

**Zelltyp-spezifische Interaktionen von *Toxoplasma gondii*
und murinen Skelettmuskelzellen *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August Universität Göttingen

–

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Izabela Swierzy

aus Groß-Strehlitz

Göttingen, 2014

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Uwe Groß

(Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Medizinische Mikrobiologie)

Prof. Dr. Jörg Stülke

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Allgemeine Mikrobiologie)

Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Uwe Groß

(Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Medizinische Mikrobiologie)

Prof. Dr. Jörg Stülke

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Allgemeine Mikrobiologie)

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Stefanie Pöggeler

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Genetik eukaryotischer Mikroorganismen)

Prof. Dr. Rolf Daniel

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Genomische und Angewandte Mikrobiologie)

PD Dr. Stefan Irniger

(Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik)

Prof. Dr. Ernst A. Wimmer

(Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Entwicklungsbiologie)

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2014.....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter, Herrn Prof. Dr. Carsten Lüder für die Gelegenheit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken. Seine hervorragende Betreuung und seine wissenschaftlichen Anregungen, geduldigen Erklärungen und die konstruktiven Gespräche waren mir stets eine große Hilfe und Motivation. Ohne seine fortwährende Unterstützung wäre meine Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Uwe Groß danke ich herzlich für die wertvollen Anregungen, Unterstützung und die Übernahme des Referats meiner Doktorarbeit.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich ebenfalls herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Stülke bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den weiteren Mitgliedern meines Prüfungskomitees, Frau Prof. Dr. Stefanie Pöggeler, Herrn Prof. Dr. Rolf Daniel, Herrn PD Dr. Stefan Irniger und Herrn Prof. Dr. Ernst A. Wimmer, herzlich bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dirk Schlüter und Frau Dr. Ulrike Händel vom Institut für Medizinische Mikrobiologie in Magdeburg für die Bereitstellung der murinen Astrozyten und Neuronen für RNA-Sequenzierungsanalysen und die Überlassung benötigter Antikörper.

An dieser Stelle möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn Prof. Dr. Burkhard Morgenstern und Herrn M. Sc. Alexander Kaefer vom Institut für Mikrobiologie und Genetik (Abteilung für Bioinformatik) in Göttingen für die Auswertung der Transkriptomdaten bedanken.

Bei Frau Dipl.-Ing Maren Scharfe und Herrn Michael Jarek vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig möchte ich mich für die Durchführung der Transkriptomsequenzierungen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei B.Sc. Anja Abelmann und B.Sc. Jana Kroll bedanken, die mit ihren Forschungsergebnissen zu meiner Dissertation unterstützend beigetragen haben.

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. James Lessard vom Kinder-Krankenhaus Cincinnati (USA) für die freundliche Überlassung des Aktin-Antikörpers.

Für das tolle Arbeitsklima, den Spaß und die vielen Gespräche möchte ich mich liebevoll bei Jana Hegewald, Martin Thiele, Kristin Grauman, Ayu Dewi, und Maisalreem Muhammad bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich ebenfalls bei Anna Takács, Herrn Dr. Wolfgang Bohne und Herrn Dr. Raimond Lugert, Herrn Dr. Oliver Bader, Agnieszka, Iris und Sahra für ihre Hilfsbereitschaft und stets gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Michael einen liebevollen Dank aussprechen. Mit seiner unendlichen Geduld und innerlichen Ruhe war er mir, nicht nur während meiner Promotionszeit, eine riesige Unterstützung.

Szczególne podziękowanie kieruję także do moich rodziców i rodziny za wszelkie wsparcie i pomoc podczas moich studiów i pisanie tejże pracy. Dziękuję Wam!

