 und 48 hpi durchschnittlich einen Parasiten. Von 48 auf 96 hpi steigerte sich die Vakuolengröße durchschnittlich ungefähr um das 6-fache in permanenten SMZ und das 5-fache in Fibroblasten (Abb. 4.17). In permanenten SMZ war hierbei die Vakuolengröße in nicht aktivierten, L-NIL-behandelten Zellen mit zehn Parasiten am höchsten. Die aktivierten, nicht mit Inhibitor behandelten permanenten SMZ wiesen durchschnittlich zwei Parasiten weniger auf (Abb. 4.17 a).

L-NIL führte dazu, dass in aktivierten permanenten SMZ 48 hpi die Vakuolengröße um etwa anderthalb Parasiten auf den Level der nicht aktivierten Zellen anstieg. Der replikationshemmende Effekt von IFN-γ wurde also mit Gabe des Inhibitors im Mittel aufgehoben.

In Fibroblasten steigerte die Inhibierung von iNOS durch L-NIL in aktivierten Zellen das Wachstum von *Toxoplasma* signifikant um knapp zwei Parasiten pro Vakuole, in anderen Fällen wurden keinen deutlichen Unterschiede festgestellt (Abb. 4.17 b).

### *4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse*

Die Versuche haben gezeigt, dass durch den Einfluss von IFN-γ die Expression von iNOS in permanenten SMZ deutlich und in primären SMZ ebenfalls gesteigert wurde. In Fibroblasten konnte dahingegen nur eine wesentlich geringere Steigerung der Expression von iNOS gemessen werden. Außerdem war *Toxoplasma* in der Lage, die durch IFN-γ erhöhte Transkription von *NOS2* besonders in permanenten, aber auch in primären SMZ zu hemmen.

Der Nitritgehalt von Kulturüberständen aktivierter differenzierter SMZ war deutlich höher als in nicht aktivierten SMZ, was ein Grund für das durch IFN-γ gehemmte Wachstum von *T. gondii* in früheren Versuchen sein könnte. In Fibroblasten war der Nitritgehalt Zytokin-aktivierter Zellen ebenfalls erhöht, aber nur maximal halb so stark wie in SMZ.

L-NIL hat sich als potenter Inhibitor der iNOS erwiesen, was durch den gesenkten Nitritgehalt der Inhibitor-behandelten Zellen deutlich wurde. Gegensätzlich zu Fibroblasten wurde in L-NIL behandelten SMZ durchschnittlich ein leicht gesteigertes Wachstum festgestellt. Allerdings wurde sowohl in permanenten SMZ als auch in Fibroblasten die Replikation durch die Inhibition von iNOS erhöht. Dies weist auf eine Rolle von iNOS in der Abwehr einer *Toxoplasma*-Infektion in SMZ, aber auch in Fibroblasten hin.

## 4.4 Rolle von p47-GTPasen in der durch IFN-γ vermittelten Parasitenabwehr

Als weiterer IFN-γ-vermittelter Abwehrmechanismus gegen *Toxoplasma* wurde die Disruption der PV durch Anlagerung von IRG-Proteinen (**I**mmunity **R**elated **G**TPases) beschrieben (COLLAZO ET AL., 2001; TAYLOR, 2000). Sobald der Parasit daraufhin frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegt, stirbt er für gewöhnlich ab.

Daher wurde die Expression der beiden IRG-Proteine Irga6 und Irgm3 in *Toxoplasma*-infizierten und nicht infizierten SMZ nach Aktivierung mit IFN-γ analysiert. Ebenso wurde die Lokalisation von Irga6 in infizierten, nicht aktivierten und aktivierten Wirtszellen mikroskopisch untersucht.

### *4.4.1 Regulation der Transkription der IRG-Gene Irga6 und Irgm3 durch IFN-γ in differenzierten SMZ bzw. in Fibroblasten*

Zur Analyse der Genregulation von Irga6 und Irgm3 wurde aus nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten, teilweise infizierten Zellen mRNA isoliert, daraus cDNA hergestellt und mit spezifischen Primern durch quantitative „real time"-PCR Irga6, Irgm3 sowie β-Aktin zur Normalisierung der cDNA-Mengen analysiert.

a) Regulation von *Irga6* und *Irgm3* durch IFN-γ in nicht infizierten Wirtszellen

Bei der Untersuchung der Regulation der *Irga6*- und *Irgm3*-Transkription ergaben sich große Schwankungen von Versuch zu Versuch (Tabelle 4.3 und 4.4).

Jedoch unterschieden sich differenzierte SMZ und NIH3T3-Zellen hinsichtlich der IFN-γ-induzierten Transkription von *Irga6* im Mittel deutlich (Tabelle 4.5). Besonders in C2C12-Zellen wurde die Transkription stark durch IFN-γ hochreguliert. So war die Steigerung der Transkription von *Irga6* nach 24 h in permanenten SMZ 300-fach höher als in primären SMZ und etwa 70-fach höher als in Fibroblasten.
Die Transkription steigerte sich bis zum Zeitpunkt 48 h nach Aktivierung im Vergleich zu 24 h zusätzlich noch um die Hälfte in permanenten SMZ, um das 270-fach in primären SMZ und um das 10-fache in NIH3T3-Zellen.

**Tabelle 4.3: Transkription von *Irga6* in IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten - Einzelversuche**

| Aktivierungs | C2C12-Zellen | | primäre SMZ | | NIH3T3-Zellen | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -dauer | V1 | V2 | V3 | V4 | V1 | V2 | V3 | V4 |
| 24 h | 118.128 | 26.701 | 449 | 1 | 1193 | 13 | 2.116 | - |
| 48 h | 43.858 | 173.190 | 16.066 | 110.645 | 4.098 | 1.050 | 238.421 | 145.605 |

Daten sind x-fache Induktion von Irga6-mRNA durch IFN-γ relativ zur β-Aktin-mRNA. Statistische Ausreißer sind mit - gekennzeichnet.

**Tabelle 4.4: Transkription von *Irgm3* in IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten - Einzelversuche**

| Aktivierungs | C2C12-Zellen | | primäre SMZ | | NIH3T3-Zellen | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -dauer | V1 | V2 | V3 | V4 | V1 | V2 | V3 | V4 |
| 24 h | 6.393 | 12.261 | 588 | 1 | - | 88 | 297 | 646 |
| 48 h | 4.849 | 25.414 | 592 | 107.227 | 1.358 | - | 3.779 | 584 |

Daten sind x-fache Induktion von Irgm3-mRNA durch IFN-γ relativ zur β-Aktin-mRNA. Statistische Ausreißer sind mit - gekennzeichnet.

**Tabelle 4.5: Transkription von *Irga6* in IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten - Mittelwerte**

| | Zelllinie | | |
|---|---|---|---|
| *Zeitpunkt* | *C2C12-Zellen* | *primäre SMZ* | *NIH3T3-Zellen* |
| 24 h | 72.415 +/- 45.713 | 225 +/- 224 | 1.108 +/- 609 |
| 48 h | 108.524 +/- 64.666 | 63.356 +/- 47.290 | 10.859 +/- 2915 |

Daten sind x-fache Induktion von Irga6-mRNA durch IFN-γ relativ zur β-Aktin-mRNA. Statistische Ausreißer wurden entfernt.

**Tabelle 4.6: Transkription von *Irgm3* in IFN-γ-aktivierten differenzierten SMZ und Fibroblasten - Mittelwerte**

| | Zelllinie | | |
|---|---|---|---|
| *Zeitpunkt* | *C2C12-Zellen* | *primäre SMZ* | *NIH3T3-Zellen* |
| 24 h | 9.327 +/- 2934 | 295 +/- 293 | 343 +/- 163 |
| 48 h | 15.131 +/- 10.282 | 53.909 +/- 53.318 | 1.907+/- 962 |

Daten sind x-fache Induktion von Irgm3-mRNA durch IFN-γ verglichen mit nicht aktivierten Zellen +/- Standardfehler. Statistische Ausreißer wurden entfernt.

Die Transkription von *Irgm3* wurde wie die von *Irga6* durch IFN-γ in allen untersuchten Zelllinien deutlich hochreguliert. Dies galt mit einer Steigerung um das 10.000-fache 24 h nach Aktivierung besonders für C2C12-Zellen, in primären SMZ und Fibroblasten war die Transkription von *Irgm3* jeweils etwa 300-fach gesteigert (Tabelle 4.6). In allen Proben war die Transkription 48 h nach Aktivierung im Mittel stärker als zu 24 h. Das bedeutete in permanenten SMZ einen 15.000-fachen, primären SMZ einen 54.000-fachen und in Fibroblasten 2.000-fachen Anstieg der Transkription von *Irgm3* verglichen mit nicht aktivierten Zellen.

b) Regulation der Transkription von *Irga6* und *Irgm3* durch IFN-γ in infizierten Zellen

Mitglieder der IFN-γ-induzierten IRG-Proteinfamilie sind in der Lage, sich an die PV-Membran von *Toxoplasma* anzulagern, diese zu zerstören und so für das Absterben des Parasiten zu sorgen. Es wurde jedoch schon mehrfach beschrieben, dass *Toxoplasma* Wirtssignalwege, die seiner Abwehr dienen, beeinflussen kann (LALIBERTÉ & CARRUTHERS, 2008; LAMBERT & BARRAGAN, 2010). Um eine mögliche Modulation der IFN-γ-induzierten Expression von IRG-Proteinen durch *Toxoplasma* in SMZ zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten die Transkriptmenge von Irga6 und Irgm3 in infizierten und nicht infizierten Zellen verglichen.

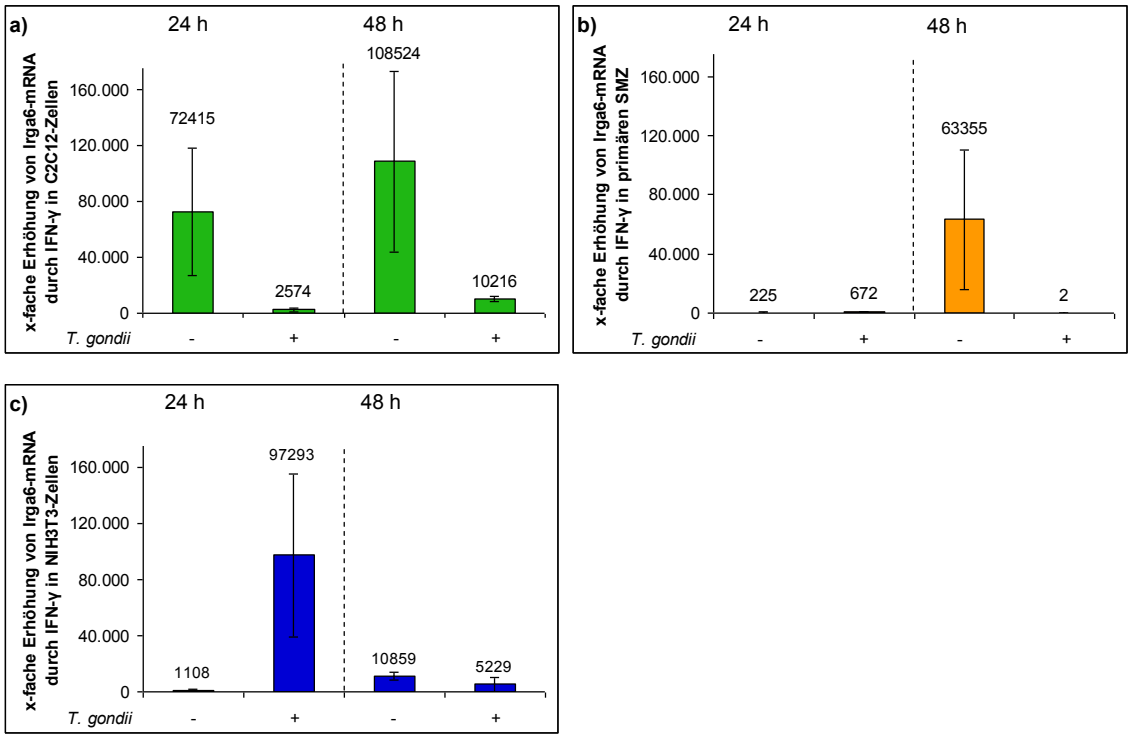


**Abb. 4.18: Erhöhung der Irga6-Transkriptmenge durch IFN-γ in differenzierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie NIH3T3-Zellen (c) ohne und nach Infektion mit NTE-Toxoplasmen.**
C2C12-Zellen wurden ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert, um sie zu differenzieren. Aus nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten differenzierten permanenten und primären SMZ sowie Fibroblasten, die teilweise mit *Toxoplasma* infiziert waren, wurde 24 und 48 hpi mRNA isoliert. Aus der mRNA wurde daraufhin durch reverse Transkription cDNA hergestellt und mittels quantitativer PCR sowohl Aktin als auch Irga6 amplifiziert. Die Genregulation durch IFN-γ wurde anhand der Formel $R = \frac{2^{(p_{Irga6na} - p_{Irga6aktiviert})}}{2^{(p_{Aktin} - p_{Aktinaktiviert})}}$ aus den Crossingpoints der Proben bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei (SMZ) bzw. vier (Fibroblasten) Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Die Hochregulation der *Irga6*-Transkription durch IFN-γ war in differenzierten C2C12-Zellen durch eine Infektion mit *Toxoplasma* 24 h deutlich um 95% und 48 h nach Aktivierung um 90% gehemmt (Abb. 4.18). In differenzierten primären SMZ sowie NIH3T3-Zellen trat eine Hemmung nur 48 hpi auf. Dabei senkte *Toxoplasma* die Transkription von *Irga6* in primären SMZ nahezu vollständig und in NIH3T3-Zellen um die Hälfte.

Die *Irgm3*-Transkription war im Mittel in allen Proben nach Aktivierung mit IFN-γ hochreguliert (s. Tab. 4.3), aber in C2C12-Zellen etwa 90% weniger stark, wenn die Zellen

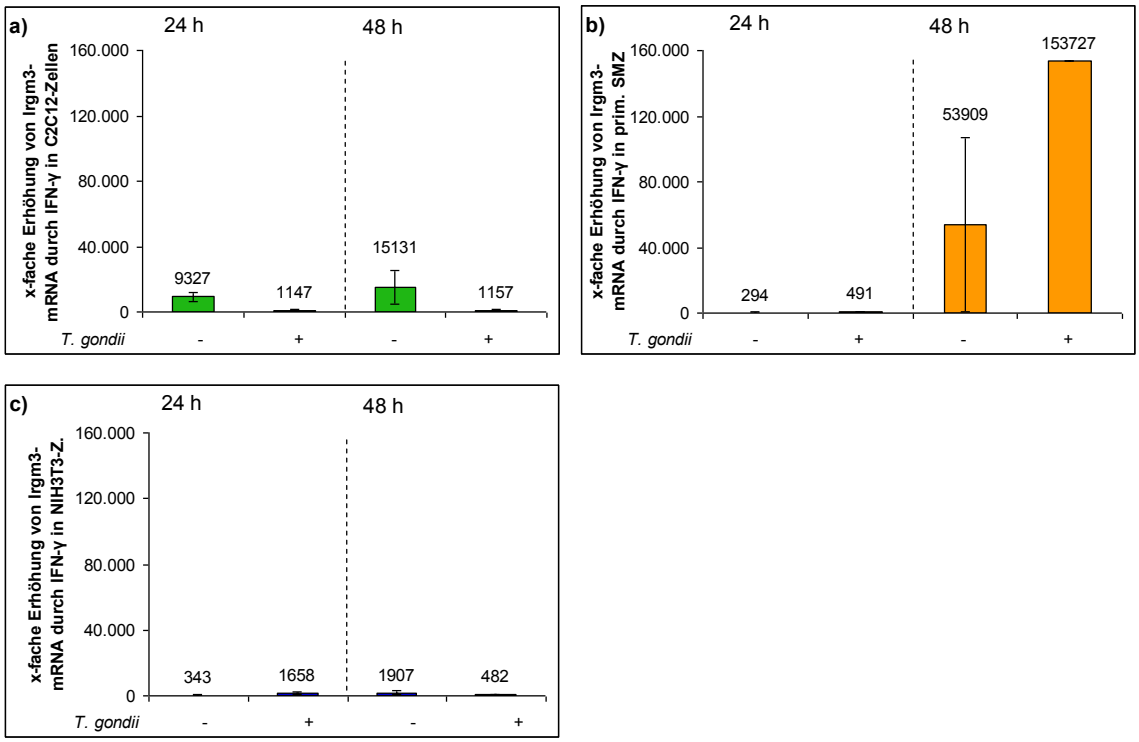


**Abb. 4.19: Erhöhung der Irgm3-Transkriptmenge durch IFN-γ in differenzierten permanenten (a) und primären SMZ (b) sowie NIH3T3-Zellen (c) ohne und nach Infektion mit NTE-Toxoplasmen.**
C2C12-Zellen wurden ab 24 hps in Differenzierungemedium kultiviert, um sie zu differenzieren. Aus nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten differenzierten permanenten und primären SMZ sowie Fibroblasten, die teilweise mit *Toxoplasma* infiziert waren, wurde 24 und 48 hpi mRNA isoliert. Aus der mRNA wurde durch reverse Transkription cDNA hergestellt und mittels quantitativer PCR sowohl Aktin als auch Irga6 amplifiziert. Die Genregulation durch IFN-γ wurde anhand der Formel $R = \frac{2^{(Cp_{Irgm3na} - Cp_{Irgm3aktiviert})}}{2^{(Cp_{Aktin} - Cp_{Aktinaktiviert})}}$ aus den Crossingpoints der Proben bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei (SMZ) bzw. vier (Fibroblasten) Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

mit *Toxoplasma* infiziert waren (Abb. 4.19). Die IFN-γ-induzierte Erhöhung der *Irgm3*-Transkription wurde auch in NIH3T3-Zellen zu 48 h nach Aktivierung durch *Toxoplasma* um 75% gehemmt. In primären SMZ war die Transkription von *Irgm3* in infizierten Zellen jeweils stärker als in nicht infizierten.

### *4.4.2 Nachweis von Irga6 auf den Membranen von* Toxoplasma*-haltigen PV in differenzierten SMZ sowie Fibroblasten*

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich manche IRG-Proteine auf der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) von *T. gondii* ablagern und zu deren Disruption führen

können (BUTCHER ET AL., 2005; HALONEN ET AL., 2001; TAYLOR ET AL., 1996; MARTENS ET AL., 2005). Dies führt in den meisten Fällen zum Absterben des Parasiten.

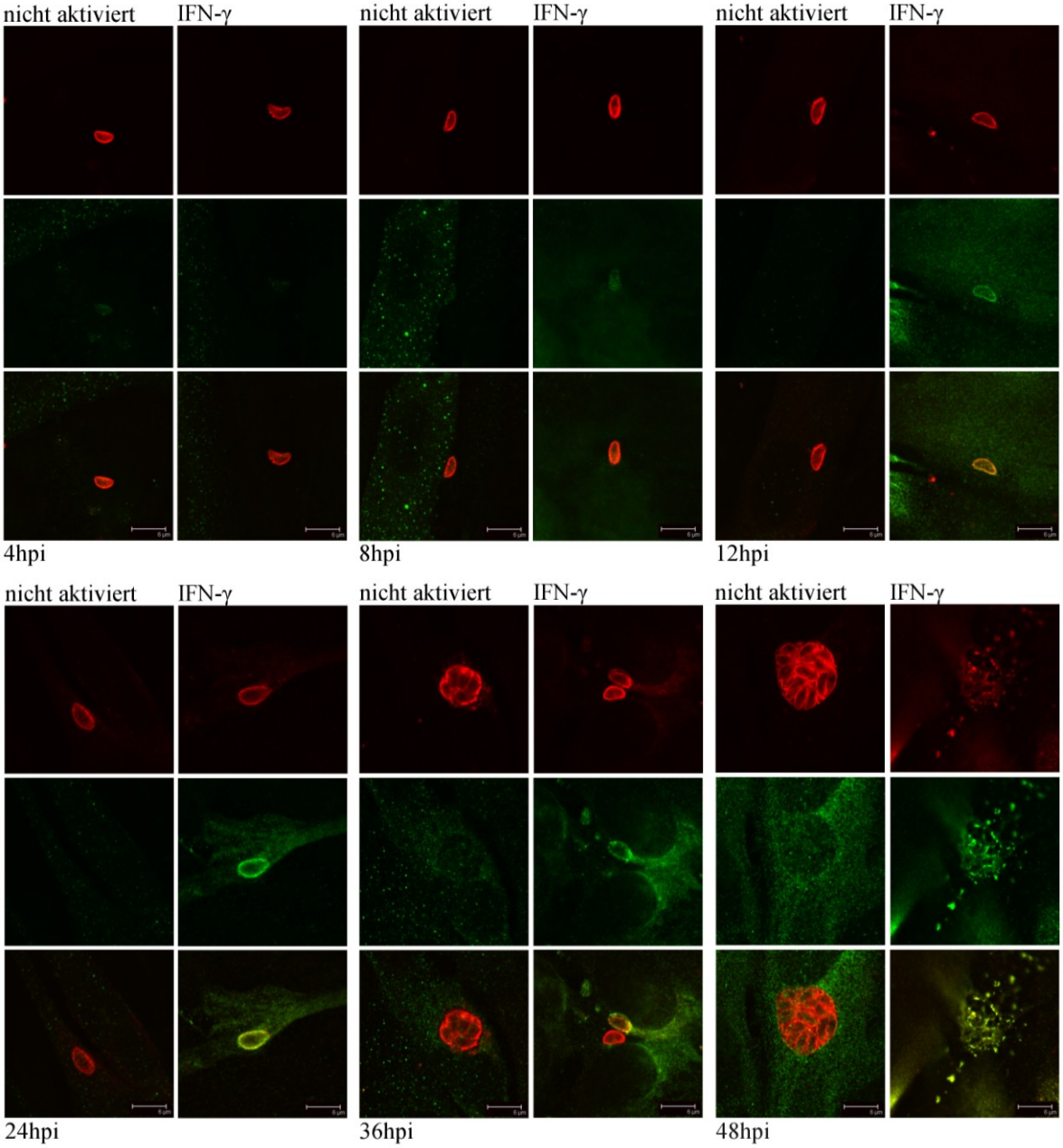


**Abb. 4.20: Lokalisation von Irga6 in *Toxoplasma*-infizierten differenzierten permanenten Skelettmuskelzellen ohne oder nach IFN-γ-Aktivierung.**

Permanente SMZ (C2C12-Zellen) wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Nach der Differenzierung wurden die C2C12-Zellen mit NTE-Toxoplasmen infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion teilweise mit IFN-γ aktiviert. Die Zellen wurden 4, 8, 12, 24, 36 und 48 hpi fixiert und in einem Immunfluoreszentest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* (rot) und Irga6 (grün) gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte durch Laserscanmikroskopie. Zur Verdeutlichung der Lokalisation von Irga6 wurden Überlagerungsbilder des roten und grünen Kanals erstellt. Maßstab 6 µm. Bilder aus einem repräsentativen Experiment von vier.

Es wurden daher Experimente durchgeführt, um die Lokalisation von Irga6 innerhalb differenzierter SMZ sowie Fibroblasten nach IFN-γ-Stimulation und gegebenenfalls auch auf der PVM sichtbar zu machen. Hierfür wurden nicht aktivierte und IFN-γ-aktivierte Wirtszellen mit NTE-Toxoplasmen infiziert und mittels Immunfluoreszenztests analysiert.
In IFN-γ-aktivierten C2C12-Zellen wurden ab 8 hpi Spuren von Irga6 auf der PVM der Toxoplasmen nachgewiesen (Abb. 4.20). Ab 12 hpi nahm die Menge von Irga6 auf der PVM in aktivierten Wirtszellen deutlich zu und wurde bei ca. 10% der PV gefunden. 48 hpi traten vermehrt Irga6- und *Toxoplasma*-positiv gefärbte Strukturen in den Präparaten auf. Möglicherweise handelte es sich bei diesen um rupturierte PV und *Toxoplasma*-Reste. Zu diesem Zeitpunkt war etwa bei 35% der aktivierten permanenten SMZ Irga6 auf der PVM abgelagert (Abb. 4.21). In nicht aktivierten permanenten SMZ begann ab etwa 48 hpi eine schwache Lokalisation von Irga6 auf der PVM bei nur ca. 3% der PV. Irga6 wurde also hauptsächlich in IFN-γ-aktivierten Zellen nachgewiesen. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Experimente überein, die zeigten, dass eine Aktivierung permanenter SMZ eine deutliche Steigerung der Transkription von Irga6 zur Folge hatte.

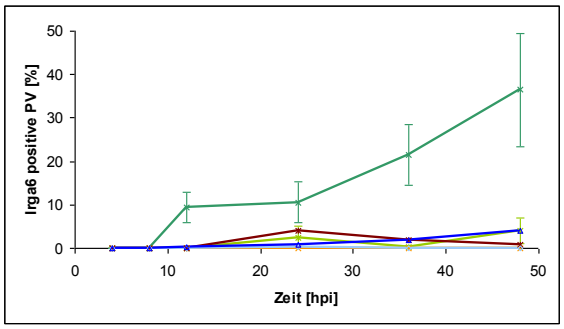


**Abb. 4.21: Anteil Irga6-positiver parasitophorer Vakuolen von *T. gondii* in differenzierten permanenten und primären SMZ sowie NIH3T3-Zellen nach Aktivierung mit IFN-γ.**
C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte permanente und primäre SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion teilweise mit IFN-γ aktiviert. Die Zellen wurden 4, 8, 12, 24, 36 und 48 hpi fixiert und in einem Immunfluoreszentest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* und Irga6 gefärbt. Die Präparate wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie ausgewertet, indem die Anzahl Irga6 positiver PV pro hundert PV bestimmt wurde. Nicht aktivierte Zellen: C2C12-Zellen in hellgrün, primäre SMZ in gelb, NIH3T3-Zellen in hellblau; aktivierte Zellen: C2C12-Zellen dunkelgrün, primäre SMZ rot und NIH3T3-Zellen in dunkelblau. Ergebnisse aus vier (C2C12-Zellen), drei (primäre SMZ) und sechs (NIH3T3-Zellen) Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach Dixon, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

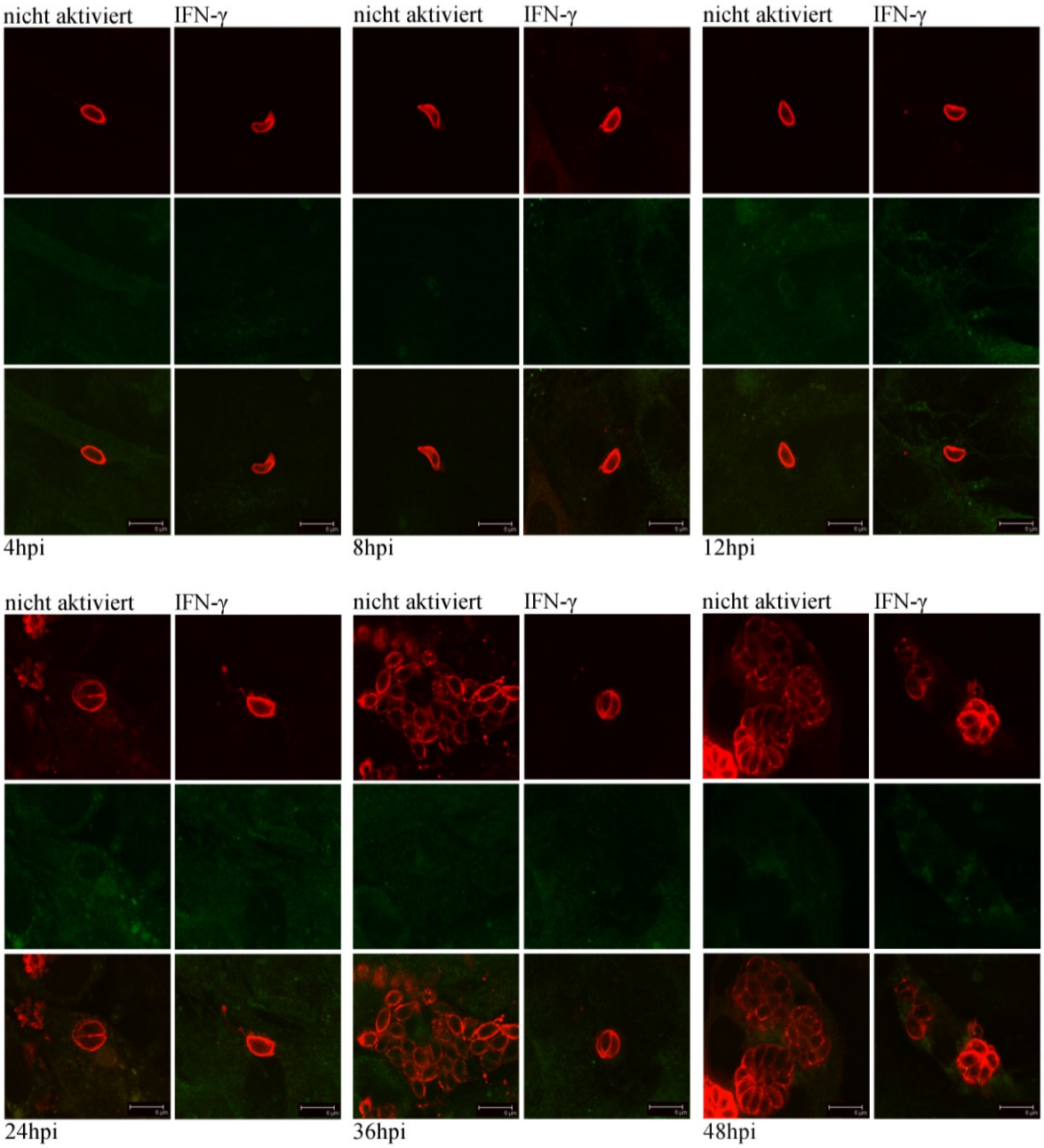


**Abb. 4.22: Lokalisation von Irga6 in *Toxoplasma*-infizierten differenzierten primären Skelettmuskelzellen ohne oder nach IFN-γ-Aktivierung.**

Differenzierte primäre SMZ wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion teilweise mit IFN-γ aktiviert. Die Zellen wurden 4, 8, 12, 24, 36 und 48 hpi fixiert und in einem Immunfluoreszentest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* (rot) und Irga6 (grün) gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte durch Laserscanmikroskopie. Zur Verdeutlichung der Lokalisation von Irga6 wurden Überlagerungsbilder des roten und grünen Kanals erstellt. Maßstab 6 µm. Bilder aus einem repräsentativen Experiment von drei.

In primären SMZ fand zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Ansammlung von Irga6 weder in nicht aktivierten noch in IFN-γ-aktivierten Zellen statt (Abb. 4.21 und Abb. 4.22).

In NIH3T3-Zellen wurde Irga6 erstmals zu 36 hpi auf der Oberfläche der PVM in IFN-γ-aktivierten Zellen nachgewiesen (Abb. 4.23). Dabei wurde Irga6 jedoch erst 48 hpi deutlich auf den PVM detektiert. Der Anteil von Irga6-positiven PVM blieb allerdings im

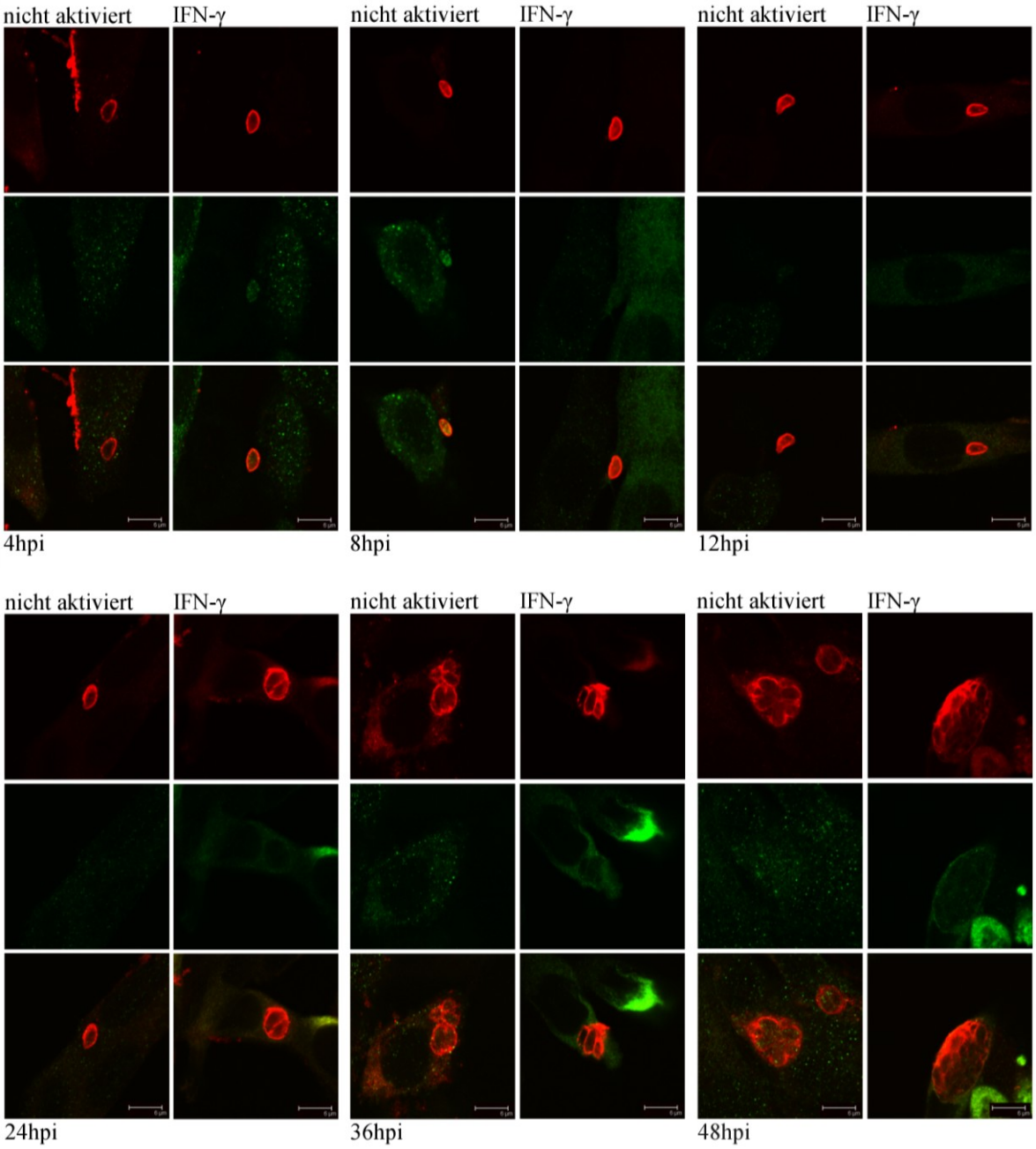


**Abb. 4.23: Lokalisation von Irga6 in *Toxoplasma*-infizierten Fibroblasten ohne oder nach IFN-γ-Aktivierung.**

NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion teilweise mit IFN-γ aktiviert. Die Zellen wurden 4, 8, 12, 24, 36 und 48 hpi fixiert und in einem Immunfluoreszentest mit Antikörpern gegen *Toxoplasma* (rot) und Irga6 (grün) gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte durch Laserscanmikroskopie. Zur Verdeutlichung der Lokalisation von Irga6 wurden Überlagerungsbilder des roten und grünen Kanals erstellt. Maßstab 6µm. Bilder aus einem repräsentativen Experiment von sechs.

Zeitverlauf mit etwa 5% gering und war so 48 hpi um etwa 30% niedriger als in aktivierten permanenten SMZ (Abb. 4.21). In nicht IFN-γ-aktivierten Fibroblasten wurde keine Assoziation von Irga6 mit der PVM nachgewiesen.

Diese Experimente konnten somit eine deutliche Anlagerung von Irga6 auf der PVM nur in differenzierten IFN-γ-aktivierten C2C12-Zellen zeigen (Abb. 4.21).

### *4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse*

Besonders in differenzierten C2C12-Zellen fand eine starke Hochregulierung der Transkription der beiden IRG-Proteine Irga6 und Irgm3 nach IFN-γ-Aktivierung statt. Eine Infektion mit *Toxoplasma* hemmte in dieser Zelllinie die Transkription von *Irga6* und *Irgm3* deutlich. In differenzierten primären SMZ sowie NIH3T3-Zellen wurde ebenfalls eine Steigerung der Transkription in IFN-γ-behandelten Zellen gefunden, diese war aber geringer als in C2C12-Zellen. Auch senkte der Parasit nicht in allen Fällen die Transkriptmenge von Irga6 und Irgm3 wie in den permanenten SMZ.
Irga6-Protein lagerte sich in differenzierten C2C12-Zellen im Verlauf der Infektion in zunehmendem Maße auf der PV-Membran ab, was sowohl in aktivierten Zellen als auch zu einem späteren Zeitpunkt in nicht aktivierten Zellen deutlich wurde. Die untersuchten IRG-Proteine könnten daher vor allem in differenzierten C2C12-Zellen eine Bedeutung für die Abwehr von *Toxoplasma* haben.

## 4.5 Egress des Parasiten aus der Wirtszelle

Nach der Disruption der PV durch IRG-Proteine liegt *Toxoplasma* frei im Zytoplasma vor. Es wurde in der Literatur einerseits beschrieben, dass *Toxoplasma* daraufhin abstarb, andere Untersuchungen beschrieben dagegen den Egress des Parasiten aus der Wirtszelle. Der Egress kann sowohl den nekrotischen Zelltod als auch das Überleben der Wirtszelle zur Folge haben (MARTENS ET AL., 2005; LING ET AL., 2006; ZHAO ET AL., 2009a, b, c).

### *4.5.1 Durch Parasiten-Egress verursachte Zytotoxizität*

Da zu einem Parasiten-Egress mit oder ohne Lyse von SMZ noch keine Daten vorlagen, wurde die Vitalität von differenzierten SMZ und Fibroblasten ohne und nach Infektion mit NTE-Toxoplasmen untersucht. Teilweise wurden die Zellen dabei zeitgleich zur Infektion zusätzlich mit IFN-γ und TNF aktiviert. Im verwendeten Test wurde die Aktivität der bei

Zelllyse freiwerdenden Lactatdehydrogenase (LDH) als Marker für die Zytotoxizität gemessen.

Die Zytotoxizität stieg in den infizierten permanenten SMZ im Zeitverlauf deutlich an (Abb. 4.24 a). Zu 4 hpi lag sie bei ca. 30%, erhöhte sich bis 48 hpi auf etwa 50% und erreichte 96 hpi dann 90%. In Fibroblasten war dieser Effekt ebenfalls vorhanden, wobei die Zytotoxizität zu den untersuchten Zeitpunkten durchschnittlich 5, 10 bzw. 20% niedriger war als in C2C12-Zellen (Abb. 4.24. b).
Bei der Untersuchung der infizierten Zellen wurde 48 hpi eine um etwa 20% erhöhte LDH-Aktivität in mit IFN-γ oder mit IFN-γ/TNF aktivierten C2C12-Zellen und in IFN-γ-aktivierten Fibroblasten gemessen. Abgesehen davon war jedoch keine deutliche Wirtszelllyse nachzuweisen, die durch die Zugabe von IFN-γ oder IFN-γ und TNF ausgelöst worden war.

Ein Vergleich der LDH-Aktivitäten von nicht aktivierten Zellen ergab 96 hpi nach Infektion mit *T. gondii* eine um 45% höhere LDH-Aktivität als in nicht infizierten Kontrollzellen (Abb. 4.25. a). Dagegen war die LDH-Aktivität in IFN-γ-aktivierten permanenten SMZ nach Infektion lediglich 20% höher als in nicht infizierten Zellen. Dies weist darauf hin, dass *Toxoplasma* zu diesem Zeitpunkt einen zytotoxischen Effekt auf die

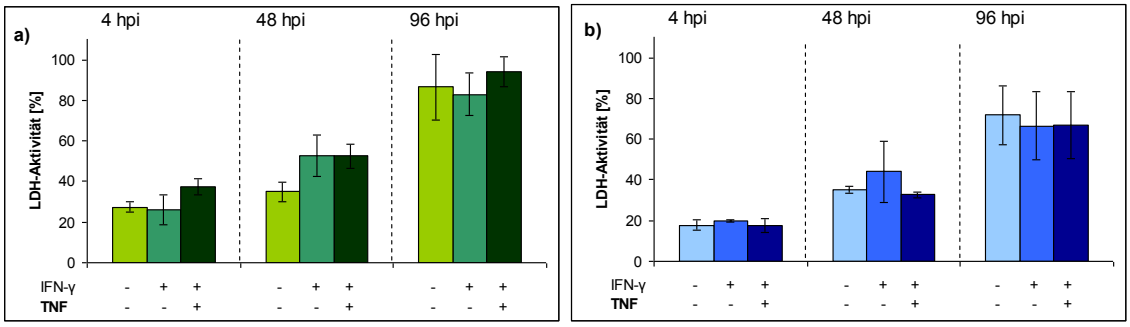


**Abb. 4.24: Zytotoxizität in *Toxoplasma*-infizierten differenzierten C2C12- (a) und NIH3T3-Zellen (b) ohne und nach Aktivierung mit IFN-γ oder IFN-γ und TNF.**
C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Differenzierte C2C12- sowie NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zum Zeitpunkt der Infektion mit IFN-γ und TNF aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurde die LDH-Aktivität als Maß für die Zytotoxizität mittels eines kolorimetrischen Tests in den Kulturüberständen bestimmt. Diese wurden zu der LDH-Aktivität in einer äquivalenten nicht infizierten vollständig lysierten Probe ins Verhältnis gesetzt. Ergebnisse aus drei Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

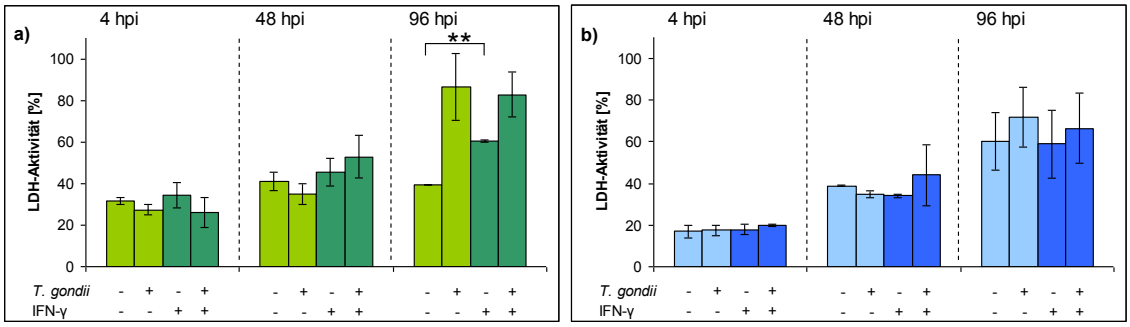


**Abb. 4.25: Zytotoxizität in nicht *Toxoplasma*-infizierten und infizierten differenzierten C2C12- (a) und NIH3T3-Zellen (b) ohne und nach Aktivierung mit IFN-γ.**

C2C12-Zellen wurden zur Differenzierung ab 24 hps in Differenzierungsmedium kultiviert. Manche der differenzierten C2C12- sowie NIH3T3-Zellen wurden mit NTE-Toxoplasmen infiziert und teilweise zum Zeitpunkt der Infektion mit IFN-γ aktiviert. 4, 48 und 96 hpi wurde die LDH-Aktivität als Maß für die Zytotoxizität mittels eines kolorimetrischen Tests in den Kulturüberständen bestimmt. Diese wurden zu der LDH-Aktivität in einer äquivalenten nicht infizierten vollständig lysierten Probe ins Verhältnis gesetzt. Ergebnisse aus drei Experimenten nach Abzug der statistischen Ausreißer mit dem Bestimmtheitsmaß $\alpha = 0{,}1$ (nach DIXON, aus: SACHS, 1984). Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

Wirtszellen hat, was durch eintretende Wirtszelllyse bei einem spontanen, d.h. IFN-γ-unabhängigen, Egress erklärbar ist. In Fibroblasten wurde eine derartig starke Steigerung der LDH-Aktivität nicht gefunden (Abb. 4.25 b). Interessanterweise zeigte IFN-γ in nicht infizierten permanenten SMZ 96 h nach Versuchsbeginn einen signifikant um 20% gesteigerten zytotoxischen Effekt. Da in *Toxoplasma*-infizierten SMZ ein solcher Unterschied nicht nachweisbar war, könnte *T. gondii* seine Wirtszelle vor Zellzerstörung durch IFN-γ schützen und somit auch das eigene Überleben sichern.