Meine Arbeit wäre ohne die finanzielle Unterstützung des ToxoNet-Projektes durch das *Bundesministerium für Bildung und Forschung* nicht möglich gewesen. Hierfür bedanke ich mich herzlich.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungen	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIV
Formelverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Entwicklung von <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.1.2 Infektion mit <i>T. gondii</i>	3
1.1.2.1 Fleischverzehr-bedingte Infektion mit <i>T. gondii</i>	4
1.1.3 Zellinvasion und Stress-vermittelte Differenzierung von <i>T. gondii</i>	5
1.2 Skelettmuskelzellen – Entstehung <i>in vivo</i> und Charakteristika von C2C12-Muskelzellen <i>in vitro</i>	7
1.2.1 Terminale Skelettmuskeldifferenzierung – Zusammenspiel von Zellzyklusregulatoren, myogenen Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren von Signaltransduktionswegen.....	9
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> und SkMZ - eine Beziehung für immer?.....	10
1.3.1 Spontane Differenzierung von <i>T. gondii</i> in SkMZ <i>in vitro</i>	10
1.3.2 Immunantwort von SkMZ auf eine <i>T. gondii</i> -Infektion.....	11
1.4 Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit.....	13
2 Materialien und Methoden.....	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Chemikalien und Lösungen.....	14
2.1.2 Anzuchtmedien.....	17
2.1.3 Geräte	18
2.1.4 Kits	18
2.1.5 Zelllinien und Parasitenstämme	19
2.1.6 Angewendete Softwares und online Tools.....	19
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.8 Primer.....	20
2.1.9 Größenstandards für Gelelektrophorese.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 Passage von L929-Fibroblasten	23
2.2.1.2 Anzucht und Passage von <i>Toxoplasma gondii</i> - Parasiten.....	23
2.2.1.3 Passage von C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten.....	23
2.2.1.4 Terminale Differenzierung von einkernigen C2C12-Myoblasten zu polykernigen Myotuben	24

2.2.1.5	Auftauen und Einfrieren der Zellen	24
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1	Genomische DNA-Isolation.....	25
2.2.2.2	Gesamte RNA-Isolation	25
2.2.2.3	DNase I -Verdau	25
2.2.2.4	DNA- und RNA-Konzentrationsmessung.....	26
2.2.2.5	Reverse Transkription (cDNA Herstellung)	26
2.2.2.6	Real-Time qPCR – relative Quantifizierung von cDNA oder genomischer DNA	26
2.2.3	Genomweite Hochdurchsatz RNA-Sequenzierung.....	28
2.2.3.1	Bearbeitung der Zellen	28
2.2.3.2	RNA-Qualitätskontrolle	29
2.2.3.3	Infektionsanalyse.....	29
2.2.3.4	Ablauf der genomweiten Transkriptomanalyse	30
2.2.3.5	Analyse und statistische Auswertung der Transkriptomdaten	30
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.5	Untersuchungen zum Tspyl2-, ‚Knock-down‘ mittels RNA-Interferenz.....	31
2.2.5.1	<i>Escherichia coli</i> -Anzüchtung für Tspyl2-shRNA-pLKO.1- Plasmidisolation	33
2.2.5.2	<i>Escherichia coli</i> -Anzüchtung für die pLKO.1- puro- Plasmidisolation	33
2.2.5.3	Plasmidisolation	34
2.2.5.4	Transfektion von C2C12-Myoblasten mit isolierten pLKO.1-Plasmiden ...	34
2.2.6	Proteinisolation.....	35
2.2.7	SDS-PAGE.....	35
2.2.8	Western Blotting (Semi dry)	36
2.2.9	Immunfärbung von Nitrozellulosemembranen	36
2.2.10	Indirekter und direkter Immunfluoreszenztest	37
2.2.10.1	Fixierung der Zellen	38
2.2.10.2	Immundetektion	38
2.2.10.3	5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) – Einbau und Detektion	40
2.2.11	Statistische Analyse.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakterisierung von C2C12-Muskelzellen während Differenzierung <i>in vitro</i>	41
3.1.1	Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels Immunfluoreszenz	41
3.1.2	Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels Immunoblots	42
3.1.3	Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels RT-qPCR	43
3.1.4	Zellzyklusanalyse während der C2C12-Differenzierung mittels BrdU-Interkalation	44
3.1.5	Zusammenfassung	45
3.2	Untersuchungen zur <i>T. gondii</i> -Infektion von SkMZ und Fibroblasten.....	46
3.2.1	Zelltyp-bedingte Stadiendifferenzierung von <i>T. gondii</i>	46
3.2.1.1	Quantifizierung bradyzoitenspezifischer Gene mithilfe RT-qPCR	46