### *4.5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse*

Aktivierung von infizierten C2C12- oder NIH3T3-Zellen mit IFN-γ führte offensichtlich zu keiner durch Parasiten-Egress verursachten Zytotoxizität. Jedoch konnte gezeigt werden, dass in permanenten SMZ 96 hpi die Zytotoxizität durch die Infektion mit *T. gondii* zunahm. In Fibroblasten war dies nicht der Fall.

Außerdem wirkte eine Zugabe von IFN-γ schädlich auf nicht infizierte permanente SMZ. Da dies nicht für infizierte Muskelzellen galt, gibt dies einen Hinweis darauf, dass *Toxoplasma* den zytotoxischen Effekt von IFN-γ in permanenten SMZ ausgleichen bzw. damit interferieren kann.

# 5. Diskussion

## 5.1 Muskelzellen *in vitro* – ein Modell zur Untersuchung der Entwickung von *Toxoplasma gondii* in Skelettmuskulatur

*Toxoplasma gondii* ist ein besonders erfolgreicher Parasit, der nahezu jede kernhaltige Zelle von Säugetieren, Menschen und Vögeln infizieren kann. Neben der Übertragung von Oozysten (TENTER ET AL., 2000) spielt eine Infektion durch Gewebszysten eine bedeutende Rolle in der Epidemiologie von *T. gondii* (CHOI ET AL., 1997). Die Bildung von Gewebszysten ist von Spezies zu Spezies und auch unter den Organen in einer Spezies sehr unterschiedlich (TENTER ET AL., 2000; DUBEY & JONES, 2008). Jedoch kann der Parasit besonders effizient im Nervengewebe sowie im Muskelgewebe persistieren (DUBEY ET AL., 1998). Eine häufige Infektionsquelle des Menschen ist daher eine Übertragung von *Toxoplasma*-Gewebszysten in Muskelzellen infizierter Zwischenwirte, die durch unzureichend gegartes Fleisch erfolgt (COOK ET AL., 2000; TENTER, 2009). Von großer Bedeutung ist dabei das Fleisch infizierter Schweine, Schafe und Ziegen. Gewebszysten werden auch in Geflügel und Kaninchen gefunden, wohingegen sie in Rindern nur selten auftreten (TENTER ET AL., 2000).

Zur Prävention und Eindämmung der Übertragung von *Toxoplasma gondii* über Fleisch ist es daher von großer Wichtigkeit, die Mechanismen zu untersuchen, die zur Entwicklung, Differenzierung und zur effektiven Persistenz des Parasiten im Muskel führen. Die Haltung und Untersuchung von Nutztieren ist jedoch mit großem experimentellen Aufwand verbunden. Da die Maus ein natürlicher Zwischenwirt durch die Übertragung des Parasiten über Gewebszysten ist (*T. gondii* wird durch das Fressen der Maus von seinem Endwirt, der Katze aufgenommen), eignet sie sich gut als Modellorganismus für die Untersuchung der Entwicklung und Persistenzbildung. Außerdem bietet die Verwendung von Mäusen den Vorteil, dass Mechanismen der Immunantwort gegen *Toxoplasma in vivo* und *in vitro* in vielen Geweben bereits gut charakterisiert wurden. Für Untersuchungen sind *in-vitro*-Experimente zusätzlich ein guter komplementärer Ansatz zu Arbeiten mit Versuchstieren. Dies hilft auch dabei, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren. *In-vitro*-Untersuchungen sind außerdem von Nutzen, um Einzelfaktoren, die auf intrazelluläre Parasiten einwirken, eingehender zu untersuchen als dies *in vivo* möglich wäre. Zusätzlich können einzelne relevante Maus-spezifische Immunstimulatoren der *Toxoplasma*-Abwehr erworben und als Stimulanzien den Zellen zugegeben werden.

### *5.1.1 Primäre versus permanenten SMZ in der Untersuchung der Parasitenentwicklung*

Da ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass der Zelltyp keine besondere Relevanz für die Entwicklung und die Persistenz von *Toxoplasma gondii* hat (LINDSAY ET AL., 1991), wurden die meisten Analysen zur Gewebszystenbildung in anderen Zelllinien als Skelettmuskelzellen durchgeführt. Mit steigendem Bewusstsein, dass es sich beim Muskelgewebe um eine besondere Mikroumgebung handelt (STREILEIN, 1995; WIENDL ET AL., 2005a) wurden jedoch zunehmend Untersuchungen in Muskelzelllinien unternommen (ANDRADE ET AL., 2001; BARBOSA ET AL., 2000, 2005; FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2008, 2009a, 2009b; GUIMARÃES ET AL., 2008, 2009). Für Analysen der Bildung von *Toxoplasma*-Gewebszysten und somit auch die Etablierung der Persistenz bewährte sich dabei besonders die Verwendung von primären murinen SMZ (GUIMARÃES ET AL., 2008, 2009). Da der Parasit bevorzugt in Fibroblasten subkultiviert wird und diese bereits als Kontrollzellen für Versuche mit primären SMZ verwendet wurden (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009b), bot es sich an, NIH3T3-Fibroblasten als Kontrolle für den Vergleich mit SMZ zu verwenden.

Wie Experimente mit dem Parasiten *Trypanosoma cruzi* zeigten, können sich jedoch unterschiedliche Befunde ergeben, je nachdem, ob primäre oder etablierte Zelllinien verwendet wurden (BARBOSA, 1999). Ebenso sind *in-vitro*-Bedingungen anders als die Bedingungen *in vivo*, wo ganze Organe mit einer Mischung unterschiedlichster Zelltypen auf Parasiten reagieren. Daher war es sinnvoll für Experimente *in vitro* sowohl permanente als auch primäre SMZ zu verwenden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde neben primären murinen SMZ auch mit permanenten L6.C10-Rattenmuskelzellen gearbeitet. Die letztendlich verwendeten murinen C2C12-SMZ erwiesen sich jedoch als geeigneter für Experimente, weil sie ebenso wie die primären SMZ aus der Maus stammten. Außerdem waren sie besser als die L6C10-Rattenzellen charakterisiert (DELGADO ET AL., 2003; BURATTINI ET AL., 2004) und *in vitro* sehr gut differenzierbar.

Das Arbeiten mit permanenten sowie primären SMZ bot für beide Zelllinien Vor- und Nachteile. So war ein deutlicher Vorteil der C2C12-Zellen, dass sie als etablierte Zelllinie in Kultur als Myoblasten gehalten und in ausreichenden Mengen vermehrt werden konnten. Außerdem ist diese Zelllinie gut charakterisiert (BURATTINI ET AL., 2004; DELGADO ET AL., 2003) und *in vitro* erfolgreich zu Myotuben differenzierbar (BURATTINI ET AL., 2004). Dies war wichtig, um mit den Analysen den *in-vivo*-Gegebenheiten

möglichst nahe zu kommen. Die permanenten SMZ konnten allerdings als etablierte Zelllinie in untersuchten Funktionen abweichend von natürlichen Vorgängen im Muskelgewebe sein, da sie bereits über lange Zeiträume *ex vivo* gehalten und für eine dauerhafte Vermehrung immortalisiert wurden. Die primären SMZ waren in der Gewinnung aufwändiger und nicht permanent in Kultur zu halten, dafür aber als *ex-vivo*-Modell eher den Verhältnissen *in vivo* entsprechend. Die Verwendung beider Zelllinien in den Experimenten sollte helfen, Fehler zu minimieren, die durch die oben genannten Unterschiede entstanden sein konnten.

### *5.1.2 Bestätigung der Eignung der verwendeten SMZ*

Beide SMZ-Linien wurden jeweils frisch für die Experimente differenziert. Die erfolgreiche Differenzierung wurde in den verwendeten SMZ durch verschiedene Versuchsansätze bestätigt. So wurde in den permanenten SMZ eine deutlich erhöhte Transkriptmenge von MyoD nachgewiesen. Dieser Transkriptionsfaktor ist wie Myf5 in der frühen Phase der Muskelentwicklung in den determinierten Myoblasten an der Regulation weiterer muskelspezifischer Gene, der Myoblasten-Gene, beteiligt (DEDIEU ET AL., 2002; MONTARRAS ET AL., 1991). Diese induzieren die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben. MyoD wird vor allem in den schnellen Muskelfasern exprimiert und unterliegt einer gegenseitigen Negativregulierung mit Myf5, so dass nur einer der beiden Faktoren aktiv bleibt (DEDIEU ET AL., 2002; YOSHIDA ET AL., 1998; HUGHES ET AL., 1993; HUGHES, 1993). Dies wurde auch in den permanenten SMZ nachgewiesen, wo eine starke Erhöhung der Transkription von *MyoD*, aber nur eine Verdopplung der Transkription von *Myf5* beobachtet wurde.
Myogenin, ein weiterer der untersuchten Transkriptionsfaktoren, wird zu Beginn der terminalen Differenzierung exprimiert, sobald die Zellen den Zellzyklus verlassen (DELGADO ET AL., 2003; YOSHIDA ET AL., 1998; ZHANG ET AL., 1999). Der Faktor ist ein Marker für differenzierende Muskelzellen und für eine normale Muskelentwicklung essentiell (DEDIEU ET AL., 2002; MONTARRAS ET AL., 1991; HASTY ET AL., 1993; NABESHIMA ET AL., 1993). In den C2C12-Zellen wurde ebenfalls eine gesteigerte Transkription von *Myogenin* gemessen. Sie erreichte im Verlauf der Differenzierung bei 216 h nach Aussäen (hps) der Zellen ihr Maximum und sank dann wieder leicht ab, was zeigte, dass die Zellen nun überwiegend differenziert waren und nicht mehr proliferierten.

Myogenin und MyoD wurden auch auf Proteinebene in permanenten SMZ, aber nicht in

den Kontroll-Fibroblasten nachgewiesen. Dabei war eine Verringerung der Proteinmenge von Myogenin ebenfalls ab 216 hps festzustellen. Dies korrelierte mit der Analyse der Transkription von Myogenin und Untersuchungen, die zeigten, dass die Myogenin-Aktivität in späteren Entwicklungsstadien wieder abnimmt (DELGADO ET AL., 2003; DEDIEU ET AL., 2002; OLSON & KLEIN, 1994). Daraufhin wird sie durch die Aktivität anderer Faktoren wie beispielsweise MRF4 abgelöst, die die muskel-spezifische Genexpression in der Myogenese aufrechterhalten (PERDIGUERO ET AL., 2009; CARVAJAL & RIGBY, 2010; BISMUTH & RELAIX, 2010).
Sowohl MyoD als auch Myogenin wurden in permanenten sowie primären SMZ in einem Immunfluoreszenztest nachgewiesen und waren erwartungsgemäß als Transkriptionsfaktor in den Zellkernen lokalisiert. Zusätzlich wurde in den permanenten SMZ das Motorprotein Myosin (Abschnitt schwere Kette) nachgewiesen, das im Muskel mit Aktin interagiert, um die Kraft zur Kontraktion zu generieren (RANATUNGA, 2010; WIDENER & CHENEY, 1997). Ebenfalls fand ein erfolgreicher Nachweis des muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteins Desmin, das den kontraktilen Apparat mit dem subsarkolemmalen Zytoskelett, Nukleus und anderen Organellen verbindet, in dem primären SMZ statt (TANG, 2008; SMALL & GIMONA, 1998).

Auf diese Weise wurde eine erfolgreiche *in-vitro*-Differenzierung der SMZ bestätigt. Dies erfüllte die grundlegende Vorraussetzung für das Arbeiten mit diesen Zellen als Modell für die Entwicklung und Persistenz von *T. gondii* in Skelettmuskelzellen,

## 5.2 Infektabwehr in Skelettmuskelzellen

Obwohl das Muskelgewebe einen großen Teil vieler mehrzelliger Tiere ausmacht, findet man dort relativ wenige unterschiedliche Parasiten. Da im Muskel ein hoher Energieverbrauch bei der Kontraktion stattfindet, sind darin auch viele Nährstoffe wie z.B. Glukose enthalten, die als Nährstoffgrundlage für Parasiten dienen könnten. Jedoch ist der Aufbau von Muskelgewebe sehr komplex und eine Besiedelung durch Parasiten erfordert oft ein hohes Maß an biochemischen und strukturellen Modifikationen, um sich dort erfolgreich entwickeln zu können (STEWART & GIANNINI, 1982).
Bei einer Infektion des Muskels können professionelle Antigen-präsentierende Zellen in das Gewebe einwandern. Allerdings ist der Muskel nicht nur passiv auf die Wirkung von hematopoietischen Zellen angewiesen, sondern in einem gewissen Rahmen selber immunkompetent und nimmt aktiv an Immunreaktionen teil. Dies geschieht beispielsweise

durch die Expression von MHC Molekülen der Klasse I und II, die dazu dienen, Proteinfragmente von Pathogenen auf der Zelloberfläche zu präsentieren, woraufhin die Zellen von T-Lymphozyten erkannt und aktiviert oder eliminiert werden (WIENDL ET AL., 2005a, 2005b; HOHLFELD & ENGEL, 1994). Bereits Myoblasten, die frühen Muskelzellen, können MHC Moleküle bilden und verschiedene Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle sezernieren (NAGARAJU, 2001; NAGARAJU ET AL., 1998; FIGARELLA-BRANGER ET. AL., 1999). Die durch MHC Klasse I Moleküle präsentierten Antigene werden im Muskel von $CD8^+$ Zellen erkannt (HOHLFELD & ENGEL, 1991), während auch spezifische $CD4^+$ Zellen sind an der Erkennung von Pathogen-Fragmenten in verbindung mit MHC II Molekülen beteiligt sind (GOEBELS ET AL., 1996; WARRENS ET AL., 1994; GARLEPP ET AL., 1995). Rezeptoren für das Zytokin Interferon-γ (IFN-γ) wurden auf Myoblasten bereits beschrieben (CHENG ET AL., 2008). Diese Zellen reagieren auf IFN-γ-Stimulation durch eine erhöhte Antigen-Prozessierung (KLOETZEL & OSSENDORP, 2004). Bei Immunreaktionen innerhalb des Muskels werden sowohl immunprotektive als auch immunsuppressive Moleküle sezerniert, damit keine Gewebszerstörung durch eine übersteigerte Immunantwort entsteht (WIENDL ET AL., 2005b). Diese ko-stimulatorischen Moleküle werden teilweise durch IFN-γ und TNF (Tumor Nekrose Faktor) induziert (WIENDL ET AL., 2005a). Ebenfalls wurde beschrieben, dass SMZ *in vitro* endogenes IFN-γ produzieren können (CHENG ET AL., 2008).

Die antiparasitären Abwehrmechanismen im Muskel sind komplex, wobei es Parallelen wie die Aktivierung von bestimmten T-Lymphozyten-Populationen und/oder die Sekretion von Zytokinen wie Interleukinen und IFN-γ bei so unterschiedlichen Parasiten wie Apikomplexa, Flagellaten oder Nematoden gibt. Da der Muskel jedoch kein leicht handhabbares Forschungsobjekt ist, wurden die Immunreaktionen der myotropen Parasiten in vielen Fällen in anderen Geweben als dem Muskel analysiert. Jedoch soll hier kurz beispielhaft dargestellt werden, was über die Immunabwehr mancher Parasiten im Muskel bekannt ist.

### *5.2.1 Abwehr von Parasiten, die im Muskel auftreten*

a) *Trypanosoma cruzi* – ein Parasit in Herz- und Skelettmuskel

*Trypanosoma cruzi* ist ein parasitärer Flagellat, der humanpathogen ist. Er persisitiert in Skelett- und Herzmuskel, aber auch in der glatten Muskulatur (JONES ET AL., 1993; VAGO ET AL., 1996). Der Parasit bildet dort Pseudozysten und ruft ähnlich wie *Toxoplasma gondii* eine Immunantwort durch $CD4^+$ und für ihn spezifische $CD8^+$ Zellen, aber auch IL-2 und

IL-4 hervor (TEIXEIRA ET AL., 2002). *T. cruzi* exprimiert ähnliche Antigene wie die Wirtszellen selber, was dazu führt, dass durch Kreuzreaktionen T- und B-Zellen auch wirtseigene Antigene erkennen und schädigen können (Autoimmunerkrankung) (MARIN-NETO ET AL., 2007). In Ratten ist die Schwere einer hervorgerufenen Myositis abhängig vom Trypanosomen Stamm (FRANCO ET AL., 2003). Auch bei diesem Parasiten rupturieren in der chronischen Phase der Infektion ähnlich wie bei *T. gondii* gelegentlich Pseudozysten und setzen Parasiten frei. Dies regt Makrophagen und Dendritische Zellen an, die *Trypanosoma* phagozytieren und IL-12 sowie IFN-γ, aber auch TNF als Immunantwort produzieren (RIBEIRAO ET AL., 2000; ABEL ET AL., 2001). Dabei wird auch die Zahl der $CD8^+$ Zellen erhöht. Ebenfalls ist Stickstoffmonoxid (NO) aus Makrophagen an der Abwehr des Parasiten beteiligt (VESPA ET AL., 1994; ALIBERTI ET AL., 1999a, 1999b). Die durch Ruptur der Pseudozysten ausgelöste Degeneration der Muskelfaser wird durch Aktivierung der Satellitenzellen, den frühen kommitierten Muskelzellen, ausgeglichen und dabei z.B. MyoD produziert (MALDONADO ET AL., 2004).

b) *Neospora caninum* – eine Verwandter von *Toxoplasma*

*Neospora caninum* gehört ebenso wie *Toxoplasma gondii* zu der Familie der Apikomplexa und ist eng mit ihm verwandt. *N. caninums* Lebenszyklus weist deutliche Parallelen zu dem von *T. gondii* auf, wobei allerdings sein Endwirt nicht die Katze, sondern der Hund ist (REICHEL ET AL., 2007). Über die Immunreaktionen des Wirtes auf Neospora ist bislang wenig bekannt, was womöglich daran liegt, dass noch keine Infektion des Menschen mit diesem Parasiten nachgewiesen wurde (OMATA ET AL., 2005; DUBEY, 2003). So wird oftmals versucht, die Immunreaktionen gegen *T. gondii* auf *Neospora* zu übertragen. Es wurde bisher immerhin gezeigt, dass *Neospora* im Muskel von experimentell infizierten Hunden die Expression von MHC Molekülen der Klassen I und II auslöst (PACIELLO ET AL., 2004).

c) *Trichinella spiralis* – ein intrazellulärer Nematode in Muskelzellen

*Trichinella spiralis* ist ein Nematode, der ein breites Spektrum an Wirten infizieren kann. Da alle Entwicklungsstadien des Parasiten in einem Wirt durchlaufen werden können, ist der Endwirt zugleich Zwischenwirt. Die Larven von *T. spiralis* invadieren und infizieren Myotuben während der Muskelphase der Infektion (FABRE ET AL., 2009). Dies hat dramatische Änderungen der Gentranskription und Morphologie des Myotubus zur Folge, der daraufhin sogar wieder in den Zellzyklus eintritt (FABRE ET AL., 2009). Dabei wird der Myotubus zusammen mit umliegenden Satellitenzellen in die so genannte Ammenzelle umgewandelt (DESPOMMIER, 1998; WU ET AL., 2001, 2008). Innerhalb der

zytoplasmatischen Region des Ammenzellkomplexes sind ebenfalls $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen lokalisiert, die den Parasiten dort aber nicht schädigen (LI & KO, 2001). Sie scheiden IL-10 aus und verhindern so möglicherweise die inflammatorische Antwort auf den Parasiten (BRUSCHI & CHIUMIENTO, 2001; BEITING ET AL., 2007). Die Mechanismen, die zur Bildung der Ammenzelle führen ähneln denen, die bei einer mechanischen Verletzung des Muskels ablaufen und führen dazu, dass der Parasit bei der Reparatur des Muskels quasi mit eingebaut wird (WU ET AL., 2008; STEWART & READ, 1973). Sowohl Skelettmuskel als auch Ammenzelle sind reich an Heparansulfat, was die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF stimuliert (BEITING ET AL., 2006). Dies wird vom Muskel mit eine erhöhten Produktion anti-inflammatorischer Zytokine beantwortet. So werden bei einer *Trichinella*-Infektion in hohem Maß IL-10 und TGF-β produziert (BEITING ET AL., 2007). Dabei hemmt IL-10 die Produktion von IFN-γ und TGF-β verhindert die Produktion von zytotoxischem NO durch die Makrophagen (BEITING ET AL., 2007; VINEY ET AL., 2005), was die Persistenz von *T. spiralis* im Muskel unterstützt.

Diesen Parasiten ist gemein, dass an ihrer Abwehr IFN-γ beteiligt ist. Entweder wurde eine erhöhte Produktion des Zytokins direkt nachgewiesen, es erfolgte eine Aktivierung IFN-γ-produzierender Zellpopulationen wie $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen oder es sind Mechanismen wie die Expression von MHC Molekülen beteiligt, die durch IFN-γ induziert werden. Dies betont die Wichtigkeit des Zytokins für die Parasitenabwehr im Muskel. IFN-γ wurde ebenfalls eine Schlüsselrolle in der protektiven Immunität gegen *Toxoplasma* nachgewiesen (ALIBERTI, 2005).

### *5.2.2* Toxoplasma gondii *in Skelettmuskelzellen*

Obwohl *Toxoplasma gondii* bevorzugt im Muskel persistiert, ist bisher relativ wenig über seine dortige Entwicklung, Differenzierung und Persistenz bekannt. Jedoch werden inzwischen verstärkt Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt (ANDRADE ET AL., 2001; BARBOSA ET AL., 2000, 2005). Frühere Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass sich murine Skelettmuskelzellen gut für das Studium der Zystenbildung von *T. gondii in vitro* eignen (GUIMARÃES ET AL., 2008, 2009). Ebenso wurde herausgefunden, dass in primären Muskelzellen eine spontane Konversion vom Stadium der schnell replizierenden Tachyzoiten zum ruhenden Bradyzoitenstadium stattfindet, die den ersten Schritt zur Bildung von Gewebszysten darstellt (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2008, 2009a, 2009b; DUBEY ET AL., 1998). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde *Toxoplasma* in SMZ

erstmals Zytokin-bedingtem Stress ausgesetzt, wie er bereits in der Literatur in der natürlichen Immunantwort auf den Parasiten beschrieben wurde. Dies umfasste die Aktivierung der Wirtszellen mit den Zytokinen IFN-γ und TNF (MILLER ET AL., 2008; FILISETTI & CANDOLFI, 2004; HUNTER ET AL., 1994; JOHNSON, 1992a).