3.2.1.2	Nachweis von Gewebezysten mittels Doppelimmunfluoreszenz	47
3.2.2	Zelltyp-bedingte Unterschiede in der <i>T. gondii</i> -Replikation	49
3.2.2.1	Untersuchung der <i>T. gondii</i> -Replikation mittels qPCR	49
3.2.2.2	Untersuchung der <i>T. gondii</i> -Replikation mittels Immunfluoreszenz	50
3.2.3	Zusammenfassung	52
3.3	Serum-bedingte Regulation der terminalen Differenzierung und der <i>Toxoplasma gondii</i> -Entwicklung	52
3.3.1	Einfluss des Kälberserums auf die Myotubendifferenzierung	52
3.3.2	Einfluss unterschiedlicher Medien auf die <i>T. gondii</i> -Teilungsrate	53
3.3.2.1	Untersuchungen der <i>T. gondii</i> -Teilungsrate mittels qPCR	53
3.3.2.2	Untersuchung der <i>T. gondii</i> -Teilungsrate mittels Doppelimmun-fluoreszenz.	54
3.3.2.3	Zusammenfassung	56
3.4	Genomweite Transkriptionsanalysen zur Untersuchungen Zelltyp-spezifischer <i>T. gondii</i> -Wirtszell-Interaktionen	56
3.4.1	Untersuchungen zur Kontrolle der RNA-Qualität und der Infektion	57
3.4.1.1	Bestimmung des RNA-Degradierungsgrades	57
3.4.1.2	Qualitätskontrolle der Infektion mittels Doppelimmunfluoreszenz	58
3.4.1.3	Validierung der <i>T. gondii</i> -Infektionsstärke mittels RT-qPCR	58
3.4.2	Genomweite Transkriptomanalysen	59
3.4.2.1	Read Mapping	59
3.4.2.2	Bestimmung der Anzahl putativer muriner und parasitärer Transkripten ...	60
3.4.2.3	Auswertung der murinen Transkripte vor <i>T. gondii</i> -Infektion	61
3.4.2.4	Zusammenfassung	64
3.4.2.5	Transkriptome in unterschiedlichen Wirtszelltypen nach <i>T. gondii</i> -Infektion	65
3.4.2.5.1	Identifikation von differentiell exprimierten Genen nach <i>T. gondii</i> - Infektion	67
3.4.2.5.2	Verifizierung der RNA-Sequenzierungsergebnisse mittels qRT-PCR	67
3.4.2.5.3	Bioinformatische Analysen der durch <i>T. gondii</i> -Infektion regulierten Mus musculus-Transkripte	68
3.4.2.5.4	Zusammenfassung	75
3.4.2.5.5	Bioinformatische Analysen der <i>T. gondii</i> -Transkriptome	75
3.4.2.5.6	Zusammenfassung	79
3.5	Zelltyp-bedingte Regulation von Zellzyklusregulatoren während der <i>T. gondii</i> - Infektion	79
3.5.1	Expression von Zellzyklusregulatoren während der C2C12-Differenzierung	79
3.5.2	Expression von Zellzyklusregulatoren während der <i>T. gondii</i> -Infektion	82
3.5.3	Einfluss der <i>Toxoplasma gondii</i> -Infektion auf den SkMZ-Zellzyklusarrest in Myotuben	83
3.5.4	Zusammenfassung	84
3.6	Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von Tspyl2 für die <i>T. gondii</i> - Entwicklung in SkMZ	85
3.6.1	Tspyl2-„Knock-down“ in C2C12-SkMZ	86

3.6.2	Einfluss des Tspyl2-,Knock-downs‘ in C2C12-SkMZ auf die <i>T. gondii</i> -Entwicklung	89
3.6.3	Einfluss des Tspyl2-,Knock-downs‘ in C2C12-SkMZ auf die <i>T. gondii</i> -Stadiendifferenzierung	91
3.6.4	Zusammenfassung	93
3.7	Zelltyp-spezifische Aktivierung von MAP-Kinase- und Akt/PKB-Signalwegen während Infektion von SkMZ und Fibroblasten mit <i>Toxoplasma gondii</i>	94
3.7.1	Voruntersuchung zur Zelltyp-spezifischen Regulation der Proteinphosphorylierung während <i>Toxoplasma</i> -Infektion.....	94
3.7.2	Korrelation zwischen der <i>Toxoplasma</i> -Infektion und der Veränderung der Proteinphosphorylierung in SkMZ und Fibroblasten	95
3.7.3	Zusammenfassung	98
3.8	Zelltyp-spezifische Expression von Zytokinen und Chemokinen in <i>T. gondii</i> -infizierten SkMZ und Fibroblasten	98
3.8.1	Expression von Chemokinen und Zytokinen während <i>T. gondii</i> -Infektion	98
3.8.2	Einfluss von Differenzierungsmedium auf die Expression von Chemokinen und Zytokinen durch <i>T. gondii</i> -infizierte SkMZ.....	100
3.8.3	Zusammenfassung	102
4	Diskussion	104
4.1	<i>Toxoplasma gondii</i> in SkMZ - Analyse einer langlebigen Beziehung.....	104
4.2	Das C2C12-SkMZ – Modell zur Analyse der <i>T. gondii</i> - Infektion <i>in vitro</i>	105
4.3	Zelltyp- und Muskeldifferenzierungs-bedingte Unterschiede in der <i>T. gondii</i> -Stadienkonversion bzw. Replikation.....	107
4.3.1	Stadiendifferenzierung von <i>T. gondii</i> in SkMZ	107
4.3.2	Replikation von <i>T. gondii</i> in SkMZ	110
4.4	Analyse Zelltyp-spezifischer <i>T. gondii</i> -Wirtszell-Interaktionen mittels genomweiter Transkriptomanalysen	112
4.4.1	Zelltyp-bedingte Expression von Zellzyklusregulatoren nicht-infizierter Zellen ..	113
4.4.2	Zelltyp-bedingte Regulation von Zellzyklusregulatoren nach <i>T. gondii</i> - Infektion....	114
4.4.2.1	Zellzyklusregulation in anderen Zelltypen durch <i>T. gondii</i>	115
4.4.2.2	Zellzyklusregulation von Skelettmuskelzellen durch andere Parasiten	116
4.4.2.3	Modulation von Zellzyklusregulatoren in SkMZ durch <i>T. gondii</i> laut genomweiter Transkriptomanalysen	117
4.4.3	Tspyl2 – Vermittler der terminalen SkMZ-Differenzierung und <i>Toxoplasma</i> -Differenzierung	119
4.4.3.1	Regulation von Tspyl2 und anderer Zellzyklusregulatoren während terminaler C2C12-Differenzierung	121
4.4.3.2	Regulation von Tspyl2 und anderen Zellzyklusregulatoren während der <i>T. gondii</i> -Infektion	123
4.4.4	Regulation der <i>T. gondii</i> -Stadiendifferenzierung in Zellzyklus-arretierten SkMZ	125
4.4.4.1	Oberflächenrezeptoren - Invasion von differenzierten SkMZ durch <i>T. gondii</i>	125
4.4.4.2	Metabolische Eigenschaften der differenzierten SkMZ.....	127

4.4.4.3	Immunologische Kompetenz von differenzierten SkMZ.....	129
4.5	Ausblick	130
5	Zusammenfassung.....	133
5.1	Zusammenfassung.....	133
5.2	Summary	135
6	Literatur.....	139
	Erklärung.....	151
	Lebenslauf.....	152

Abkürzungen

α	Alpha
AP-1	“Activating Protein-1“ (engl.)
ATP	Adenosinotriphosphat
APC/C	Anaphase fördernder Komplex /Cyclosom
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BAG1	Bradyzoiten - spezifisches Gen 1
AG	Arbeitsgruppe
β	Beta
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridine
BSA	Rinderserum-Albumin (engl. Bovine Serum Albumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
χ	Chi
ca.	circa
cm	Zentimeter
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL-2	“(C-C motif) ligand 2” (engl.)
Cda-1	“Cell division autoantigen 1” (engl.)
Cdk's	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cp	„Crossing point“ (engl.)
Ca	Calcium
Cy2	Cyanin-Farbstoff 2
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
Cy5	Cyanin-Farbstoff 5
DBL	<i>Dolichos biflorans</i> -Lektin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium” (engl.)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ECL	„enhanced chemiluminescence“ (engl.)
ENO1	Enolase 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAK	„Focal Adhesion Kinase“ (engl.)
FCS	Fötales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
F	“forward” (engl.)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
g	relativen Zentrifugalkraft
γ	Gamma
GRA	Dichte Granula
h	Stunde (engl. hour)
HFF	„Human Foreskin Fibroblast“ (engl.)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen-System
hpi	Stunden nach Infektion (engl. hours post infection)
HS	Pferdeserum (engl. Horse Serum)
IFN- γ	Interferon- γ
IFT	Immunfluoreszenztest
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktoren (engl. Insulin-like growth factor 1)
IL-17D	Interleukin-17D
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-23	Interleukin-23
IL-6	Interleukin-6