### *5.2.3 IFN-γ führt in Muskelzellen zur Abwehr von* Toxoplasma gondii

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IFN-γ einen deutlich hemmenden Effekt auf das Toxoplasmen-Wachstum und die Parasitenreplikation in SMZ hatte. Außerdem waren die Infektionsraten des Parasiten nach IFN-γ-Aktivierung sowohl in den primären als besonders auch in den permanenten SMZ deutlich gesenkt. In Fibroblasten hingegen wurden die Parasitenreplikation und das Wachstum nicht wesentlich durch die Zugabe von Zytokinen beeinflusst. Auch auf die Infektionsraten hatte IFN-γ in Fibroblasten nur einen geringen Effekt. In IFN-γ-aktivierten NIH3T3-Zellen wurde sogar deutlich mehr *Toxoplasma*-Protein nachgewiesen als in nicht aktivierten Zellen.

IFN-γ gilt als Hauptmediator in der Abwehr von *Toxoplasma gondii* (MILLER ET AL., 2008; HUNTER ET AL., 1994; SUZUKI ET AL., 1988). *In vivo* wird IFN-γ von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK) produziert (COMMINS ET AL., 2010; GESSANI & BELARDELLI, 1998). So hängt das längerfristige Überleben von *Toxoplasma*-infizierten Mäusen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten (GAZZINELLI ET AL., 1991,1992), aber in der frühen Phase auch von den natürlichen Killer-Zellen (NK) ab, da infizierte SCID-Mäuse (mit T-Lymphozytenmangel) eine Infektion zwei Wochen oder länger überleben (JOHNSON, 1992b). Vor allem hematopoietische Zellen sind für eine Aktivierung mit IFN-γ und TNF empfänglich, aber auch nicht-hematopoietische Zellen können auf diese Zytokine ansprechen (YAP & SHER, 1999).

Tatsächlich gehören Muskelzellen zu den nicht-hematopoietischen Zelltypen, die durch Zytokine stimuliert werden. Sie können sowohl durch IFN-γ als auch TNF zur Expression von MHC Klasse I und II Molekülen angeregt werden (WIENDL ET AL., 2000; MICHAELIS ET AL., 1993). Zusätzlich können Muskelzellen TNF nach Stimulation der Zellen mit Zytokinen oder LPS sogar selber produzieren und ausscheiden (WIENDL ET AL., 2005b). Eine endogene IFN-γ-Produktion in undifferenzierten C2C12-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (CHENG ET AL., 2008), jedoch nimmt sie im Verlauf der Differenzierung deutlich ab. Der IFN-γ-Rezeptor wird dagegen auf diesen Zellen konstitutiv exprimiert und

seine Blockierung führt zu einer reduzierten Fusion der Myoblasten zu Myotuben (CHENG ET AL., 2008), was eine Funktion von IFN-γ in der Muskeldifferenzierung unterstreicht.
In dieser Arbeit wurde eine IFN-γ-induzierte Verringerung des Toxoplasmen-Wachstums besonders in den permanenten, aber auch in den primären SMZ detektiert. Dies zeigte, dass auch die verwendeten SMZ in der Zellkultur empfänglich für das Zytokin waren.

*In vitro* ist die replikationshemmende Wirkung von IFN-γ auf *Toxoplasma* abhängig vom Zelltyp und dem infizierten Organismus, aber auch vom Parasitenstamm. Das Wachstum des Parasiten ist beispielsweise in Zellen des Nervensystems wie humanen primären Mikroglia (CHAO ET AL., 1993, 1994; HALONEN ET AL., 2001) und primären murinen Astrozyten durch IFN-γ gehemmt (HALONEN ET AL., 1998). Dies gilt auch in Zellen ganz anderer Gewebe wie alveolären Makrophagen der Ratte (BADGER ET AL., 1987) oder humanen Zellen des intestinalen Epithels (DIMIER ET AL., 1997) und des retinalen Pigmentepithels (NAGINENI ET AL., 1996). Dagegen wurde in primären Mikroglia der Ratte eine Hemmung der Replikation von *Toxoplasma* gefunden, die von IFN-γ unabhängig war (LÜDER ET AL., 1999).
Die Wachstumsversuche in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von transgenen Typ I-Parasiten (RH-Stamm) durch einen *LacZ*-Reporterassay durchgeführt, wohingegen in anderen Versuchen weniger virulente Typ II-Toxoplasmen (NTE-Stamm) verwendet wurden. Die RH-Parasiten wurden wegen ihres Transgens für den Reporter-Wachstumsassay benötigt, konvertieren als hoch-virulente Parasiten jedoch in geringeren Raten als die weniger virulenten Typ II-Parasiten (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009a; RADKE ET AL., 2005; DECHAMPS ET AL., 1997; BOHNE ET AL., 1994; MCHUGH ET AL., 1994). Für Versuche bezüglich der Persistenz des Parasiten eigneten sich NTE-Toxoplasmen daher besser. Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass die antiparasitäre Wirkung von IFN-γ ebenfalls für die NTE-Toxoplasmen in Bezug auf die Infektionsraten und die Replikation des Parasiten wiederum besonders in SMZ galten. Ebenso wurde das verringerte Wachstum für die NTE-Toxoplasmen durch eine verringerte *Toxoplasma*-Proteinexpression im Westernblot nachgewiesen. Daher war davon auszugehen, dass in den unternommenen Experimenten der Toxoplasmenstamm wenig Einfluss auf die generelle Empfänglichkeit für die IFN-γ-Stimulation von SMZ hatte.

Warum SMZ sensitiver für die Stimulation mit IFN-γ als Fibroblasten sind, ist bisher nicht bekannt. Die stärkere antiparasitäre Wirkung von IFN-γ in SMZ könnte auf eine höhere

Oberflächendichte des IFN-γ-Rezeptors auf SMZ in Vergleich zu Fibroblasten zurückzuführen sein (CHENG ET AL., 2008; BOEHM ET AL., 1997). Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass bereits eine Hemmung des Parasiten-Wachstums in permanenten SMZ gezeigt wurde, wenn nur geringe IFN-γ-Dosen zu den SMZ gegeben wurden. Dies wurde in NIH3T3-Fibroblasten nicht gezeigt, und könnte darauf zurückzuführen sein, dass auf diesen Zellen weniger oder IFN-γ-insensitivere Rezeptoren vorhanden waren. Da IFN-γ in der Regeneration von Muskel nach Verletzung eine Rolle spielt (CHENG ET AL., 2008) könnten SMZ auch besonders sensitiv auf das Zytokin reagieren. Weil *Toxoplasma* Wirtszellen bei unzureichender Immunabwehr in der akuten Phase, aber auch bei der gelegentlichen Ruptur in der chronischen Phase lysiert, könnte der Muskel darauf wie auf eine Verletzung reagieren. Zudem wurde gezeigt, dass die Regulation des Muskelwachstums als Ausgleich von Verletzungen durch Pathogen-assoziierte Moleküle stimuliert werden kann (FROST & LANG 2008).

Die permanenten SMZ schienen effizienter in der IFN-γ-vermittelte Abwehr des Parasiten zu sein als die primären SMZ. Das könnte daran liegen, dass bei der Isolation der primären Zellen unfreiwillig andere Zelltypen wie Fibroblasten eingeschleppt wurden, die anders als Muskelzellen reagieren und das Gesamtergebnis beeinträchtigen. Ebenso könnte sich der Unterschied daraus ergeben, dass es natürliche Schwankungen zwischen der Verteilung der IFN-γ Rezeptoren in verschiedenen Maus-Linien gibt (129 ReJ bei den permanenten und NMRI bei den primären Zellen), die hier zum Tragen kommen. Alternativ handelt sich um einen Unterschied zwischen permanenten immortalisierten und primären Zelllinien. C2C12-Zellen wurden ursprünglich aus Mäusen mit progressiver Dystrophie isoliert (YAFFE & SAXEL, 1977), was ebenfalls Unterschiede der IFN-γ-Rezeptor-Verteilung erklären könnte, da die Ursprungs-Mäuse nicht dem Wildtyp entsprachen.

Eine erhöhte Effektivität der SMZ zur IFN-γ-vermittelten Parasiten-Abwehr erklärt auch die zu 48 und 96 hpi durch IFN-γ gesenkten Infektionsraten, die nicht im gleichen Maße in Fibroblasten nachgwiesen wurden. Die ähnlichen Infektionsraten in allen verwendeten Zelllinien mit und ohne Aktivierung durch Zytokine 4 hpi zeigte eine gleichmäßige Invasion der Zellen nach der Zugabe der Toxoplasmen, die unabhängig von der Zugabe von Zytokinen war. Die späteren Unterschiede ergaben sich daher entweder durch eine erfolgreiche Vernichtung des Parasiten im Inneren der Wirtszelle oder durch eine IFN-γ-induzierte Parasitostase, die *Toxoplasma* so behindert, dass es nicht den üblichen lytischen Zyklus durchlaufen und neue Zellen infizieren konnte. Für solch eine Parasitostase sprachen auch die durch IFN-γ beeinträchtigten Replikationsraten.

Abgesehen von einer erhöhten Anzahl von IFN-γ-Rezeptoren auf der Oberfläche von SMZ könnten diese sensitiver für das Zytokin sein als Fibroblasten, da das Zytokin auch in der Regeneration des Muskels benötigt wird (CHENG ET AL., 2008). Zur näheren Untersuchung war es daher wichtig, die bekannten IFN-γ-induzierten intrazellulären Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* eingehender in SMZ zu studieren.

Diese Experimente bestätigten *in vitro* einen antiparasitären Effekt von IFN-γ auf *T. gondii* in SMZ, wie er auch in der systemischen Immunantwort *in vivo* beschrieben wurde (FILISETTI & CANDOLFI, 2004; SUZUKI ET AL., 1993; SUZUKI & REMINGTON, 1993; MCCABE ET AL., 1984). Daher können die *in-vitro*-Analysen mit SMZ als geeignet für Studien der Abwehr des Parasiten im Muskel angesehen werden.

### *5.2.4 Eine synergistische Wirkung von TNF zu IFN-γ wurde nur in permanenten SMZ durch eine geringe Wachstumshemmung von* T. gondii *gezeigt*

Neben IFN-γ wurden die Wirtszellen in dieser Arbeit auch mit TNF aktiviert. TNF ist ein pyrogener Faktor und induziert die Sekretion von Proteinen der akuten proinflammatorsichen Phase (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010). Der Faktor kann in Muskelzellen Makroautophagie induzieren und die Expression von MHC Molekülen regulieren (KELLER ET AL., 2011). Zudem kann TNF in Synergie mit IFN-γ die iNOS-Expression und somit die NO-Produktion in Parasiten-infizierten Wirten stimulieren (LYONS, 1995; TACHADO ET AL., 1997). Rezeptoren für TNF gibt es nahezu auf jeder Zellart außer auf Erythrozyten (HOHMANN ET AL., 1989). Aktivierung von TNF-Rezeptoren führt unter anderem zu Apoptose, Zytotoxizität und Immunmodulation (DEALTRY ET AL., 1987; ROBAYE ET AL., 1991; AGGARWAL ET AL., 1996) und kann eine immunpathologische Antwort induzieren. TNF kann in SMZ aber auch physiologisch wirken und die Differenzierung von Myoblasten inhibieren (VASSALLI, 1992; PILLAI ET AL., 1989). Außerdem wurde gezeigt, dass TNF sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase einer Toxoplasmose wichtig für die Prävention einer durch *Toxoplasma* ausgelösten Enzephalitis ist (SCHLÜTER ET AL., 2003; YAP ET AL., 1998). Durch LPS induziertes TNF kann zusätzlich in Synergie mit niedrigen IFN-γ-Konzentrationen die Stadienkonversion von *T. gondii* zu Bradyzoiten auslösen (BOHNE ET AL., 1994).

TNF konnte in dieser Arbeit nur in permanenten SMZ ein geringer synergistischer Effekt zu IFN-γ nachgewiesen werden. So war das Parasitenwachstum in permanenten SMZ, die zusätzlich zu IFN-γ mit TNF aktiviert waren, im Vergleich zu nur mit IFN-γ-aktivierten

permanenten SMZ nochmals leicht gesenkt. Da ein solcher Effekt in primären SMZ und Fibroblasten nicht beobachtet wurde und in SMZ und Fibroblasten kein Effekt auf die Parasitenreplikation und die Infektionsraten detektiert wurde, ist eine synergistische Wirkung von TNF zu IFN-γ bei der Parasitenabwehr *in vivo* fraglich.

### *5.2.5 Einfluss von IFN-γ und TNF auf die Stadienkonversion zu Bradyzoiten in SMZ*

Die Stadienkonversion von den schnell replizierenden *Toxoplasma*-Tachyzoiten zu den weitgehend Stoffwechsel- und Replikations-inaktiven Bradyzoiten stellt den ersten Schritt zur Etablierung einer Persistenz des Parasiten in den Gewebszysten dar (GUIMARÃES ET AL., 2009; DZIERZINSKI ET AL., 2004; FERGUSON, 2004; DUBEY, 1998a). Eine bevorzugte Persistenz von *T. gondii* findet neben Nervengewebe vor allem in Muskelgewebe statt (ALIBERTI, 2005). Ebenso ist die Übertragung des Parasiten besonders durch die Aufnahme von Gewebszysten in unzureichend gegartem Muskelfleisch gegeben (COOK ET AL., 2000; DZIERZINSKI ET AL., 2004; FERGUSON, 2004; TENTER, 2000; TENTER ET AL., 2009). Daher war zu erwarten, dass der Parasit besonders in Muskelzellen in das Bradyzoiten-Stadium konvertiert. Eine gegenüber Fibroblasten beschleunigte spontane Konversion wurde bereits in primären SMZ gezeigt (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009b). Dem könnten auch eine höhere Dichte von Zytokin-Rezeptoren auf SMZ oder eine endogene Zytokin-Produktion zugrunde liegen (CHENG ET AL., 2008). Endogenes IFN-γ wird zwar vor allem in undifferenzierten SMZ produziert (CHENG ET AL., 2008), jedoch waren die SMZ in Kultur in den hier dargestellten Experimenten nicht lange differenziert, so dass möglicherweise noch eine ausreichende endogene Zytokin-Produktion gegeben war.

In dieser Arbeit waren die Stadienkonversionsraten von Tachyzoiten zu Bradyzoiten durch die Aktivierung der SMZ und Fibroblasten mit IFN-γ alleine deutlich gesenkt. Dies könnte wiederum auf eine IFN-γ-induzierte Parasitostase zurückzuführen sein, da die Replikationsfähigkeit eine Vorraussetzung dafür ist, dass der Parasit zum Bradyzoiten konvertieren kann (BOHNE ET AL., 1994). Im Gegensatz dazu steigerte TNF die durch IFN-γ verringerten Konversionsraten in den permanenten Zelllinien leicht. Dies deutete darauf hin, dass TNF im Gegensatz zu IFN-γ in SMZ die Stadienkonversion zu Bradyzoiten induzierte und so dem Konversions-hemmenden Effekt von IFN-γ entgegen wirkte. Dies stimmt mit Untersuchungen überein, in denen gezeigt wurde, dass IFN-γ alleine keine Stadienkonversion in humanen Vorhaut-Fibroblasten auslösen kann (WEISS ET AL., 1995), jedoch in geringen Konzentrationen in Synergie mit TNF in murinen

Makrophagen die Konversion zu Bradyzoiten induziert (BOHNE ET AL., 1994). Offensichtlich konnte TNF also in SMZ die Stadienkonversion bei einigen Parasiten auslösen, die nicht vollkommen durch IFN-γ gehemmt waren. Da eine spontane Stadienkonversion in primären SMZ schneller abläuft als in Fibroblasten (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2009b) könnte es sein, dass SMZ auch *in vitro* ohne Stimulation endogenes TNF produzieren (WIENDL ET AL., 2005b).

## 5.3 IFN-γ-regulierte antiparasitäre Effektormechanismen

In folgenden Experimenten wurde auf die Untersuchung einiger der durch IFN-γ induzierten intrazellulären Abwehrmechanismen gegen *Toxoplasma gondii* fokussiert. Dies umfasste die Abwehr des Parasiten durch die Produktion von reaktivem Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS), die potentielle Auflösung der parasitophoren Vakuole durch spezielle GTPasen (IRG-Proteine) und den IFN-γ-ausgelösten Egress des Parasiten, der mitunter mit dem nekrotischen Tod der Wirtszelle verbunden ist.

### *5.3.1 Stickstoffmonoxid ist an der Abwehr von* T. gondii *in SMZ beteiligt*

Obwohl sich Pathogene wie Bakterien, Pilze und Parasiten in vielen physiologischen und morphologischen Eigenschaften und der hervorgerufenen Immunantwort oftmals stark unterscheiden, gehört die Produktion von NO zu den häufigen Abwehrmechanismen vor allem gegen intrazelluläre Infektionserreger.

NO wird durch drei verschiedene Enzyme im Säuger produziert. Die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS) wird in Neuronen exprimiert und ist dort an der Signaltransduktion durch sekundäre Botenstoffe beteiligt (BREDT & SNYDER, 1994; CORK ET AL., 1998; NOZAKI ET AL., 1993). Außerdem kommt sie konstitutiv in nicht-neuronalen Zelltypen wie Herz- und Skelettmyozyten vor (XU ET AL., 1999; KOBZIK ET AL., 1994) und ist dort an der Muskelkontraktion (STAMLER & MEISSNER, 2001) sowie der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum beteiligt (EU ET AL., 2000).

Die endotheliale NOS (eNOS) wird vor allem in vaskulärem Endothel konstitutiv exprimiert, aber auch in einer Reihe anderer Zelltypen (LI ET AL., 2002).

Während einer Infektion wird NO verstärkt durch die induzierbare NOS (iNOS) produziert, welche in nahezu allen Zellen induziert werden kann (FÖRSTERMANN ET AL., 1995). NO kann die Stadienkonversion von *T. gondii* vom schnell replizierenden Tachyzoiten zum stoffwechselinaktiven und potentiell persistierenden Bradyzoiten als

ersten Schritt zur Gewebszystenbildung und Persistenz induzieren (SKARIAH ET AL., 2010; IBRAHIM ET AL., 2009; BOHNE ET AL., 1999, 1994). Dabei wirkt es auf Enzyme mit Eisen-Schwefel-Zentren, die in der Atmungskette eine Rolle spielen (FANG, 2004; DE GROOTE & FANG, 1995). Auch in Wirtszellen mit defekter mitochondrialer Atmungskette wird die Expression von Bradyzoiten-Antigenen induziert (BOHNE ET AL., 1994).
Wie zuvor erwähnt, kommt das Enzym nNOS, das ebenfalls NO produziert, konstitutiv in Neuronen (BREDT & SNYDER, 1994; CORK ET AL., 1998), aber auch in Myozyten vor (XU ET AL., 1999; KOBZIK ET AL., 1994), also besonders in den Geweben, in denen *T. gondii* bevorzugt persistiert (DUBEY ET AL., 1998). Dies könnte durch die Auslösung der Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten ein Grund für die Etablierung des Parasiten besonders in diesen Geweben sein.
Die Expression von iNOS wird durch verschiedene proinflammatorische Faktoren wie IFN-γ, TNF (YAP ET AL., 1998), IL-1β und Pathogenprodukte im Rahmen einer inflammatorischen Immunantwort hochreguliert (BRUNET, 2001), was in der Reaktion auf Krankheitserreger von großer Bedeutung ist. In Mäusen ist besonders IFN-γ als iNOS-Induktor von großer Bedeutung, wie bei Experimenten mit IFN-γ- oder IFN-γ-Rezeptor-defizienten Mäusen anhand der fehlenden iNOS-Expression festgestellt wurde (KAMIJO ET AL., 1995; KHAN ET AL., 1997).

In den Experimenten in dieser Arbeit wurde eine deutliche Transkriptionssteigerung des murinen iNOS-Genes *NOS2* nach der Aktivierung der SMZ mit IFN-γ festgestellt. Dies korrelierte mit der Erkenntnis, dass iNOS vor allem auf dem Transkriptionslevel reguliert wird (XIE ET AL., 1992; MACMICKING ET AL., 1997). Im Gegensatz zu SMZ wurde in NIH3T3-Fibroblasten durch IFN-γ eine sehr viel geringere Steigerung der Transkription von *NOS2* ausgelöst. Dies bestätigte, dass Fibroblasten weniger stark auf Aktivierung durch IFN-γ reagierten als SMZ. Daher überraschte es nicht, dass zwar eine gesteigerte Nitritproduktion in Fibroblasten nach Aktivierung mit IFN-γ im Vergleich zu nicht aktivierten Fibroblasten stattfand, diese aber wesentlich geringer war als in SMZ. Bei Versuchen mit dem iNOS-Inhibitor L-NIL hemmte dieser die Steigerung der Produktion von Nitrit (quantifizierbares Abbauprodukt vom instabilen NO) nach Zytokin-Stimulation deutlich, was zeigt, dass das Nitrit tatsächlich von iNOS und nicht von nNOS oder eNOS produziert wurde.

Neben IFN-γ ist auch TNF ein Stimulator der iNOS (DECKERT-SCHLÜTER ET AL., 1998;

YAP ET AL., 1998). Während einer *Toxoplasma*-Infektion wurde TNF ein wichtiger synergistischer Effekt zu IFN-γ in der Parasiten-Abwehr durch Makrophagen zugeschrieben (SIBLEY ET AL., 1991; LANGERMANS ET AL., 1992), der unter anderem auf die verstärkte Produktion von Stickstoffmonoxid zurückzuführen ist (DECKERT-SCHLÜTER ET AL., 1998). Eine geringfügig erhöhte NO-Produktion durch SMZ und Fibroblasten, die zusätzlich zu IFN-γ auch mit TNF behandelt waren wurde im Vergleich zur Stimulation mit IFN-γ alleine auch in dieser Arbeit nachgewiesen.
Da die Verwendung des iNOS-Inhibitors L-NIL ein gesteigertes Wachstum und eine erhöhte Replikation von *T. gondii* in IFN-γ behandelten permanenten SMZ im Vergleich zu aktivierten SMZ ohne Inhibitor zur Folge hatte, ist davon auszugehen, dass NO an der Abwehr des Parasiten in SMZ beteiligt ist.