iNOS	„Inducible nitric oxide synthase“ (engl.)
IRG	Immun-verwandte GTPase (engl. immunity-related GTPases)
kg	Kilogramm
kb	Kilobasen
LB	„Lysogeny broth“ (engl.)
LDH	Laktatdehydrogenase
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mA	Milliampere
MAPK	„Mitogen-activated protein kinase“ (engl.)
M	Molar
MHC	„Major Histocompatibility Complex“ (engl.)
MIC	Mikronemen (engl. micronemes)
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MPF	„Maturation/ Mitosis promoting factor“ (engl.)
MRF4	„Myogenic regulatory factor 4“ (engl.)
mRNA	„Messenger ribonucleic acid“ (engl.)
Myf-5	Myogener Faktor 5
Mg	Magnesium
MyHC	Myosin-Abschnitt schwere Kette (engl. Myosin Heavy Chain)
MyoD	Myogener Faktor 3
NO	Stickstoffmonoxid
N	Normalität
NaN ₃	Natriumazid
p21	Cdkn1a, Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1a
p27	Cdkn1b, Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1b
p53	Protein 53
PCNA	Proliferierendes Zellkern-Antigen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH (<i>potentia Hydrogenii</i>)-Wert
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PV	parasitophore Vakuole
qPCR	quantitative Real-Time PCR (konventionelle PCR)
Rb	Retinoblastoma
rcf	Relative Zentrifugalkraft
rpm	Umdrehungen pro Minute
RIN	RNA-Integritätsnummer
R	„reverse“ (engl.)
ROP	Rhoprien-Protein
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“ (engl.)
RPKM	„Reads per kilobase per million“ (engl.)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Real-Time PCR
SAG	„surface antigen“-Protein
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SkMZ	Skelettmuskelzelle
SRE	„Serum Response-Elemente“ (engl.)
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Toxoplasma</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl. Transforming Growth Factor β)
Th1	T-Helferzelle vom Typ1
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

TSPYL-2	“Testis-Specific Y-Encoded-Like Protein 2” (engl.)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
U	Einheit zur Angabe der Enzymaktivität (engl. Unit)
UV	Ultraviolettstrahlung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Lebenszyklus des Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Abbildung 1-2: Vereinfachte Darstellung der Myogenese in vivo.....	8
Abbildung 2-1: Aufteilung der L929-Zellen und Parasiten in 12-Napf Schalen.....	23
Abbildung 2-2: Darstellung des MISSION [®] pLKO.1-Plasmids.....	32
Abbildung 2-3: Darstellung des MISSION [®] pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA als Negativkontrolle.....	32
Abbildung 2-4: Schema der Anordnung von Papierfiltern, Gel und Nitrozellulosemembran zum Elektrotransfer von Proteinen.....	36
Abbildung 3-1: Nachweis der Expression und Lokalisation der myotubenspezifischen Proteinmarker Myosin Heavy Chain (MyHC; A-E) und Desmin (F-J) mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	41
Abbildung 3-2: Nachweis der skelettmuskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin sowie des Myotubenmarkers MyHC in C2C12- (links), nicht aber in NIH3T3 (rechts) -Zellen mittels Western Blot.	42
Abbildung 3-3: Mittlere Expression von mRNA der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD (schwarz), Myogenin (grau) und des Myotubenmarkers MyHC (weiß) im Laufe der C2C12- Differenzierung.....	43
Abbildung 3-4: Nachweis von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-markierter Zellkerne innerhalb der C2C12-Myotuben, Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Doppelimmunfluoreszenz.....	45
Abbildung 3-5: Quantifizierung der 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-positiven Zellkerne pro Sichtfeld bei C2C12- Myotuben (schwarz), -Myoblasten (grau) und NIH3T3-Fibroblasten (weiß).	45
Abbildung 3-6: Bestimmung der Expression von BAG1 (A) und ENO1 (B) in C2C12-Myotuben (schwarz), - Myoblasten (grau) und NIH3T3-Zellen (weiß) während der <i>Toxoplasma</i> -Infektion mittels RT-qPCR.	47
Abbildung 3-7: Nachweis von <i>Toxoplasma</i> -Gewebezysten innerhalb von C2C12-Myotuben (A-D), -Myoblasten (E-H) und NIH3T3-Fibroblasten (I-L) mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung.	48
Abbildung 3-8: Quantifizierung der Dolichos biflorans-Lektin (DBL)-positiven Zysten in Myotuben (schwarz), Myoblasten (grau) und Fibroblasten (weiß) zum Zeitpunkt 4, 48, 72, 96 Stunden nach Infektion mit <i>T.</i> <i>gondii</i>	49
Abbildung 3-9: Quantifizierung der <i>Toxoplasma</i> -Parasiten in C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲) mittels qPCR.	50
Abbildung 3-10: Immunfluoreszenzfärbung von <i>Toxoplasma gondii</i> NTE-Parasiten in C2C12-Myotuben (A-C), -Myoblasten (D-F) und NIH3T3-Fibroblasten (G-I) während 72-stündigen Infektion.	51
Abbildung 3-11: Bestimmung der mittleren Parasitenzahl pro PV innerhalb von C2C12-Myotuben (◆), - Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).	51
Abbildung 3-12: Bestimmung der MyHC-Genexpression in C2C12-Myotuben während Kultivierung in Differenzierungs- (schwarz) bzw. Wachstumsmedium (grau) mittels RT-qPCR.....	53
Abbildung 3-13: Bestimmung der Intensität der <i>Toxoplasma gondii</i> -Replikation in Myotuben während Inkubation in Wachstums- (gestrichelte Linie; ◆) bzw. Differenzierungsmedium (durchgezogene Linie, ◆) und in Myoblasten (durchgezogene Linie, ■) mittels quantitativer PCR.	54
Abbildung 3-14: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von <i>Toxoplasma</i> -Parasiten innerhalb unterschiedlich kultivierter C2C12-Myotuben (A-C versus D-F) sowie Myoblasten (G-I).	55
Abbildung 3-15: Bestimmung der mittleren Anzahl von <i>T. gondii</i> -Parasiten pro PV innerhalb vom C2C12- Myotuben, die in Differenzierungs- (durchgezogene Linie) bzw. Wachstumsmedium (gestrichelte Linie) kultiviert wurden (◆) und in Myoblasten (■).	55
Abbildung 3-16: RNA-Qualitätssicherung mittels Gelelektrophorese (links) und Bestimmung der RIN-Werte (rechts) der aus mehreren Infektionsversuchen gepoolten RNA-Proben.....	57
Abbildung 3-17: Qualitätssicherung der mit <i>Toxoplasma gondii</i> -infizierten Astrozyten, Neuronen, C2C12- Myotuben und NIH3T3-Fibroblasten mittels Doppelimmunfluoreszenz.	58
Abbildung 3-18: Graphische Darstellung der in Tabelle 16 aufgelisteten relativen Infektionsstärken für Astrozyten, Neuronen, SkMZ (C2C12) und Fibroblasten (NIH3T3) nach infektion mit <i>T. gondii</i>	59