Die Wirkung von NO während einer *Toxoplasma*-Infektion ist abhängig von deren Verlaufsstadium, aber auch vom infizierten Organismus. So scheint NO z.B. im Menschen eine eher untergeordnete Rolle in der Abwehr von *T. gondii* zu spielen. Im Menschen ist IDO, ein Enzym, das für eine Abwehr des Parasiten durch Tryptophan-Deprivation verantwortlich ist, von größerer Bedeutung (KÖNEN-WAISMAN & HOWARD, 2007). Obwohl NO während der akuten Toxoplasmose in Mäusen das Parasitenwachstum einschränkt, ist es dort vor allem auch an der Entwicklung der entzündlichen Symptomatik beteiligt (HAYASHI ET AL., 1996; LIESENFELD ET AL., 1999; SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1997). So entwickeln Mäuse mit einer *NOS2*-Gendefizienz oder nach Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor Aminoguanidin in der Abwesenheit von NO zwar eine erhöhte Parasitenlast und schwere Enzephalitis, zeigen aber auch eine verringerte Inflammation des Intestinaltraktes und ein verbessertes Überleben in den frühen Phasen der Infektion (YAP & SHER, 1999; KHAN ET AL., 1997). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Produktion von NO durch iNOS in der chronischen Phase einer *Toxoplasma*-Infektion vor Enezphalitis schützt und für ein Überleben von infizierten Mäusen essentiell ist (SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1997).
Interessanterweise führte die Hemmung der iNOS mit dem iNOS-Inhibitor L-NIL in dieser Arbeit zu einer gesteigerten Replikation von *Toxoplasma* in SMZ, aber nicht in Fibroblasten. Dies zeigt, dass das Enzym in SMZ zur Abwehr des Wirtes gegen den Parasiten beiträgt. Dass die Inhibition von iNOS das durch IFN-γ-Aktivierung verringerte Wachstum nicht vollständig revertieren konnte unterstreicht aber auch, dass noch andere durch IFN-γ ausgelöste Mechanismen an der Abwehr von *T. gondii* in SMZ beteiligt sind.

### 5.3.2 *IRG-Proteine werden nach IFN-γ-Aktivierung in SMZ exprimiert und lagern sich an die PV von* T. gondii *an*

Die Familie der IRG-Proteine umfasst eine Reihe von GTPasen (p47-GTPasen) wie Irgd, Irgm1, Irgm2, Irm3 (IGTP), Irga6 und Irgb6, die eine frühe Resistenz gegen Mikroorganismen vermitteln können (CARLOW ET AL., 1998; COLLAZO ET AL., 2001; TAYLOR ET AL., 2000). Zudem ist ihre Funktion zellautonom, was bedeutet, dass die Proteine direkt in individuellen infizierten Zellen agieren (HALONEN ET AL., 2001, MARTENS ET AL., 2005; TAYLOR, 2007; HUNN ET AL., 2008).

*In vivo* werden die IRG-Proteine vor allem in Milz, Thymus, Lunge und Dünndarm in niedrigen Konzentrationen exprimiert, zeigen aber hohe Konzentrationen in vielen hematopoietischen und nicht-hematopoietischen Geweben, sobald der Wirt nach Infektion mit Pathogenen eine zellvermittelte Immunantwort auslöst (BOEHM ET AL., 1997; ZERRAHN ET AL., 2002; TAYLOR ET AL., 2000). Die Expression von IRG-Proteinen in Muskelgewebe wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben. Ebenso ist das Vorkommen von funktionellen IRG-Proteinen in fleischliefernden Nutztieren nicht eingehend untersucht. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass in Hühnern kein Homolog der IRG-Proteine existiert, wohingegen beim Hund neun, der Ratte fünfzehn, der Maus zweiundzwanzig und dem Menschen zwei putative funktionelle Formen der IRG-Proteine im Genom identifiziert wurden (LI ET AL., 2009). Bisher wurde davon ausgegangen, dass es sich im Menschen um einen Verlust der IRG-vermittelten zellautonomen Resistenz handelt (BEKPEN ET AL., 2005) und dass Mäuse eine komplexere Immunabwehr durch IRG-Proteine entwickelt haben (KLAMP ET AL., 2003). Ob also funktionelle IRG-Homologe in Schafen, Rindern und Schweinen auftreten, muss noch untersucht werden.

Die Expression der IRG-Proteine wird vor allem durch IFN-γ induziert. So ist beispielsweise die IFN-γ-abhängige Hemmung von *Toxoplasma* in murinen Astrozyten, die mit mutierten inaktiven IRG-Proteinen transfiziert sind, stark vermindert (MARTENS ET AL., 2005). Ebenso ist in Knochenmarks-Makrophagen, die kein Irgm3 oder Irgm1 enthalten, das Wachstum von *T. gondii* deutlich weniger durch IFN-γ gehemmt als in Wildtyp-Zellen (BUTCHER ET AL., 2005).

In dieser Arbeit wurde *in vitro* die Transkription der beiden IRG-Proteine Irga6 und Irgm3 durch eine Aktivierung von SMZ mit IFN-γ ebenfalls stark erhöht. Dies galt für Irga6 in besonderem Maß in permanenten SMZ und für Irgm3 in primären SMZ. In Fibroblasten war die Transkription der beiden Gene ebenfalls gesteigert, aber in geringerem Ausmaß als in SMZ. Die Expression von IRG-Proteinen in SMZ und Fibroblasten korrelierte demnach

mit der Hemmung des Wachstums und der Replikation des Parasiten durch IFN-γ und wies darauf hin, dass IRG-Proteine an der durch das Zytokin vermittelten Parasitostase in SMZ beteiligt sein könnten.

Im Maus-Modell wurde ein deutlicher Einfluss der IRG-Proteine auf den Verlauf einer *Toxoplasma*-Infektion gezeigt. Eine Disruption von *Irga6* und *Irgd* führt zu einem signifikanten Verlust der Resistenz gegen *T. gondii* (TAYLOR ET AL., 2004; MARTENS ET AL., 2005). Ebenso ist die Sterblichkeit von *Irgm3*- und *Irgm1*-defizienten Mäusen nach einer Infektion mit *T. gondii* erhöht (TAYLOR ET AL., 2000; COLLAZO ET AL., 2001) und korreliert mit der Empfänglichkeit von IFN$^{-/-}$-Mäusen für eine *Toxoplasma*-Infektion (SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1996). Dies zeigt deutlich, dass die IRG-Proteine in Mäusen an der IFN-γ-vermittelten Abwehr von *T. gondii* beteiligt, wenn nicht sogar essentiell, sind.

Die meisten IRG-Proteine sind in ihrer inaktiven Form Membran-assoziiert, was GTP-abhängig ist (MARTENS ET AL., 2004; HUNN ET AL., 2008; PAPIC ET AL., 2008). Nach ihrer Aktivierung sind sie zwischen spezifischen Membrankompartimenten und dem Zytosol verteilt (MARTENS ET AL., 2005). Zudem teilen die IRG-Proteine Charakteristika mit Dynaminen, die für Membranmodifikationen verantwortlich sind (PRAEFCKE & MCMAHON, 2004; MARTENS & HOWARD, 2006).
In dieser Arbeit wurde nach der Infektion von IFN-γ-aktivierten permanenten SMZ mit *T. gondii* die Lokalisation von Irga6-Proteinen auf der Oberfläche der parasitophoren Vakuole detektiert. In IFN-γ-aktivierten primären SMZ und Fibroblasten war dagegen keine Relokalisation von Irga6 zur PV-Membran (PVM) festzustellen. Dies galt auch für nicht aktivierte permanente und primäre SMZ sowie Fibroblasten, zumal in diesen Zellen keinerlei Spuren einer Irga6-Färbung detektierbar waren. Diese Lokalisierung von Irga6 zur PVM in aktivierten C2C12-Zellen korreliert mit Studien an anderen Zelltypen wie primären Astrozyten (MARTENS ET AL., 2005), primären Fibroblasten (MARTENS & HOWARD 2006), peritonealen Makrophagen (LING ET AL., 2006) und Knochenmarks-Makrophagen (ZHAO ET AL., 2009a), in denen ebenfalls eine Relokalisation einiger IRG-Proteine zur PV gefunden wurde. So relokalisieren in primären Astrozyten und Makrophagen beispielsweise Irga6 und Irgb6 nach IFN-γ-Aktivierung und Infektion mit avirulenten Typ II-Toxoplasmen innerhalb von Minuten zur Membran der parasitophoren Vakuole (MARTENS ET AL., 2005, MARTENS & TAYLOR, 2006; BUTCHER ET AL., 2005; KHAMINETS ET AL., 2010). Dies hatte zur Folge, dass die PVM vesikulierte und schließlich

disruptierte, woraufhin der Parasit ins Zytoplasma freigesetzt wurde (MARTENS ET AL., 2005; LING ET AL., 2006; MELZER ET AL., 2008).
In dieser Arbeit traten in permanenten SMZ, die mit IFN-γ aktiviert worden waren, 48 hpi gehäuft aberrante, partikuläre Strukturen auf, die sowohl für die *Toxoplasma*- als auch die Irga6-Färbung positiv waren. Es könnte sich dabei um Reste von zerstörten PV und Toxoplasmen gehandelt haben, was auf eine tatsächlich erfolgte Disruption der PV nach der Anlagerung von Irga6 hinweisen würde.

Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass *Toxoplasma* auch *in vivo* im Muskelgewebe durch IRG-Proteine abgetötet und beseitigt wird. Dieser Hypothese steht jedoch die effiziente Persistenz des Parasiten gerade in Muskelgewebe gegenüber. Möglicherweise erklären die Zeitverläufe der Invasion und Anlagerung der Proteine an die PVM diese offensichtlichen Gegensätze. So lagern sich die IRG-Proteine in IFN-γ-aktivierten Zellen innerhalb kurzer Zeit nach der Invasion an die PV-Membran an (MARTENS ET AL., 2005; KHAMINETS ET AL., 2010). *In vivo* könnte der Parasit also in SMZ, die durch IFN-γ aus den T-Lymphozyten aktiviert sind, schnell abgetötet werden, sich aber in nicht-aktivierten SMZ aufgrund der fehlenden IRG-Expression weiterentwickeln. Dies korreliert mit dieser Arbeit insofern, als dass die Wirtszellen zeitgleich mit der Infektion aktiviert wurden und Irga6 erst exprimiert werden musste. Somit wurde eine deutliche Anlagerung von Irga6 noch nicht zu den frühen Zeitpunkten nachgewiesen, weil das Protein erst exprimiert werden musste. Ebenso ist interessant, dass in *Toxoplasma*-infizierten primären SMZ keine Anlagerung von Irga6 an die PV-Membran detektiert wurde. In diesen Zellen wurde eine deutliche Verringerung der *Irga6*-Transkription gemessen, wenn die Zellen mit *Toxoplasma* infiziert waren. Diese lag 48 hpi bei nahezu 100%. Bei permanenten infizierten SMZ war die Hemmung der *Irga6*-Transkription zu dem Zeitpunkt mit 95% zwar ebenfalls sehr stark, da aber in diesen Zellen durch IFN-γ eine stärkere Hochregulierung der Transkription stattfand, war der verminderte Level ausreichend, um zu einer detektierbaren Anlagerung des Proteins auf die PVM zu führen.

Die Anlagerung von Irgm3 an die PVM von avirulenten Typ II oder III-*Toxoplasmen* und die folgende Disruption der PVM führte in Makrophagen und Astrozyten zum Abstreifen der Plasmamembran des Parasiten, woraufhin er in Autophagosom-ähnlichen Vakuolen aufgenommen wurde, die dann mit Lysosomen verschmolzen (LING ET AL., 2006; MARTENS ET AL., 2005). Außerdem wurde in murinen Fibroblasten gezeigt, dass eine

Anlagerung von IRG-Proteinen an die PVM von avirulenten Typ II-Toxoplasmen nach IFN-γ-Aktivierung zu nekrotischem Tod der Wirtszelle führt (ZHAO ET AL., 2009b). Andere Untersuchungen ergaben, dass Toxoplasmen des Typ I in aktivierten Astrozyten die Anlagerung von Irgm3 auf der PVM unbeschadet überstehen und die Wirtzelle verlassen können, ohne sie zu zerstören (MELZER ET AL., 2008).

In den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit Typ II-Toxoplasmen des NTE-Stammes wurde keine Zytotoxizität im Zusammenhang mit einer IFN-γ-Aktivierung von permanenten SMZ oder Kontroll-Fibroblasten mit Hilfe von freigesetzter LDH aus abgestorbenen Zellen festgestellt. Daher konnte ein IFN-γ-induzierter Egress der Typ II-Parasiten auch aus diesen Wirtszellen ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass eine Anlagerung der IRG-Protine zwar stattfand, aber nicht im Tod des Parasiten mit anschließender Nekrose der Wirtszelle resultierte.

Interessanterweise führte eine IFN-γ-Aktivierung in nicht infizierten Zellen zu einer gesteigerten Zytotoxizität im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen. Dies könnte durch eine verstärkte NO-Produktion, die für manche Zelltypen toxisch ist, vermittelt werden und dadurch LDH freisetzen (UNNO ET AL., 1997; HAYASHI ET AL., 1996; LIESENFELD ET AL., 1999; SCHARTON-KERSTEN ET AL., 1997). Wenn die permanenten SMZ tatsächlich endogenes TNF produzierten, könnte dadurch auch Apoptose induziert worden sein (DEALTRY ET AL., 1987; ROBAYE ET AL., 1991). Daraufhin würden die Zellen *in vitro* nekrotisch und aus ihnen LDH freigesetzt. In infizierten Zellen war die Zytotoxizität in nicht aktivierten und IFN-γ-aktivierten Zellen dagegen ähnlich. Dies könnte bedeuten, dass die pathologische Wirkung des Zytokins auf die Wirtszelle durch den Parasiten gehemmt werden kann, was sich auch positiv auf sein eigenes Überleben auswirkt.

## 5.4 Immunevasion von *T. gondii* in Skelettmuskelzellen

Die latente Phase einer *Toxoplasma*-Infektion zeichnet sich durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen antiparasitären Effektormechanismen und anti-inflammatorischen Faktoren aus, da eine übersteigerte Immunantwort schädlich für den Wirt sein kann (ALIBERTI, 2005). Aber nicht nur der Wirt hat Einfluss auf die Regulation seiner Immunantwort, sondern auch *T. gondii* hat Mechanismen entwickelt, die seine Persistenz im Wirt durch Immunevasion fördern (BLADER & SAEJI, 2009; LAMBERT & BARRAGAN, 2010; LALIBERTÉ & CARRUTHERS, 2008; LANG ET AL., 2007). Dazu zählen die Konversion des Parasiten in sein Ruhestadium, den Bradyzoiten, aber auch aktive Veränderungen Wirts-gesteuerter Vorgänge, die Immunabwehrreaktionen gegen den Parasiten regulieren.

### *5.4.1* T. gondii *hemmt die IFN-γ-induzierte Transkription von NOS2 in SMZ*

NO ist nicht nur zytotoxisch für Pathogene, sondern in höherer Konzentration auch für die Wirtszellen, wobei letztere unterschiedlich sensitiv für NO sind. Während beispielsweise Hepatozyten recht resistent gegen einen hohen NO-Spiegel sind, reagieren Darmzellen sehr empfindlich darauf (KIM ET AL., 1995; UNNO ET AL., 1997). Der Wirt muss also auch nach *Toxoplasma*-Infektion Mechanismen entwickelt haben, um die Wirkung der stimulierenden Zytokine einzudämmen, damit keine tödliche Pathologie entsteht (MORDUE ET AL., 2001). Die Herabregulation der Expression von iNOS wird durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF-β entweder direkt oder über deren hemmenden Effekt auf die TNF-Produktion durch Makrophagen erreicht (BOGDAN ET AL., 1994; OSWALD ET AL., 1992). Ebenso ist iNOS in der Lage, sich über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus selber zu regulieren. NO kann die Produktion proinflammatorischer Zytokine herabregulieren und so die inflammatorische Antwort supprimieren (FLORQUIN ET AL., 1994). Die Aufrechterhaltung dieses anfälligen Gleichgewichts könnte für die Etablierung des chronischen Stadiums in der späten Phase einer *Toxoplasma*-Infektion verantwortlich sein (HAYASHI ET AL., 1996).
Eine Infektion mit *Toxoplasma* hemmte die durch IFN-γ gesteigerte iNOS-mRNA-Produktion in SMZ und Fibroblasten 48 hpi auch in dieser Arbeit deutlich, konnte aber ebenfalls nicht die antiparasitäre Wirkung von NO aufheben, wie durch die Versuche mit dem iNOS-Inhibitor L-NIL gezeigt worden war.

In *Toxoplasma*-infizierten Makrophagen wurde bereits eine durch den Parasiten ausgelöste Herabregulation der Expression von iNOS beschrieben (LÜDER ET AL., 2003). Infizierte Astrozyten hemmen die erhöhte NO-Produktion der benachbarten Mikroglia, was zum Schutz vor Neurodegeneration führte (ROZENFELD ET AL., 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass *Toxoplasma* die Expression der iNOS in murinen Knochenmarks-Makrophagen nach der Aktivierung mit moderaten Konzentrationen von IFN-γ oder LPS reduzieren kann, was zu einer verstärkten Parasitenreplikation führt (LÜDER ET AL., 2003). Diese Hemmung findet auf Transkriptionsebene statt. Die Transkription von *NOS2*, dem murinen iNOS-Gen, ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren NF-κB und STAT1α (LANG ET AL., 2007). *T. gondii* kann mit der Signaltransduktion beider Transkriptionsfaktoren interferieren. So verhindert der Parasit in Makrophagen die Translokation von STAT1α zum Nukleus (LÜDER ET AL., 2001), was über die „suppressor of cytokine"- (SOCS-) Proteine abläuft (Dalpke et al., 2001; ZIMMERMANN ET AL., 2006; BLADER & SAEIJ 2009).

Ebenso hemmt der Parasit die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB durch die Inhibition der Phosphorylierung der Untereinheit p65/RelA zu seinen Zielpromotoren im Nukleus (SHAPIRA ET AL., 2005; BUTCHER ET AL., 2001; DOBBIN ET AL., 2002). Von der Hemmung der IFN-γ-vermittelten Signaltransduktion kann auch die Transkription anderer Gene, die von diesem Zytokin abhängig sind, betroffen sein.
Diese Parasiten-vermittelte Hemmung der iNOS ist jedoch nicht effizient genug, um eine Reduktion des Parasitenwachstums in synergistisch mit IFN-γ plus LPS aktivierten Makrophagen aufzuheben (LÜDER ET AL., 2003).

Eine Hemmung der iNOS-Transkription bedeutet für Toxoplasma eine Verringerung des Immundruckes durch Hemmung der Produktion des zytotoxischen NO. Dies könnte dem Parasiten mehr Zeit geben, sich im Muskel zu etablieren und anschließend in Bradyzoiten umzuwandeln, zumal NO auch die Stadienkonversion auslösen kann (FERREIRA-DA-SILVA ET AL., 2008)

### *5.4.2* T. gondii *greift in die Transkription der IRG-Proteine in SMZ ein*

IRG-Proteine werden durch IFN-γ induziert und sind an der Abwehr von intrazellulären Pathogenen beteiligt (MARTENS & HOWARD, 2006; TAYLOR ET AL., 2004). Während einer *Toxoplasma*-Infektion lagern sie sich an die PV-Membran an und führen zu deren Ruptur. Daraufhin wird der Parasit ins Zytoplasma freigesetzt und stirbt in den meisten Fällen ab (MARTENS ET AL., 2005; ZHAO ET AL., 2009b). Jedoch wurde gezeigt, dass virulente Typ I-Toxoplasmen weitgehend resistent gegen IRG-vermittelte Effektormechanismen zu sein scheinen, da sich die IRG-Proteine nicht auf der PV-Membran dieser Toxoplasmen ablagern (KHAMINETS ET AL., 2010; ZHAO ET AL., 2009a, 2009b, 2009c). Daran ist möglicherweise eine Variante des Rhoptrienprotein ROP18 beteiligt (TAYLOR ET AL., 2006; SAEIJ ET AL., 2006, 2007), die in den virulenten Typ I- aber auch in Typ III-Toxoplasmen exprimiert wird (TAYLOR ET AL., 2006; EL HAJJ ET AL., 2007). Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass ROP18 von virulenten Typ I-Stämmen Irga6 phosphoryliert. Dies hat die Inaktivierung der GTPase zur Folge, die so nicht mehr an die PVM binden kann (STEINFELDT ET AL., 2010; PAWLOWSKI ET AL., 2011). In dieser Arbeit wurden für die Versuche mit Irgm3 und Irga6 Typ II-Toxoplasmen verwendet. Typ II-Parasiten exprimieren zwar auch ROP18 (SAEIJ ET AL., 2006), dabei handelt es sich aber um eine Variante, die möglicherweise nicht Irga6 phosphorylieren und daher nicht inaktivieren kann (STEINFELDT ET AL., 2010). Eine Ablagerung von Irga6 auf der PVM von

IFN-γ-aktivierten permanenten SMZ wurde hier dementsprechend nachgewiesen. Dennoch wäre ein Vergleich von Typ I- und Typ II-Toxoplasmen bezogen auf ihre Interaktion mit den IRG-Proteinen in SMZ interessant.
Wie bereits weiter oben beschrieben, kann *Toxoplasma* mit der Regulation von Wirtszellgenen interferieren (Blader & Saeij; 2009; BLADER ET AL., 2001; SAEJI ET AL., 2007). Die Hemmung der Bindung von STAT1α an IFN-γ-abhängige Promotoren (LANG ET AL., 2006; KIM ET AL., 2007) beeinträchtigt auch die Transkription von Irgm3 (COLLAZO ET AL., 2002). Interessanterweise führte in dieser Arbeit eine Infektion von IFN-γ-aktivierten permanenten SMZ mit Typ II-Toxoplasmen bereits 24 h nach Aktivierung und Infektion ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Bildung von Irga6- und Irgm3-mRNA. Dies galt 48 h nach Aktivierung ebenso für die Regulation von Irga6 in primären SMZ und Fibroblasten sowie die Regulation von Irgm3 in Fibroblasten. Sollte dies über die Interferenz mit STAT-abhängigen Promotoren ablaufen, könnte es sich aber um einen für IRG-Proteine unspezifischen Effekt handeln. Da eine allgemeine Hemmung der Transkription IFN-γ-induzierter Gene durch *T. gondii* stattfindet, muss eine Hemmung der IRG-Proteine nicht automatisch bedeuten, dass diese an der Abwehr des Parasiten beteiligt sind.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der untersuchten IRG-Proteine in primären und permanenten SMZ ist es schwierig, Vermutungen über die *in-vivo*-Verhältnisse anzustellen. Daher sollten weitere Experimente zu diesem Themenkomplex durchgeführt werden.

*Toxoplasma gondii* persistiert besonders in Gewebszysten im Muskel und seine Übertragung auf den Menschen findet häufig durch unzureichend gegartes Fleisch aus infizierten Nutztieren statt. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, mehr über die Mechanismen herauszufinden, die zur Differenzierung und Persistenz des Parasiten in Muskelzellen führen. Dabei zeigte sich, dass IFN-γ, ein bedeutendes Zytokin in der Abwehr des Parasiten *in vivo*, auch in Muskelzellen deutlich parasitostatisch wirkt. Es wurde allerdings keine durch IFN-γ verstärkte Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten festgestellt, die eine Voraussetzung für die Persistenz in den Gewebszysten ist. Von den untersuchten IFN-γ-induzierten Effektormechanismen schien besonders die IRG-Protein-vermittelte Parasitenabwehr eine Rolle in permanenten murinen SMZ zu spielen, die jedoch eher zur Abtötung des Parasiten als zu seiner Persistenz führt. Eine Beteiligung der iNOS an der

IFN-γ-vermittelten Parasitenabwehr wurde ebenfalls nachgewiesen. Außerdem konnte der Parasit in beide Mechanismen eingreifen und die Transkription der beteiligten Gene hemmen.

Dies könnte bedeuten, dass *T. gondii* im Muskel besonders effektiv in die IFN-γ-vermittelte Abwehr eingreifen kann. Natürlich als Botenstoff vorkommendes NO könnte zu einer Stadienkonversion führen und so die Gewebszystenbildung fördern. Da jedoch deutliche Unterschiede der Häufigkeit von Zysten im Muskelfleisch von z.B. Schweinen und Rindern bestehen, muss für jeden Nutztierorganismus gesondert untersucht werden, welche Mechanismen von besonderer Bedeutung sind. Diese Arbeit zeigt Ansatzpunkte für die durchzuführenden Analysen auf.

## 5.5 Ausblick

Für weitere Versuche sollte ein System etabliert werden, bei dem SMZ-Kulturen *in vitro* über längere Zeiträume kultiviert werden können, um mehr über die Langzeitwirkung von IFN-γ herauszufinden und einen Einblick in die Bildung von Gewebszysten zu bekommen. Da eine Stadienkonversion zu Bradyzoiten auch spontan in SMZ stattfindet, könnte dies ebenfalls in nicht IFN-γ-aktivierten SMZ durchgeführt werden um zu analysieren, ob es Unterschiede je nach Aktivierungszustand gibt.

Weitere Informationen über die Wirkung von IFN-γ im Muskel könnten durch die Zugabe oder Hemmung von IFN-γ in infizierten Tieren erlangt werden. Um einen gewebsspezifischen Effekt zu erzielen, könnten IFN-γ oder Antikörper gegen IFN-γ in den Muskel von infizierten Nutztieren injiziert und danach Biopsien untersucht werden. Zudem könnten transgene Tiere hergestellt werden, die einen auf den Muskel begrenzten „knock out“ von IFN-γ haben oder IFN-γ dort überexprimieren. Die Reaktion dieser Tiere auf eine Infektion mit *T. gondii* könnte dann mit der Reaktion von Wildtyp-Tieren verglichen werden.

In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, mehr darüber zu erfahren wie die Verhältnisse im Muskel *in vivo* sind. Dabei stellt sich beispielsweise die Frage, ob *Toxoplasma*-infizierte Nutztiere erhöhte IFN-γ-Level im Muskel aufweisen. Wenn dem so ist, sollte untersucht werden, welche Mechanismen dadurch ausgelöst werden. So könnte in Gewebeproben von infizierten Nutztieren untersucht werden, ob die Transkription bestimmter Gene wie z.B. *NOS2* und *Irga6,* die an der Abwehr von *T. gondii* beteiligt sind, hochreguliert ist. Zusätzlich könnten Gewebeproben aus Nutztieren entnommen werden und *in vitro* mit *Toxoplasma* infiziert werden. Mit diesen Proben könnte dann ähnlich

verfahren werden wie mit den längerfristig kultivierten Zelllinien und dadurch Informationen über Ähnlichkeiten und Unterschiede der beiden Systeme erhalten werden. Ebenso könnte versucht werden, lokale Infektionsherde durch Injektion von Tachyzoiten herzustellen, da es oft schwierig ist, die im Organismus verteilten Gewebszysten zu lokalisieren.

Stickstoffmonoxid ist ein Stimulator der Stadienkonversion zu Bradyzoiten und somit wichtig für die Bildung der Gewebszysten. Ein Grund für die bevorzugte Persistenz von *T. gondii* in Muskel- und Nervengewebe könnte sein, dass NO gerade in diesen Geweben als natürlicher Botenstoff vorkommt. Daher sollte untersucht werden, ob der Muskel auf eine Infektion mit *Toxoplasma* wie auf eine Verletzung reagiert, dabei die nNOS besonders aktiv wird und zur Regulation der Regeneration viel NO produziert. Es könnten dafür Gewebeproben experimentell infizierter Tiere entnommen werden und auf ihren NO-Gehalt (in der Form des stabileren Abbauproduktes Nitrit) hin überprüft werden.

Für weitere Versuche bezüglich der IRG-Proteine sollten defiziente Skelettmuskelzell-Linien hergestellt werden. Versuche in dieser Richtung wurden bereits im Zuge dieser Arbeit unternommen (Daten nicht gezeigt). „Knock out“-Mäuse für verschiedene IRG-Proteine wurden ebenfalls bereits beschrieben. Es wäre daher möglich, aus diesen Tieren Satellitenzellen für primäre Muskelzellkulturen zu gewinnen.
Nach Etablierung der „knock down“- oder „knock out“-Skelettmuskelzellen *in vitro* könnten wiederum das Wachstum, die Replikation und auch die Stadienkonversion von *Toxoplasma* ohne und nach IFN-γ-Aktivierung der Wirtszellen analysiert werden.
Bisher ist außerdem nicht bekannt, inwiefern es funktionelle Homologe der IRG-Proteine in Nutztieren wie dem Rind oder dem Schwein gibt und ob diese im Muskel exprimiert werden. Dies könnte mit Hilfe von PCR und Sequenzanalysen untersucht werden.

# 6. Zusammenfassung

## 6.1 Zusammenfassung

*Toxoplasma gondii* ist ein weit verbreiteter intrazellulärer Parasit, der jede kernhaltige Zelle von warmblütigen Tieren und des Menschen infizieren kann. *T. gondii* persistiert in diesen Organismen besonders in Nerven- und Muskelgewebe lebenslang. In immunkompetenten Wirten verläuft eine Infektion meist asymptomatisch oder mit geringen unspezifischen Symptomen, jedoch kann die chronische Infektion in immunsupprimierten Individuen, z.B. AIDS-Patienten, reaktivieren und unter anderem eine tödliche Enzephalitis auslösen. Ebenso kann *T. gondii* während einer Erstinfektion diaplazentar von der Mutter auf das ungeborene Kind übertragen werden und zu schweren Missbildungen des Fötus oder zum Abort führen.

Einer der Hauptübertragungswege von *Toxoplasma* auf den Menschen ist die Aufnahme von Gewebszysten in unzureichend gegartem Fleisch chronisch infizierter Schlachttiere. Obwohl der Parasit bevorzugt im Muskelgewebe persistiert, ist bisher nur wenig über die Mechanismen bekannt, die zu seiner Differenzierung und Persistenz gerade dort führen. Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung von *T. gondii* in Skelettmuskulatur zu charakterisieren. Dabei sollte besonders die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ und TNF, die eine zentrale Rolle bei der Parasitenabwehr und Stadiendifferenzierung spielen, auf die Parasitenentwicklung in Skelettmuskulatur untersucht werden. Als Modell dafür bieten sich Analysen *Toxoplasma*-infizierter Mäuse oder Mauszellen an, da Mäuse natürliche Zwischenwirte des Parasiten sind und als Kleintiermodell der Toxoplasmose sehr gut etabliert sind. Um die Mechanismen der Entwicklung des intrazellulären Parasiten auf zellulärer Ebene eingehend zu studieren, eignen sich unter anderem *in-vitro*-Untersuchungen. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden daher dafür sowohl permanente C2C12-Myoblasten als auch primäre murine Skelettmuskelzellen (SMZ) und als Kontrollzellen NIH3T3-Fibroblasten verwendet. Beide SMZ-Linien wurden für die Experimente *in vitro* zu Myotuben differenziert. Die Differenzierung der SMZ wurde durch den Nachweis muskelspezifischer Marker auf Transkriptions- und Proteinebene verifiziert.

In dieser Arbeit wurde ein deutlich antiparasitärer Effekt von IFN-γ in SMZ, aber in wesentlich geringerem Maße in Fibroblasten nachgewiesen. Dies zeigte sich im Westernblot, in dem weniger *Toxoplasma*-Proteine in IFN-γ-aktivierten SMZ detektiert wurden als in nicht behandelten SMZ. In Reporterassays mit Hilfe von *LacZ*-transgenen

Toxoplasmen zur Analyse des Parasitenwachstums wurde ein stärkerer wachstumshemmender Effekt von IFN-γ in SMZ gezeigt als in Fibroblasten. TNF hatte nur in permanenten SMZ einen synergistischen Effekt zu IFN-γ und senkte die Wachstumsraten zusätzlich zu IFN-γ geringfügig. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die Infektions- und Replikationsraten von *T. gondii* besonders in permanenten, aber auch in primären SMZ durch die IFN-γ-Zugabe deutlich verringert waren. In Fibroblasten wurden Parasitenreplikation und -invasion durch IFN-γ alleine dagegen nicht gehemmt, wohingegen die Gabe von TNF die Replikationsfähigkeit des Parasiten weiter geringfügig einschränkte. Bemerkenswerterweise wurde die Stadienkonversion von *Toxoplasma*-Tachyzoiten in das ruhende Bradyzoiten-Stadium durch die Zugabe von IFN-γ in SMZ und Fibroblasten gehemmt. Eine zusätzliche Aktivierung der IFN-γ-stimulierten Zellen mit TNF reduzierte diese Hemmung geringfügig. Es ist daher davon auszugehen, dass IFN-γ in SMZ eine besondere Bedeutung in der Abwehr von *T. gondii* hat, wohingegen eine synergistische Wirkung von TNF eher fraglich erscheint.

Die Effektormechanismen der IFN-γ-vermittelten Parasitenabwehr gegen *T. gondii* umfassen unter anderem die Produktion von zytotoxischem Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS). Mittels quantitativer RT-PCR wurde besonders in permanenten, aber auch in primären SMZ eine deutliche Steigerung der Transkriptmengen des murinen iNOS-Gens *NOS2* durch Aktivierung der Zellen mit IFN-γ gemessen. Die Steigerung der Transkription in IFN-γ-aktivierten Fibroblasten war dagegen vergleichsweise niedrig. Nachweise von Nitrit, einem Abbauprodukt des instabilen NO, durch die Griess-Reaktion bestätigten eine effektive Nitritproduktion nach IFN-γ-Aktivierung von SMZ. Durch die Verwendung des iNOS-Inhibitors L-NIL wurde die Hemmung des Wachstum und der Replikation des Parasiten durch IFN-γ in SMZ vermindert, aber nicht aufgehoben. Dies zeigte, dass iNOS an der Abwehr von *T. gondii* in SMZ beteiligt ist, aber noch andere Mechanismen existieren müssen. Als weiterer IFN-γ-vermittelter Effektormechanismus ist die Aktivierung der IRG-Proteine (p47-GTPasen) beschrieben. Die quantitative RT-PCR IFN-γ-stimulierter SMZ und Fibroblasten bestätigte vor allem in SMZ eine gesteigerte Transkription der IRG-Gene *Irga6* und *Irgm3 in vitro*. Außerdem wurde die Anlagerung von Irga6 auf der PVM in infizierten permanenten SMZ nach IFN-γ-Aktivierung per Immunfluoreszenztest bestätigt. Dagegen wurde in nicht aktivierten Zellen kein Irga6-Protein detektiert und in infizierten aktivierten primären SMZ sowie Fibroblasten keine Relokalisation des Proteins zur PVM des Parasiten festgestellt.

Durch LDH-Aktivitätstests konnte weder in permanenten SMZ noch in Fibroblasten ein Anstieg der LDH nach Aktivierung von SMZ oder Fibroblasten mit IFN-γ nachgewiesen werden. Ein IFN-γ-induzierter Parasitenegress aus der Wirtszelle mit anschließendem nekrotischen Zelltod konnte dadurch ausgeschlossen werden. Dagegen konnte nachgewiesen werden, dass der Parasit die IFN-γ-induzierte Transkription von *NOS2*, *Irga6* und *Irgm3* hemmte, was besonders für SMZ galt. Eine Hemmung der IFN-γ-vermittelten Signaltransduktion durch *T. gondii* wurde somit in dieser Arbeit bestätigt.

In dieser Arbeit wurde erstmals ein deutlicher Unterschied der IFN-γ-vermittelten Parasitenabwehr zwischen SMZ und Fibroblasten nachgewiesen. Dies unterstreicht eine zentrale Rolle von IFN-γ in der Interaktion von SMZ mit *T. gondii*, wie sie auch für andere Zelltypen beschrieben wurde. Jedoch scheint IFN-γ in SMZ keine Stadiendifferenzierung vom schnell replizierenden Tachyzoiten zum potentiell persistierenden Bradyzoitenstadium zu induzieren. Damit konnten in dieser Arbeit wichtige neue Erkenntnisse über die Entwicklung und die Parasitenabwehr von *Toxoplasma gondii* in Skelettmuskelzellen erzielt werden.

## 6.2 Summary

*Toxoplasma gondii* is a widespread intracellular parasite which is able to infect any nucleated cell of warm-blooded animals and humans leading to a lifelong persistence of *T. gondii* particularly in neuronal and muscular tissue. Although an infection of immunocompetent hosts is mostly asymptomatic or associated with unspecific symptoms only, persisting parasites can reactivate in immunosuppressed individuals such as AIDS-patients causing life-threatening diseases including fatal encephalitis. In addition, *T. gondii* can be transmitted in pregnant women during a primary infection to the unborn child via the placenta leading to severe malformations of the fetus or to abortion.

One of the common ways of transmission of *Toxoplasma* to humans is the ingestion of tissue cysts in raw or undercooked meat from chronically infected livestock. Although the parasite preferentially persists in muscular tissue, until now little is known about the mechanisms that regulate its development, differentiation and persistence within that tissue.

The aim of this study was to characterize the development of *T. gondii* in skeletal muscle. Specifically, the effect of the proinflammatory cytokines IFN-γ and TNF on the development of the parasite in skeletal muscle was of major interest since both cytokines

fulfill crucial roles in the host defense against the parasite and its differentiation. *Toxoplasma*-infected mice or mouse cells are well suited for such analyses because mice are natural intermediate hosts of the parasite and are well-established as a small animal model of toxoplasmosis. In order to investigate the mechanisms of development of the intracellular parasite on the cellular level, *in-vitro*-studies are well suited amongst others. Herein, *Toxoplasma* development was hence analyzed in permanent C2C12 myoblasts as well as primary murine skeletal muscle cells (SMCs), whereas fibroblasts served as control cells. Both SMC lines were differentiated to myotubes to mimic the situation in differentiated muscular tissue *in vivo*. The ability of the SMCs to differentiate was confirmed by the detection of muscle-specific markers on both the transcriptional and the protein levels.

Herein, a significant anti-parasitic effect of IFN-γ was exerted by SMCs, whereas such effect was clearly lower in control fibroblasts. This became evident after immunoblot analyses, in which less *Toxoplasma*-proteins were detected in IFN-γ-activated than in non-treated SMCs. Furthermore, a growth assay performed with parasites transgenic for the reporter *LacZ* demonstrated a stronger growth-inhibiting effect of IFN-γ in SMCs as compared to fibroblasts. TNF together with IFN-γ further inhibited the parasite growth in permanent C2C12 SMCs slightly, but not in primary SMCs or fibroblasts indicating that TNF has only a minor synergistic effect to IFN-γ in SMCs. Immunofluorescent microscopy showed that treatment with IFN-γ reduced the percentages of infected cells and the intracellular replication of *T. gondii* particularly in permanent but also in primary SMCs. In fibroblasts, IFN-γ alone had no effect on replication and host cell invasion of the parasite, whereas additional application of TNF led to slightly decreased replication of *T. gondii*. Notably, stage conversion of *Toxoplasma* tachyzoites to the dormant bradyzoite stage was diminished by IFN-γ in both SMCs and fibroblasts. The additional activation of IFN-γ-stimulated cells with TNF reduced this blockade slightly. Therefore, it was shown that IFN-γ has an important impact for the defense of *T. gondii* in SMCs, whereas a synergistic role of TNF to IFN-γ appears rather unlikely.

Effector mechanisms of the IFN-γ-mediated defense of host cells against *T. gondii* include the production of cytotoxic nitric oxide (NO) by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) which is induced by IFN-γ. A clear increase of transcripts of the murine iNOS gene *NOS2* was detected via quantitative RT-PCR in permanent as well as primary SMCs after activation with IFN-γ. In contrast, the induction of *NOS2* transcription in fibroblasts was comparatively low. An effective NO production after IFN-γ activation of SMCs was

confirmed by detection of nitrite as a degradation product of NO in cell culture supernatants using the Griess-reaction. Importantly, the iNOS inhibitor L-NIL reduced but did not abrogate the inhibition of growth and replication of the parasite. This indicates that iNOS takes part in the defense against *T. gondii* in SMCs but other mechanisms must be involved as well. Another IFN-γ-mediated effector mechanism is the activation of the IRG-proteins (p47-GTPases). Quantitative RT-PCR confirmed an increased transcription of IRG-genes *Irga6* and *Irgm3 in vitro* particularly in IFN-γ-activated SMCs. Additionally, the deposition of Irga6 protein on the membrane of the parasitophorous vacuole was confirmed in infected permanent SMCs after IFN-γ activation by immunofluorescent staining. In contrast, neither Irga6 protein was detected in non-activated cells nor relocalisation of the protein was demonstrated in infected primary SMCs as well as fibroblasts after IFN-γ activation. An LDH cytotoxicity assay did not show an increase in LDH activity in supernatants from infected permanent SMCs or fibroblasts after IFN-γ treatment. An IFN-γ-induced egress of the parasite from the host cell and a subsequent necrotic host cell death can therefore be excluded. In contrast, it was established that the parasite was able to inhibit the IFN-γ-induced transcription of *NOS2*, *Irga6* and *Irgm3*, which applied particularly to SMCs. An inhibition of the IFN-γ-mediated signal transduction through *T. gondii* was thus confirmed.

Together, a clear difference in the IFN-γ-mediated defense against *T. gondii* between SMCs and fibroblasts was demonstrated for the first time in this thesis. This emphasizes the central role of IFN-γ in the interaction of SMCs with *T. gondii* as it was described earlier in other cell types. However, IFN-γ does not seem to induce differentiation of the fast replicating tachyzoite stage to the potentially persisting bradyzoite stage. Thus, important new insights in the development and defense against *Toxoplasma gondii* in skeletal muscle cells were obtained in this study.

# 7. Literaturverzeichnis

**ABEL, L. C., L. V. RIZZO, ET AL.** (2001). "Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection." J Autoimmun **17**(1): 99-107.

**ADAMS, L. B., J. B. HIBBS, JR., ET AL.** (1990). "Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine." J Immunol **144**(7): 2725-2729.

**AGGARWAL, B. B., L. SCHWARZ, ET AL.** (1996). "Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells." Cancer Res **56**(22): 5156-5164.

**ALIBERTI, J.** (2005). "Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*." Nat Rev Immunol **5**(2): 162-170.

**ALIBERTI, J. C., F. S. MACHADO, ET AL.** (1999). "Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice." Infect Immun **67**(6): 2810-2814.

**ALIBERTI, J. C., F. S. MACHADO, ET AL.** (1999). "beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **67**(9): 4819-4826.

**ANDRADE, E. F., A. C. STUMBO, ET AL.** (2001). "Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion?" J Submicrosc Cytol Pathol **33**(3): 337-341.

**ARRIZABALAGA, G. AND J. C. BOOTHROYD** (2004). "Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress." Int J Parasitol **34**(3): 361-368.

**ARRIZABALAGA, G., F. RUIZ, ET AL.** (2004). "Ionophore-resistant mutant of *Toxoplasma gondii* reveals involvement of a sodium/hydrogen exchanger in calcium regulation." J Cell Biol **165**(5): 653-662.

**BADGER, A. M., J. S. HUTCHMAN, ET AL.** (1987). "Activation of rat alveolar macrophages by gamma interferon to inhibit *Toxoplasma gondii in vitro*." J Leukoc Biol **42**(5): 447-454.

**BANCHEREAU, J. AND R. M. STEINMAN** (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.

**BARBOSA, H. M., M. SILVA, ET AL.** (2000). "Ultrastructural study of the TG180 murine sarcoma cell invasion by *Toxoplasma gondii*: comparison between *in vivo* and *in vitro* cell cultures." Mem Inst Oswaldo Cruz **95**(2): 265-270.

**BARBOSA, H. S.** (1999). "Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results?" Mem Inst Oswaldo Cruz **94 Suppl 1**: 153-154.

**BARBOSA, H. S., M. F. FERREIRA-SILVA, ET AL.** (2005). "Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization." J Parasitol **91**(1): 182-184.

**BARSOUM, R. S.** (2006). "Parasitic infections in transplant recipients." Nat Clin Pract Nephrol **2**(9): 490-503.

**BEHRENS, L., A. BENDER, ET AL.** (1997). "Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies - Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells." Brain **120**: 929-938.