Abbildung 3-19: Darstellung der Transkriptome von nicht-infizierten C2C12-SkMZ, Neuronen, Astrozyten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Heat-Map.	62
Abbildung 3-20: Heat-Map-Darstellung der Transkriptome von <i>T. gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten.	66
Abbildung 3-21: Darstellung der Ähnlichkeit der Transkriptome von <i>T. gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten mittels Dendrogramm. Die in der Abbildung 3-20 dargestellten Transkriptome wurden mittels MARVIS Software auf Ähnlichkeit untersucht und als Dendrogramm dargestellt. Je geringer die Distanz zwischen zwei Transkriptomen ist, desto ähnlicher sind sie.	66
Abbildung 3-22: Korrelation der Expressionsprofile von 14 ausgesuchten Wirtszellgenen nach Infektion unterschiedlicher Zelltypen mit <i>T. gondii</i>	68
Abbildung 3-23: Relative Expression von Bradyzoiten-spezifischer BAG1-mRNA in <i>T. gondii</i> -infizierten Astrozyten, Neuronen, C2C12-SkMZ und Fibroblasten.	76
Abbildung 3-24: Ermittlung der Tspyl2- (A) und der p21-Expression (B) mittels RT-qPCR sowie der p21-Proteinmenge (C) durch Immunoblot im zeitlichen Verlauf der terminalen C2C12-Differenzierung. C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (0 Stunden). Alle 48 Stunden wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und Tspyl2 sowie p21 cDNA mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert.	80
Abbildung 3-25: Ermittlung der p53-mRNA- (A) und Proteinmengen (B) mittel RT-qPCR beziehungsweise Immunoblot im zeitlichen Verlauf der terminalen C2C12-Differenzierung.	81
Abbildung 3-26: Ermittlung der Uhrf1- (A) und CyclinB1 (Ccnb1)-Expression (B) mittels RT-qPCR sowie der CyclinB1-Proteinmenge mittels Immunoblot (C) während terminaler C2C12-Differenzierung.	81
Abbildung 3-27: Bestimmung der mRNA-Mengen der negativen Zellzyklusregulatoren Tspyl2 (A) und p21 (B) sowie der Positivregulatoren Uhrf1 (C) und CyclinB1 (Ccnb1) (D) in <i>T. gondii</i> -infizierten (dunkle Balken) bzw. nicht-infizierten (helle Balken) C2C12-Myotuben (grau/schwarz), C2C12-Myoblasten (hellrot/rot) und NIH3T3-Fibroblasten (hellblau/blau) mittels RT-qPCR.	83
Abbildung 3-28: Quantifizierung der BrdU-positiven Zellkerne in C2C12-Myotuben (A), C2C12-Myoblasten (B) und NIH3T3-Fibroblasten (C) 24 Stunden (grau) und 48 Stunden (rot) nach Toxoplasma-Infektion oder Kontrollinkubation.	85
Abbildung 3-29: Nachweis von MyHC-Protein in Tspyl2-shRNA-Transfektanten vor und nach Induktion der Differenzierung in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium mittels Immunfluoreszenz.	87
Abbildung 3-30: Nachweis des MyHC-Proteins innerhalb der in Wachstumsmedium kultivierten Tspyl2-shRNA-C2C12-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	87
Abbildung 3-31: Nachweis des MyHC-Proteins innerhalb der im Differenzierungs- (HS) und Wachstumsmedium (FCS) kultivierten C2C12-Kontrolltransfektanten (A-D) und -Wildtypzellen (E-H) mittels Immunfluoreszenz.	88
Abbildung 3-32: Bestimmung der Tspyl2- (schwarz) bzw. p21- (grau) Expressionstärken (A) sowie der MyHC- und p21-Proteinmengen (B) in den Tspyl2-shRNA-C2C12-Transfektanten 1 und 2, Kontrolltransfektanten und Wildtyp-Myotuben mittels RT-qPCR und Western Blot.	88
Abbildung 3-33: Immunfluoreszenzfärbung von <i>T. gondii</i> (Stamm NTE) in C2C12 Tspyl2-shRNA Transfektanten 1 und 2 (A-C, D-F), C2C12-Kontrolltransfektanten (G-I), C2C12-WT-Myotuben (J-L) und C2C12-WT-Myoblasten (M-O) während Infektion für 72 Stunden.	90
Abbildung 3-34: Quantifizierung von <i>T. gondii</i> NTE-Parasiten nach Vermehrung in Tspyl2-shRNA 1- und 2-C2C12-Transfektanten (●, blau (Tspyl2-shRNA 1), rot (Tspyl2-shRNA 2)), C2C12-Kontrolltransfektanten (●, grau), C2C12-Myotuben (◆) und -Myoblasten (■) mittels qPCR.	90
Abbildung 3-35: Detektion von <i>T. gondii</i> bradyzoitenhaltigen Zysten in Tspyl2-knock down C2C12-Zellen (shRNA 1 und 2 Transfektanten, A-C, D-F), Kontrolltransfektanten (G-I), C2C12-Wildtyp-Myotuben (J-L) und -Myoblasten (M-O) mittels Dreifachimmunfluoreszenzfärbung.	92
Abbildung 3-36: Quantifizierung von Dolichos biflorans-Lektin (DBL)-positiven <i>T. gondii</i> Gewebezysten in Tspyl2-, Knock-down ^c -C2C12-Zellen (shRNA 1-Transfektante blau, shRNA 2 Transfektante rot),	