**BEITING, D. P., S. K. BLISS, ET AL.** (2004). "Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*." Infect Immun **72**(6): 3129-3137.

**BEITING, D. P., L. F. GAGLIARDO, ET AL.** (2007). "Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta." J Immunol **178**(2): 1039-1047.

**BEITING, D. P., P. W. PARK, ET AL.** (2006). "Synthesis of syndecan-1 by skeletal muscle cells is an early response to infection with *Trichinella spiralis* but is not essential for nurse cell development." Infect Immun **74**(3): 1941-1943.

**BEKPEN, C., J. P. HUNN, ET AL.** (2005). "The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage." Genome Biol **6**(11): R92.

**BERTOLI, F., M. ESPINO, ET AL.** (1995). "A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome." Arch Pathol Lab Med **119**(3): 214-224.

**BEYER, T. V., N. V. SVEZHOVA, ET AL.** (2002). "Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem)." Cell Biol Int **26**(10): 861-871.

**BISMUTH, K. AND F. RELAIX** (2010). "Genetic regulation of skeletal muscle development." Exp Cell Res **316**(18): 3081-3086.

**BLACK, C. M., D. M. ISRAELSKI, ET AL.** (1989). "Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*." Immunology **68**(4): 570-574.

**BLACK, M. W., G. ARRIZABALAGA, ET AL.** (2000). "Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress." Mol Cell Biol **20**(24): 9399-9408.

**BLACK, M. W. AND J. C. BOOTHROYD** (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 607-623.

**BLADER, I. J., I. D. MANGER, ET AL.** (2001). "Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells." J Biol Chem **276**(26): 24223-24231.

**BLADER, I. J. AND J. P. SAEIJ** (2009). "Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence." APMIS **117**(5-6): 458-476.

**BOEHM, U., L. GUETHLEIN, ET AL.** (1998). "Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma." J Immunol **161**(12): 6715-6723.

**BOEHM, U., T. KLAMP, ET AL.** (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.

**BOGDAN, C., M. ROLLINGHOFF, ET AL.** (2000). "The role of nitric oxide in innate immunity." Immunol Rev **173**: 17-26.

**BOGDAN, C., Y. VODOVOTZ, ET AL.** (1994). "Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages." J Leukoc Biol **55**(2): 227-233.

**BOHNE, W., J. HEESEMANN, ET AL.** (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**(5): 1761-1767.

**BOHNE, W., M. HOLPERT, ET AL.** (1999). "Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Immunobiology **201**(2): 248-254.

**BRUSCHI, F. AND L. CHIUMIENTO** (2011). "*Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy?" Parasit Vectors **4**(1): 42.

**BOYER, K. M., E. HOLFELS, ET AL.** (2005). "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening." Am J Obstet Gynecol **192**(2): 564-571.

**BREDT, D. S. AND S. H. SNYDER** (1994). "Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium." Neuron **13**(2): 301-313.

**BRUNET, L. R.** (2001). "Nitric oxide in parasitic infections." Int Immunopharmacol **1**(8): 1457-1467.

**BUCKINGHAM, M. E.** (1985). "Actin and myosin multigene families: their expression during the formation of skeletal muscle." Essays Biochem **20**: 77-109.

**BUFFOLANO, W., R. E. GILBERT, ET AL.** (1996). "Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples." Epidemiol Infect **116**(3): 347-351.

**BURATTINI, S., P. FERRI, ET AL.** (2004). "C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization." Eur J Histochem **48**(3): 223-233.

**BUTCHER, B. A., R. I. GREENE, ET AL.** (2005). "p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages." Infect Immun **73**(6): 3278-3286.

**BUTCHER, B. A., L. KIM, ET AL.** (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**(4): 2193-2201.

**BUXTON, D.** (1990). "Toxoplasmosis." Practitioner **234**(1481): 42-44.

**CALDAS, L. A., W. DE SOUZA, ET AL.** (2007). "Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion." Vet Parasitol **147**(3-4): 210-220.

**CARLOW, D. A., S. J. TEH, ET AL.** (1998). "Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases." J Immunol **161**(5): 2348-2355.

**CARRUTHERS, V. B., S. HAKANSSON, ET AL.** (2000). "*Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment." Infect Immun **68**(7): 4005-4011.

**CARRUTHERS, V. B. AND F. M. TOMLEY** (2008). "Microneme proteins in apicomplexans." Subcell Biochem **47**: 33-45.

**CARVAJAL, J. J. AND P. W. RIGBY** (2010). "Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle." Exp Cell Res **316**(18): 3014-3018.

**CÉRAVOLO, I. P., A. C. CHAVES, ET AL.** (1999). "Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway." Infect Immun **67**(5): 2233-2240.

**CHANNON, J. Y., R. M. SEGUIN, ET AL.** (2000). "Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes." Infect Immun **68**(8): 4822-4826.

**CHAO, C. C., G. GEKKER, ET AL.** (1994). "Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines." J Immunol **152**(3): 1246-1252.

**CHAO, C. C., S. HU, ET AL.** (1993). "Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3404-3410.

**CHARRON, A. J. AND L. D. SIBLEY** (2004). "Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*." Traffic **5**(11): 855-867.

**CHAVES, A. C., I. P. CERAVOLO, ET AL.** (2001). "IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma." Eur J Immunol **31**(2): 333-344.

**CHENG, M., M. H. NGUYEN, ET AL.** (2008). "Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration." Am J Physiol Cell Physiol **294**(5): C1183-1191.

**CHINCHILLA, M., O. M. GUERRERO, ET AL.** (1994). "Cockroaches as transport hosts of the protozoan *Toxoplasma gondii*." Rev Biol Trop **42**(1-2): 329-331.

**CHOI, W. Y., H. W. NAM, ET AL.** (1997). "Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis." J Infect Dis **175**(5): 1280-1282.

**COLLAZO, C. M., G. S. YAP, ET AL.** (2002). "The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments." Infect Immun **70**(12): 6933-6939.

**COLLAZO, C. M., G. S. YAP, ET AL.** (2001). "Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection." J Exp Med **194**(2): 181-188.

**COMMINS, S. P., L. BORISH, ET AL.** (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S53-72.

**COMMODARO, A. G., R. N. BELFORT, ET AL.** (2009). "Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 345-350.

**COOK, A. J., R. E. GILBERT, ET AL.** (2000). "Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis." BMJ **321**(7254): 142-147.

**CORK, R. J., M. L. PERRONE, ET AL.** (1998). "A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain." Prog Brain Res **118**: 37-50.

**DALPKE, A. H., S. OPPER, ET AL.** (2001). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs." J Immunol **166**(12): 7082-7089.

**DA SILVA, A. V. AND H. LANGONI** (2001). "The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR)." Vet Parasitol **97**(3): 191-198.

**DÄUBENER, W. AND C. R. MACKENZIE** (1999). "IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism." Adv Exp Med Biol **467**: 517-524.

**DE GROOTE, M. A. AND F. C. FANG** (1995). "NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide." Clin Infect Dis **21 Suppl 2**: S162-165.

**DEALTRY, G. B., M. S. NAYLOR, ET AL.** (1987). "DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-gamma." Eur J Immunol **17**(5): 689-693.

**DECHAMPS, C., C. IMBERTBERNARD, ET AL.** (1997). "*Toxoplasma gondii*: *In vivo* and *in vitro* cystogenesis of the virulent RH strain." Journal of Parasitology **83**(1): 152-155.

**DECKERT-SCHLÜTER, M., H. BLUETHMANN, ET AL.** (1998). "Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis." J Immunol **160**(7): 3427-3436.

**DEDIEU, S., G. MAZERES, ET AL.** (2002). "Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12." Int J Dev Biol **46**(2): 235-241.

**DELGADO, I., X. HUANG, ET AL.** (2003). "Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation *in vitro*." Genomics **82**(2): 109-121.

**DENKERS, E. Y. AND R. T. GAZZINELLI** (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-588.

**DENKERS, E. Y., L. KIM, ET AL.** (2003). "In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection." Cell Microbiol **5**(2): 75-83.

**DEROUICH-GUERGOUR, D., M. P. BRENIER-PINCHART, ET AL.** (2001). "Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections." Int J Parasitol **31**(8): 763-769.

**DEROUIN, F. AND H. PELLOUX** (2008). "Prevention of toxoplasmosis in transplant patients." Clin Microbiol Infect **14**(12): 1089-1101.

**DESPOMMIER, D. D.** (1998). "How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home?" Parasitol Today **14**(8): 318-323.

**DIMIER, I. H. AND D. T. BOUT** (1997). "Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells." Immunol Cell Biol **75**(5): 511-514.

**DOBBIN, C. A., N. C. SMITH, ET AL.** (2002). "Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide." J Immunol **169**(2): 958-965.

**DUBEY, J. P.** (1997). "Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*." J Eukaryot Microbiol **44**(6): 592-602.

**DUBEY, J. P.** (1998a). "Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **28**(7): 1019-1024.

**DUBEY, J. P.** (1998b). "Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues." Vet Parasitol **74**(1): 75-77.

**DUBEY, J. P.** (2003). "Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals." Korean J Parasitol **41**(1): 1-16.

**DUBEY, J. P. AND J. L. JONES** (2008). "*Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States." Int J Parasitol **38**(11): 1257-1278.

**DUBEY, J. P., D. S. LINDSAY, ET AL.** (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-299.

**DZIERSZINSKI, F., M. NISHI, ET AL.** (2004). "Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation." Eukaryot Cell **3**(4): 992-1003.

**EARNSHAW, W. C., L. M. MARTINS, ET AL.** (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.

**EL HAJJ, H., M. LEBRUN, ET AL.** (2007). "ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*." PLoS Pathog **3**(2): e14.

**ELMORE, S. A., J. L. JONES, ET AL.** (2010). "*Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention." Trends Parasitol **26**(4): 190-196.

**EU, J. P., J. SUN, ET AL.** (2000). "The skeletal muscle calcium release channel: coupled O2 sensor and NO signaling functions." Cell **102**(4): 499-509.

**FABRE, M. V., D. P. BEITING, ET AL.** (2009). "Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection." Vet Parasitol **159**(3-4): 245-248.

**FANG, L., B. J. NOWICKI, ET AL.** (2004). "Epithelial invasion by Escherichia coli bearing Dr fimbriae is controlled by nitric oxide-regulated expression of CD55." Infect Immun **72**(5): 2907-2914.

**FERGUSON, D. J.** (2004). "Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host." Int J Parasitol **34**(3): 347-360.

**FERREIRA-DA-SILVA MDA, F., R. M. RODRIGUES, ET AL.** (2009a). "Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 196-200.

**FERREIRA-DA-SILVA MDA, F., A. C. TAKÁCS, ET AL.** (2009b). "Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts." Int J Med Microbiol **299**(5): 381-388.

**FERREIRA DA SILVA MDA, F., H. S. BARBOSA, ET AL.** (2008). "Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*." Mol Biosyst **4**(8): 824-834.

**FIGARELLA-BRANGER, D., J. F. PELLISSIER, ET AL.** (1999). "Sequence of expression of MyoD1 and various cell surface and cytoskeletal proteins in regenerating mouse muscle fibers following treatment with sodium dihydrogen phosphate." J Neurol Sci **165**(2): 106-115.

**FILISETTI, D. AND E. CANDOLFI** (2004). "Immune response to *Toxoplasma gondii*." Ann Ist Super Sanita **40**(1): 71-80.

**FISCHER, B., D. COELHO, ET AL.** (2003). "Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **306**(2): 516-522.

**FLORQUIN, S., Z. AMRAOUI, ET AL.** (1994). "The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice." J Exp Med **180**(3): 1153-1158.

**FÖRSTERMANN, U., I. GATH, ET AL.** (1995). "Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control." Biochem Pharmacol **50**(9): 1321-1332.

**FRANCO, D. J., A. R. VAGO, ET AL.** (2003). "*Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat." Exp Parasitol **104**(1-2): 54-61.

**FRENKEL, J. K. AND J. P. DUBEY** (2000). "The taxonomic importance of obligate heteroxeny: distinction of Hammondia hammondi from *Toxoplasma gondii*--another opinion." Parasitol Res **86**(10): 783-786.

**FROST, R. A. AND C. H. LANG** (2008). "Regulation of muscle growth by pathogen-associated molecules." J Anim Sci **86**(14 Suppl): E84-93.

**FUJIGAKI, S., M. TAKEMURA, ET AL.** (2003). "The mechanism of interferon-gamma induced anti *Toxoplasma gondii* by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues." Adv Exp Med Biol **527**: 97-103.

**GARLEPP, M. J., W. CHEN, ET AL.** (1995). "Antigen processing and presentation by a murine myoblast cell line." Clin Exp Immunol **102**(3): 614-619.

**GAZZINELLI, R., Y. XU, ET AL.** (1992). "Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*." J Immunol **149**(1): 175-180.

**GAZZINELLI, R. T., F. T. HAKIM, ET AL.** (1991). "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine." J Immunol **146**(1): 286-292.

**GESSANI, S. AND F. BELARDELLI** (1998). "IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance." Cytokine Growth Factor Rev **9**(2): 117-123.

**GOEBEL, S., U. GROß, ET AL.** (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**(Pt 19): 3495-3505.

**GOEBELS, N., D. MICHAELIS, ET AL.** (1996). "Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis." J Clin Invest **97**(12): 2905-2910.

**GREEN, D. R. AND J. C. REED** (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.

**GROß, U.** (2004). "[Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **47**(7): 692-697.

**GROß, U. AND F. POHL** (1996). "Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*." Curr Top Microbiol Immunol **219**: 235-245.

**GUIMARÃES, E. V., L. CARVALHO, ET AL.** (2009). "Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 170-174.

**GUIMARÃES, E. V., L. DE CARVALHO, ET AL.** (2008). "Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis." J Parasitol **94**(1): 72-83.

**HALONEN, S. K., F. CHIU, ET AL.** (1998). "Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes." Infect Immun **66**(10): 4989-4993.

**HALONEN, S. K., G. A. TAYLOR, ET AL.** (2001). "Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP." Infect Immun **69**(9): 5573-5576.

**HASTY, P., A. BRADLEY, ET AL.** (1993). "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." Nature **364**(6437): 501-506.

**HAYASHI, S., C. C. CHAN, ET AL.** (1996). "Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis." J Immunol **156**(4): 1476-1481.

**HEGAB, S. M. AND S. A. AL-MUTAWA** (2003). "Immunopathogenesis of toxoplasmosis." Clin Exp Med **3**(2): 84-105.

**HEHLGANS, T. AND K. PFEFFER** (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology **115**(1): 1-20.

**HEMPHILL, A., N. VONLAUFEN, ET AL.** (2006). "Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*." Parasitology **133**(Pt 3): 261-278.

**HERION, P. AND R. SAAVEDRA** (1993). "Human T-cell clones as tools for the characterization of the cell-mediated immune response to *Toxoplasma gondii*." Res Immunol **144**(1): 48-51.

**HIDE, G., E. K. MORLEY, ET AL.** (2009). "Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*." Parasitology **136**(14): 1877-1885.

**HIEPE, T. AND R. BUCHWALDER** (1991). "[Autochthonous parasitic zoonoses--a current problem. 1: General aspects and protozoan-induced zoonoses]." Z Arztl Fortbild (Jena) **85**(24): 1179-1184.

**HILL, D. AND J. P. DUBEY** (2002). "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention." Clin Microbiol Infect **8**(10): 634-640.

**HOHLFELD, R. AND A. G. ENGEL** (1991). "Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies." Ann Neurol **29**(5): 498-507.

**HOHLFELD, R. AND A. G. ENGEL** (1994). "The immunobiology of muscle." Immunol Today **15**(6): 269-274.

**HOHMANN, H. P., R. REMY, ET AL.** (1989). "Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha)." J Biol Chem **264**(25): 14927-14934.

**HONORÉ, S., A. COUVELARD, ET AL.** (2000). "[Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]." Pathol Biol (Paris) **48**(6): 541-547.

**HOWE, D. K., B. C. SUMMERS, ET AL.** (1996). "Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*." Infect Immun **64**(12): 5193-5198.

**HUANG, F. P., W. NIEDBALA, ET AL.** (1998). "Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages." Eur J Immunol **28**(12): 4062-4070.

**HUGHES, S. M.** (1993). "Muscle development. Running out of control." Nature **364**(6437): 485.

**HUGHES, S. M., J. M. TAYLOR, ET AL.** (1993). "Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." Development **118**(4): 1137-1147.

**HUNN, J. P., S. KOENEN-WAISMAN, ET AL.** (2008). "Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*." EMBO J **27**(19): 2495-2509.

**HUNTER, C. A., L. BERMUDEZ, ET AL.** (1995). "Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*." Eur J Immunol **25**(4): 994-1000.

**HUNTER, C. A., C. S. SUBAUSTE, ET AL.** (1994). "The role of cytokines in toxoplasmosis." Biotherapy **7**(3-4): 237-247.

**IBRAHIM, H. M., H. BANNAI, ET AL.** (2009). "*Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces Bradyzoite conversion in a CCR5-dependent manner." Infect Immun **77**(9): 3686-3695.

**IDRISS, H. T. AND J. H. NAISMITH** (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." Microsc Res Tech **50**(3): 184-195.

**JOHNSON, L. L.** (1992a). "A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection." Infect Immun **60**(5): 1979-1983.

**JOHNSON, L. L.** (1992b). "SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections." Infect Immun **60**(9): 3719-3724.

**JOINER, K. A., S. A. FUHRMAN, ET AL.** (1990). "*Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts." Science **249**(4969): 641-646.

**JONES, E. M., D. G. COLLEY, ET AL.** (1993). "Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy." Am J Trop Med Hyg **48**(3): 348-357.

**JONES, J. L. AND J. P. DUBEY** (2010). "Waterborne toxoplasmosis--recent developments." Exp Parasitol **124**(1): 10-25.

**JOYNSON, D.H. M. UNDT. G. WREGHITT** (2001). „*Toxoplasma* infection in immunosuppressed (HIV-negative) patients.“ Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide Joynson D. H. M., Wreghitt T.G. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp 178–192

**KAMIJO, R., J. GERECITANO, ET AL.** (1995). "Generation of nitric oxide and clearance of interferon-gamma after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon-gamma receptor." J Inflamm **46**(1): 23-31.

**KANG, H., J. S. REMINGTON, ET AL.** (2000). "Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase." J Immunol **164**(5): 2629-2634.

**KAPPERUD, G., P. A. JENUM, ET AL.** (1996). "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway." Am J Epidemiol **144**(4): 405-412.

**KASPER, C. K.** (2004). "AIDS, hepatitis and hemophilia." J Thromb Haemost **2**(3): 516-518.

**KASPER, L. H. AND D. BUZONI-GATEL** (1998). "Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis." Parasitol Today **14**(4): 150-156.

**KELLER, C. W., C. FOKKEN, ET AL.** (2011). "TNF-alpha induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells." J Biol Chem **286**(5): 3970-3980.

**KELLER, P., F. SCHAUMBURG, ET AL.** (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**(2): 312-319.

**KHAMINETS, A., J. P. HUNN, ET AL.** (2010). "Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole." Cell Microbiol **12**(7): 939-961.

**KHAN, A., B. FUX, ET AL.** (2007). "Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14872-14877.

**KHAN, I. A., J. D. SCHWARTZMAN, ET AL.** (1997). "A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13955-13960.

**KIM, K. AND J. C. BOOTHROYD** (1995). "*Toxoplasma gondii*: stable complementation of sag1 (p30) mutants using SAG1 transfection and fluorescence-activated cell sorting." Exp Parasitol **80**(1): 46-53.

**KIM, S. K., A. E. FOUTS, ET AL.** (2007). "*Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling." J Immunol **178**(8): 5154-5165.

**KLAMP, T., U. BOEHM, ET AL.** (2003). "A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs." J Immunol **171**(3): 1255-1265.

**KLOETZEL, P. M. AND F. OSSENDORP** (2004). "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." Curr Opin Immunol **16**(1): 76-81.

**KOBZIK, L., M. B. REID, ET AL.** (1994). "Nitric oxide in skeletal muscle." Nature **372**(6506): 546-548.

**KÖNEN-WAISMAN, S. AND J. C. HOWARD** (2007). "Cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii* in mouse and man." Microbes Infect **9**(14-15): 1652-1661.

**KOOK, S. H., H. J. LEE, ET AL.** (2008). "Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK." Mol Cells **25**(4): 479-486.

**LALIBERTÉ, J. AND V. B. CARRUTHERS** (2008). "Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1900-1915.

**LAMBERT, H. AND A. BARRAGAN** (2010). "Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*." Cell Microbiol **12**(3): 292-300.

**LAMBERT, H., N. HITZIGER, ET AL.** (2006). "Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination." Cell Microbiol **8**(10): 1611-1623.

**LANG, C., M. ALGNER, ET AL.** (2006). "Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression." Microbes Infect **8**(8): 1994-2005.

**LANG, C., U. GROß, ET AL.** (2007). "Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **100**(2): 191-203.

**LANGERMANS, J. A., M. E. VAN DER HULST, ET AL.** (1992). "Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and Listeria monocytogenes in recombinant gamma interferon-treated mice." Infect Immun **60**(12): 5107-5112.

**LAVINE, M. D. AND G. ARRIZABALAGA** (2008). "Exit from host cells by the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* does not require motility." Eukaryot Cell **7**(1): 131-140.

**LEKUTIS, C., D. J. FERGUSON, ET AL.** (2001). "Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme." Int J Parasitol **31**(12): 1285-1292.

**LI, G., J. ZHANG, ET AL.** (2009). "The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates." Mol Biol Evol **26**(7): 1619-1630.

**LI, C. K. AND R. C. KO** (2001). "Inflammatory response during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections." Parasitol Res **87**(9): 708-714.

**LI, J.** (2002). "Nitric oxide synthase (NOS) coexists with activated neurons by skeletal muscle contraction in the brainstem of cats." Life Sci **71**(24): 2833-2843.

**LI, M. AND M. C. DALAKAS** (2000). "The muscle mitogen-activated protein kinase is altered in sporadic inclusion body myositis." Neurology **54**(8): 1665-1670.

**LIESENFELD, O.** (1999). "Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut." Immunobiology **201**(2): 229-239.

**LIESENFELD, O., H. KANG, ET AL.** (1999). "TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*." Parasite Immunol **21**(7): 365-376.

**LIGHTFOOT, A., A. MCARDLE, ET AL.** (2009). "Muscle in defense." Crit Care Med **37**(10 Suppl): S384-390.

**LINDSAY, D. S., J. P. DUBEY, ET AL.** (1991). "Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites." J Parasitol **77**(1): 126-132.

**LING, Y. M., M. H. SHAW, ET AL.** (2006). "Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages." J Exp Med **203**(9): 2063-2071.

**LIU, R. H. AND J. H. HOTCHKISS** (1995). "Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review." Mutat Res **339**(2): 73-89.

**LÜDER, C. G., M. ALGNER, ET AL.** (2003). "Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages." Int J Parasitol **33**(8): 833-844.

**LÜDER, C. G., M. GIRALDO-VELASQUEZ, ET AL.** (1999). "*Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation." Exp Parasitol **93**(1): 23-32.

**LÜDER, C. G. AND U. GROß** (2005). "Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **289**: 219-237.

**LÜDER, C. G., T. LANG, ET AL.** (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**(2): 308-316.

**LÜDER, C. G., R. R. STANWAY, ET AL.** (2009). "Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification." Int J Parasitol **39**(2): 163-173.

**LÜDER, C. G., W. WALTER, ET AL.** (2001). "*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**(5): 1475-1484.

**LUFT, B. J. AND J. S. REMINGTON** (1992). "Toxoplasmic encephalitis in AIDS." Clin Infect Dis **15**(2): 211-222.

**LYONS, C. R.** (1995). "The role of nitric oxide in inflammation." Adv Immunol **60**: 323-371.

**LYONS, R. E. AND A. M. JOHNSON** (1995). "Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*." Parasite Immunol **17**(7): 353-359.

**MACKENZIE, C. R., K. HESELER, ET AL.** (2007). "Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines." Curr Drug Metab **8**(3): 237-244.

**MACMICKING, J., Q. W. XIE, ET AL.** (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-350.

**MARIN-NETO, J. A., E. CUNHA-NETO, ET AL.** (2007). "Pathogenesis of chronic Chagas heart disease." Circulation **115**(9): 1109-1123.

**MARTENS, S. AND J. HOWARD** (2006). "The interferon-inducible GTPases." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 559-589.

**MARTENS, S., I. PARVANOVA, ET AL.** (2005). "Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases." PLoS Pathog **1**(3): e24.

**MARTENS, S., K. SABEL, ET AL.** (2004). "Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis." J Immunol **173**(4): 2594-2606.

**MCCABE, R. AND J. S. REMINGTON** (1988). "Toxoplasmosis: the time has come." N Engl J Med **318**(5): 313-315.

**MCCABE, R. E., B. J. LUFT, ET AL.** (1984). "Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis." J Infect Dis **150**(6): 961-962.

**MCHUGH, T. D., R. E. HOLLIMAN, ET AL.** (1994). "The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*." Parasitol Today **10**(7): 281-285.

**MELZER, T., A. DUFFY, ET AL.** (2008). "The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes." Infect Immun **76**(11): 4883-4894.

**MERCIER, C., K. D. ADJOGBLE, ET AL.** (2005). "Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?" Int J Parasitol **35**(8): 829-849.

**MICHAELIS, D., N. GOEBELS, ET AL.** (1993). "Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes." Am J Pathol **143**(4): 1142-1149.

**MILLER, C. M., N. R. BOULTER, ET AL.** (2009). "The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **39**(1): 23-39.

**MOLESTINA, R. E., T. M. PAYNE, ET AL.** (2003). "Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4359-4371.

**MONTARRAS, D., J. CHELLY, ET AL.** (1991). "Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis." New Biol **3**(6): 592-600.

**MONTOYA, J. G. AND O. LIESENFELD** (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-1976.

**MOORE, W. M., R. K. WEBBER, ET AL.** (1994). "L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." J Med Chem **37**(23): 3886-3888.

**MORDUE, D. G., S. HAKANSSON, ET AL.** (1999). "*Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways." Exp Parasitol **92**(2): 87-99.

**MORDUE, D. G., F. MONROY, ET AL.** (2001). "Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines." J Immunol **167**(8): 4574-4584.

**MOUDY, R., T. J. MANNING, ET AL.** (2001). "The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **276**(44): 41492-41501.

**NABESHIMA, Y., K. HANAOKA, ET AL.** (1993). "*Myogenin* gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect." Nature **364**(6437): 532-535.

**NAGARAJU, K., L. CASCIOLA-ROSEN, ET AL.** (2000). "The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells." J Immunol **164**(10): 5459-5465.

**NAGARAJU, K.** (2001). "Immunological capabilities of skeletal muscle cells." Acta Physiol Scand **171**(3): 215-223.

**NAGARAJU, K., N. RABEN, ET AL.** (1998). "A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli." Clin Exp Immunol **113**(3): 407-414.

**NAGINENI, C. N., K. PARDHASARADHI, ET AL.** (1996). "Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells." Infect Immun **64**(10): 4188-4196.

**NICHOLS, B. A., M. L. CHIAPPINO, ET AL.** (1983). "Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion." J Ultrastruct Res **83**(1): 85-98.

**NISSAPATORN, V.** (2009). "Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy." Southeast Asian J Trop Med Public Health **40**(6): 1158-1178.

**NOZAKI, K., M. A. MOSKOWITZ, ET AL.** (1993). "Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries." J Cereb Blood Flow Metab **13**(1): 70-79.

**OBERDORFER, C., O. ADAMS, ET AL.** (2003). "Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes." Adv Exp Med Biol **527**: 15-26.

**OLSON, E. N. AND W. H. KLEIN** (1994). "bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out." Genes Dev **8**(1): 1-8.

**OMATA, Y., R. KANO, ET AL.** (2005). "Development of *Neospora caninum* cultured with human serum *in vitro* and *in vivo*." J Parasitol **91**(1): 222-225.

**OSWALD, I. P., T. A. WYNN, ET AL.** (1992). "Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8676-8680.

**PACIELLO, O., A. D'ORAZI, ET AL.** (2004). "Expression of Major Histocompatibility Complex class I and II in a case of *Neospora caninum* myositis in a dog." Acta Myol **23**(3): 151-153.

**PAGE, G., G. CHEVREL, ET AL.** (2004). "Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells." Arthritis Rheum **50**(1): 199-208.

**PAPIC, N., J. P. HUNN, ET AL.** (2008). "Inactive and active states of the interferon-inducible resistance GTPase, Irga6, *in vivo*." J Biol Chem **283**(46): 32143-32151.

**PAPPAS, G., N. ROUSSOS, ET AL.** (2009). "Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis." Int J Parasitol **39**(12): 1385-1394.

**PARAMESWARAN, N. AND S. PATIAL** (2010). "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20**(2): 87-103.

**PAWLOWSKI, N., A. KHAMINETS, ET AL.** (2011). "The activation mechanism of Irga6, an interferon-inducible GTPase contributing to mouse resistance against *Toxoplasma gondii*." BMC Biol **9**: 7.

**PERDIGUERO, E., P. SOUSA-VICTOR, ET AL.** (2009). "Epigenetic regulation of myogenesis." Epigenetics **4**(8): 541-550.

**PERSSON, E. K., A. M. AGNARSON, ET AL.** (2007). "Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." J Immunol **179**(12): 8357-8365.

**PFEFFERKORN, E. R., M. ECKEL, ET AL.** (1986). "Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan." Mol Biochem Parasitol **20**(3): 215-224.

**PLEYER, U., N. TORUN, ET AL.** (2007). "[Ocular toxoplasmosis]." Ophthalmologe **104**(7): 603-615, quiz 616.

**PRAEFCKE, G. J. AND H. T. MCMAHON** (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 133-147.

**RADKE, J. R., M. S. BEHNKE, ET AL.** (2005). "The transcriptome of *Toxoplasma gondii*." BMC Biol **3**: 26.

**RANATUNGA, K. W.** (2010). "Force and power generating mechanism(s) in active muscle as revealed from temperature perturbation studies." J Physiol **588**(Pt 19): 3657-3670.

**REICHEL, M. P., J. T. ELLIS, ET AL.** (2007). "Neosporosis and hammondiosis in dogs." J Small Anim Pract **48**(6): 308-312.

**RIBEIRAO, M., V. L. PEREIRA-CHIOCCOLA, ET AL.** (2000). "Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase." Parasite Immunol **22**(1): 49-53.

**ROBAYE, B., R. MOSSELMANS, ET AL.** (1991). "Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells *in vitro*." Am J Pathol **138**(2): 447-453.

**ROBBEN, P. M., D. G. MORDUE, ET AL.** (2004). "Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype." J Immunol **172**(6): 3686-3694.

**ROGHMANN, M. C., C. T. FAULKNER, ET AL.** (1999). "Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland." Am J Trop Med Hyg **60**(5): 790-792.

**ROSTASY, K. M., M. PIEPKORN, ET AL.** (2004). "Monocyte/macrophage differentiation in dermatomyositis and polymyositis." Muscle & Nerve **30**(2): 225-230.

**ROZENFELD, C., R. MARTINEZ, ET AL.** (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**(4): 2047-2057.

**RYTEL, M. W. AND T. C. JONES** (1966). "Induction of interferon in mice infected with *Toxoplasma gondii*." Proc Soc Exp Biol Med **123**(3): 859-862.

**SACHS, L.** (1984). Angewandte Statistik 6. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokio

**SAEIJ, J. P., J. P. BOYLE, ET AL.** (2006). "Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis." Science **314**(5806): 1780-1783.

**SAEIJ, J. P., S. COLLER, ET AL.** (2007). "Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue." Nature **445**(7125): 324-327.

**SATO, S.** (2011). "The apicomplexan plastid and its evolution." Cell Mol Life Sci.

**SAYLES, P. C., G. W. GIBSON, ET AL.** (2000). "B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*." Infect Immun **68**(3): 1026-1033.

**SCHARTON-KERSTEN, T. M., G. YAP, ET AL.** (1997). "Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*." J Exp Med **185**(7): 1261-1273.

**SCHMIDT, H. H. W., KELM, M.** (1996). "Determiation of Nitrite and Nitrate by the Griess Reaction." Methods in Nitric Oxide Research Feelisch, M., Stamler, J. S. (Eds) John Wiley & Sons Ltd

**SCHWAB, J. C., C. J. BECKERS, ET AL.** (1994). "The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 509-513.

**SHAPIRA, S., O. S. HARB, ET AL.** (2005). "Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." J Cell Sci **118**(Pt 15): 3501-3508.

**SHER, A., I. P. OSWALD, ET AL.** (1993). "*Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha." J Immunol **150**(9): 3982-3989.

**SHIMIZU, T., S. NOMIYAMA, ET AL.** (1978). "Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties." J Biol Chem **253**(13): 4700-4706.

**SIBLEY, L. D.** (1993). "Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells." Semin Cell Biol **4**(5): 335-344.

**SIBLEY, L. D., L. B. ADAMS, ET AL.** (1991). "Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages." J Immunol **147**(7): 2340-2345.

**SIBLEY, L. D. AND J. W. AJIOKA** (2008). "Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps." Annu Rev Microbiol **62**: 329-351.

**SIBLEY, L. D., A. KHAN, ET AL.** (2009). "Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1530): 2749-2761.

**SKARIAH, S., M. K. MCINTYRE, ET AL.** (2010). "*Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion." Parasitol Res **107**(2): 253-260.

**SMALL, J. V. AND M. GIMONA** (1998). "The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell." Acta Physiol Scand **164**(4): 341-348.

**STAMLER, J. S. AND G. MEISSNER** (2001). "Physiology of nitric oxide in skeletal muscle." Physiol Rev **81**(1): 209-237.

**STEINFELDT, T., S. KÖNEN-WAISMAN, ET AL.** (2010). "Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*." PLoS Biol **8**(12): e1000576.

**STEWART, G. L. AND S. H. GIANNINI** (1982). "*Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Brugia*, *Ancylostoma*, and *Trichinella* spp.: a review of the intracellular parasites of striated muscle." Exp Parasitol **53**(3): 406-447.

**STEWART, G. L. AND C. P. READ** (1973). "Changes in RNA in mouse trichinosis." J Parasitol **59**(6): 997-1005.

**STREILEIN, J. W.** (1995). "Unraveling immune privilege." Science **270**(5239): 1158-1159.

**SUBAUSTE, C. S., A. H. KONIARIS, ET AL.** (1991). "Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells." J Immunol **147**(11): 3955-3959.

**SUZUE, K., T. ASAI, ET AL.** (2003). "*In vivo* role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens." Eur J Immunol **33**(10): 2666-2675.

**SUZUKI, Y.** (2002). "Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis." J Infect Dis **186 Suppl 2**: S234-240.

**SUZUKI, Y., F. K. CONLEY, ET AL.** (1989). "Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice." J Immunol **143**(6): 2045-2050.

**SUZUKI, Y., M. A. ORELLANA, ET AL.** (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." Science **240**(4851): 516-518.

**SUZUKI, Y., M. A. ORELLANA, ET AL.** (1993). "Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice." Infect Immun **61**(6): 2284-2288.

**SUZUKI, Y. AND J. S. REMINGTON** (1993). "Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment." Res Immunol **144**(1): 66-67.

**SWITAJ, K., A. MASTER, ET AL.** (2005). "Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections." Clin Microbiol Infect **11**(3): 170-176.

**TACHADO, S. D., P. GEROLD, ET AL.** (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway." J Immunol **156**(5): 1897-1907.

**TANG, D. D.** (2008). "Intermediate filaments in smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **294**(4): C869-878.

**TAYLOR, G. A.** (2007). "IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens." Cell Microbiol **9**(5): 1099-1107.

**TAYLOR, G. A., C. M. COLLAZO, ET AL.** (2000). "Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 751-755.

**TAYLOR, G. A., C. G. FENG, ET AL.** (2004). "p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens." Nat Rev Immunol **4**(2): 100-109.

**TAYLOR, S., A. BARRAGAN, ET AL.** (2006). "A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*." Science **314**(5806): 1776-1780.

**TEIXEIRA, M. M., R. T. GAZZINELLI, ET AL.** (2002). "Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection." Trends Parasitol **18**(6): 262-265.

**TENTER, A. M.** (2009). "*Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 364-369.

**TENTER, A. M., A. R. HECKEROTH, ET AL.** (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-1258.

**TORCHINSKY, M. B., J. GARAUDE, ET AL.** (2010). "Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger." Curr Opin Immunol **22**(1): 55-62.

**TRIPP, C. S., S. F. WOLF, ET AL.** (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3725-3729.

**UNNO, N., H. WANG, ET AL.** (1997). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats." Gastroenterology **113**(4): 1246-1257.

**VAGO, A. R., A. M. MACEDO, ET AL.** (1996). "Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues." Am J Pathol **149**(6): 2153-2159.

**VASSALLI, P.** (1992). "The pathophysiology of tumor necrosis factors." Annu Rev Immunol **10**: 411-452.

**VESPA, G. N., F. Q. CUNHA, ET AL.** (1994). "Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*." Infect Immun **62**(11): 5177-5182.

**VINEY, M. E., F. J. THOMPSON, ET AL.** (2005). "TGF-beta and the evolution of nematode parasitism." Int J Parasitol **35**(14): 1473-1475.

**VUTOVA, P., M. WIRTH, ET AL.** (2007). "*Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8." Cell Microbiol **9**(6): 1556-1570.

**WARRENS, A. N., J. Y. ZHANG, ET AL.** (1994). "Myoblasts fail to stimulate T cells but induce tolerance." Int Immunol **6**(6): 847-853.

**WEISS, L. M., D. LAPLACE, ET AL.** (1994). "Development of bradyzoites of *Toxoplasma gondii in vitro*." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 18S.

**WEISS, L. M. AND K. KIM** (2000). "The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*." Front Biosci **5**: D391-405.

**WEISS, L. M., Y. F. MA, ET AL.** (1998). "Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response." Infect Immun **66**(7): 3295-3302.

**WIDENER, G. L. AND P. D. CHENEY** (1997). "Effects on muscle activity from microstimuli applied to somatosensory and motor cortex during voluntary movement in the monkey." J Neurophysiol **77**(5): 2446-2465.

**WIENDL, H., L. BEHRENS, ET AL.** (2000). "Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G." Ann Neurol **48**(4): 679-684.

**WIENDL, H., R. HOHLFELD, ET AL.** (2005a). "Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment." Trends Immunol **26**(7): 373-380.

**WIENDL, H., R. HOHLFELD, ET AL.** (2005b). "Muscle-derived positive and negative regulators of the immune response." Curr Opin Rheumatol **17**(6): 714-719.

**WIENDL, H., M. MITSDOERFFER, ET AL.** (2003). "Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies." FASEB J **17**(13): 1892-1894.

**WU, Z., A. MATSUO, ET AL.** (2001). "Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spir*alis and *T. pseudospiralis* infection." Parasitology **123**(Pt 1): 85-94.

**WU, Z., L. SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC, ET AL.** (2008). "*Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair." Parasit Vectors **1**(1): 27.

**XIE, Q. W., H. J. CHO, ET AL.** (1992). "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages." Science **256**(5054): 225-228.

**XU, K. Y., D. L. HUSO, ET AL.** (1999). "Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 657-662.

**YAFFE, D. AND O. SAXEL** (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." Nature **270**(5639): 725-727.

**YAMAZAKI, F., T. KUROIWA, ET AL.** (1985). "Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme." Biochem J **230**(3): 635-638.

**YANO, A., F. AOSAI, ET AL.** (1989). "Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells." J Parasitol **75**(3): 411-416.

**YAP, G., M. PESIN, ET AL.** (2000). "Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*." J Immunol **165**(2): 628-631.

**YAP, G. S., T. SCHARTON-KERSTEN, ET AL.** (1998). "Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase *in vivo*." J Immunol **160**(3): 1340-1345.

**YAP, G. S. AND A. SHER** (1999). "Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*." J Exp Med **189**(7): 1083-1092.

**YOSHIDA, N., S. YOSHIDA, ET AL.** (1998). "Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of *MyoD* and *Myf-5* generates 'reserve cells'." J Cell Sci **111 ( Pt 6)**: 769-779.

**ZERRAHN, J., U. E. SCHAIBLE, ET AL.** (2002). "The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis." J Immunol **168**(7): 3428-3436.

**ZHANG, L., Y. YOSHIMURA, ET AL.** (1999). "Myogenic determination and differentiation of the mouse palatal muscle in relation to the developing mandibular nerve." J Dent Res **78**(8): 1417-1425.

**ZHAO, Y., D. J. FERGUSON, ET AL.** (2009a). "Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages." J Immunol **182**(6): 3775-3781.

**ZHAO, Y. O., A. KHAMINETS, ET AL.** (2009b). "Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFNgamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death." PLoS Pathog **5**(2): e1000288.

**ZHAO, Y. O., C. ROHDE, ET AL.** (2009c). "*Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 234-240.

**ZHOU, F.** (2009). "Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation." Int Rev Immunol **28**(3-4): 239-260.

**ZIMMERMANN, S., P. J. MURRAY, ET AL.** (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**(3): 1840-1847.

# 8. Curriculum vitae

**Name:** Anna Claudia Takács

**Geburtsdatum:** 14. April 1979 in Hamburg

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Ausbildung:**

| | |
|---|---|
| *Juli 1998* | Abitur an der Wichern-Schule Hamburg-Horn |
| *Sept. 1998-Aug. 2000* | Ausbildung zur staatlich geprüften biologisch-technischen Assistentin an der Bernd-Blindow-Schule, Bückeburg |
| *Okt. 2002-Juli 2007* | Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit Abschluss Diplom |
| *Sept. 2007-April 2011* | Promotion an der Georg-August-Universität Göttingen mit Abschluss „Doctor rerum naturalium“ |

**Wissenschaftlicher Werdegang:**

| | |
|---|---|
| *Okt. 2000-Sept. 2002* | Technische Assistentin in den Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, AG Zytoskelett von Prof. Dr. E. Mandelkow, in Hamburg. |
| *Jan. 2003-Mai 2004* | Studentische Hilfskraft bei PD Dr. E. Raz (Keimzell-entwicklung im Zebrafisch) am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie |
| *Juni 2004 - Dez. 2005* | Studentische Hilfskraft bei Dr. M. Schwab, Abteilung Neurogenetik von Prof. Dr. K.-A. Nave am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin |
| *April 2006 - Nov. 2006* | Studentische Hilfskraft bei Dr. G. Saher, Abteilung Neurogenetik von Prof. K.-A. Nave am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin |
| *Dez. 2006 – Juli 2007* | Diplomarbeit in der AG Molekulare Physiologie von Dr. R. Kühnlein in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie von Prof. Dr. H. Jäckle am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie |
| *Sept. 2007- April 2011* | Promotion am „Institut für Medizinische Mikrobiologie“ der Universitätsmedizin Göttingen. |

Forschungsgebiet: *Toxoplasma gondii* mit Schwerpunkt auf Parasit-Wirt-Interaktion. Titel der Dissertation: „IFN-γ-vermittelte Infektabwehr von *Toxoplasma gondii* in murinen Skelettmuskelzellen *in vitro*".

**Lehre:**

| | |
|---|---|
| *April / Mai 2006* | Betreuung des „Botanik Praktikums für Mediziner" am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen |
| *Nov. 2008, 2009 und 2010* | Methodenkurs „Western Blot" für den Master-Studiengang Molecular Biology |
| *April 2010* | Tutorial „Infectious diseases" für den Master-Studiengang Molecular Biology |

Vorträge und Poster:

| | |
|---|---|
| *Sept. 2008* | Vortrag „Mechanisms of differentiation and persistence of *Toxoplasma gondii* in skeletal muscle"<br>16th Japanese-German Cooperative on Protozoan Diseases |
| *März 2009* | Vortrag „Development and control of *Toxoplasma gondii* in permanent and primary skeletal muscle cells"<br>ToxoNet01-Meeting |
| *Okt. 2009* | Poster „Reduced replication of *Toxoplasma gondii* in skeletal muscle cells stimulated with IFN-γ *in vitro*"<br>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie |
| *März 2010* | Poster „Characterization of defence mechanisms of IFN-γ-stimulated skeletal muscle cells against *Toxoplasma gondii in vitro*"<br>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie |
| *Okt. 2010* | Poster „Analysis of defence mechanisms against *Toxoplasma gondii* triggered by IFN-γ in skeletal muscle cells *in vitro*"<br>National Symposium on Zoonoses Research |

**Publikation:**

**Ferreira-da-Silva Mda, F., A. C. Takács, et al.** (2009). "Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts." Int J Med Microbiol **299**(5): 381-388.