Kontrolltransfektante (grau), C2C12-Wildtyp-Myotuben (schwarz) und C2C12-WT-Myoblasten (braun) während der Infektion.....	92
Abbildung 3-37: Bestimmung der Expression von <i>T. gondii</i> bradyzoitespezifischem Antigen 1 (BAG1) in Tspyl2-shRNA C2C12-Transfektanten (●, blau (shRNA 1), rot (shRNA 2)), Kontrolltransfektanten (●, grau), C2C12-Myotuben (◆) und -Myoblasten (■) mittels RT-qPCR.	93
Abbildung 3-38: Nachweis der Phosphorylierung und der Gesamtmengen der Mitogen-aktivierten Kinasen p38, SAP, Erk1/2 sowie von Akt/PKB in <i>Toxoplasma</i> -infizierten und nicht-infizierten terminal differenzierten C2C12-Myotuben, C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Immunoblot.....	95
Abbildung 3-39: Quantifizierung der mittels Immunoblot detektierten phopshorylierten Proteinkinasen wie p38 (A), Akt (B), zwei SAPK-Isoformen (C, D) und, zwei Erk-Isoformen, Erk2 (p42, E) und Erk1 (p44, F) während der <i>Toxoplasma</i> -Infektion innerhalb der C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).	96
Abbildung 3-40: Quantifizierung der mittels Immunoblot detektierten phopshorylierten MAP-Kinasen p38 (A), Akt (B) und der Erk1/2-Isoformen (C, D) während der <i>Toxoplasma</i> -Infektion in C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).	97
Abbildung 3-41: Bestimmung der Transkriptmengen von Chemokinen (CCL-2, C) und Zytokinen (IFN- γ (A), IL-17D (B), IL-1 α (D), IL-1 β (E), IL-6 (F), IL-23 (G), TGF- β (H) und TNF α (I)) in <i>T. gondii</i> -infizierten (schwarz) und nicht-infizierten (grau) C2C12-Myotuben, C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels RT-qPCR.	100
Abbildung 3-42: Bestimmung der Transkriptionstärke variabler Chemokinen (CCL-2 (C)) und Zytokinen (IFN- γ (A), IL-17D (B), IL-1 α (D), IL-1 β (E), IL-6 (F), IL-23 (G), TGF- β (H) und TNF α (I)) in <i>T. gondii</i> -infizierten C2C12-Myotuben mittels qRT-PCR.	101
Abbildung 3-43: Einfluss von Pferdeserum (HS)- und Kälberserum (FCS)-haltigem Kulturmedium auf die Expression des Chemokins CCL-2 und der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, und IL-23 in <i>T. gondii</i> -infizierten (schwarz) und nicht-infizierten (grau) C2C12-Myotuben.	103
Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung der inhibierenden Wirkung von Tspyl2 auf die Zellteilung.	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der quantitativen Real-Time PCR eingesetzte Primer	20
Tabelle 2: Bandenmuster der Marker, welche zur Auftrennung von Proteinen (a, b) und von Desoxynukleinsäurefragmente (c, d) im Agarosegel eingesetzt wurden.	22
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes und Pipettierschema zur Vorbereitung der Proben für die Reverse Transkription.	26
Tabelle 4: Real-Time qPCR-Reaktionsansatz.	27
Tabelle 5: Real-Time qPCR-Programm für die Detektion eines Zielgens.	27
Tabelle 6: Die zur Wirtszellcharakterisierung und Infektionsanalyse angewendeten Primärantikörper	29
Tabelle 7: Diverse Sequenzen der shRNA-Fragmente, die gegen Tspyl2-mRNA gerichtet sind.	33
Tabelle 8: Zusammensetzung des SOB-Mediums.	34
Tabelle 9: Pipettierschema der Proben zur Transfektion von C2C12-Myoblasten mit pLKO.1-Plasmiden	35
Tabelle 10: In der Immunfärbung von Western Blot verwendete Primärantikörper.	37
Tabelle 11: Bei der Immunfärbung von Western Blots verwendete Sekundärantikörper.	37
Tabelle 12: Zellzahlen, die für Immunfluoreszenzfärbungen in 24-Napf Zellkulturplatten auf Glasplättchen ausgesät wurden.	38
Tabelle 13: Beim Immunfluoreszenztest eingesetzte primäre Antikörper.	39
Tabelle 14: Beim Immunfluoreszenztest eingesetzte sekundäre Antikörper	39
Tabelle 15: Transkription von den muskelspezifischen Genen <i>MyoD</i> , <i>Myogenin</i> und <i>MyHC</i> in C2C12-SkMZ während der terminalen Differenzierung.	44
Tabelle 16: Relative Infektionsraten von murinen C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Astrozyten und Neuronen mit <i>T. gondii</i>	59
Tabelle 17: Anzahl der Reads, die durch High-Throughput RNA-Sequenzierung in Toxoplasma-infizierten bzw. nicht-infizierten C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten identifiziert wurden.	60
Tabelle 18: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Anzahl der exprimierten <i>T. gondii</i> - und Mus musculus-Gene/ Transkripte in <i>T. gondii</i> -infizierten bzw. nicht-infizierten C2C12-SkMZ, NIH3T3- Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten.	61
Tabelle 19: Funktionelle Klassifizierung der Transkripte, welche die in SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten differentiell exprimierten Cluster 1, 2 und 3 bilden (siehe Abbildung 3-19).	64
Tabelle 20: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Expressionswerte verschiedener positiver und negativer Zellzyklusregulatoren in C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten vor Infektion mit <i>T. gondii</i>	65
Tabelle 21: Anzahl der Transkripte in C2C12-SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten, die aufgrund einer Toxoplasma-Infektion mindestens 2-fach hoch- bzw. runterreguliert wurden.	67
Tabelle 22: Verifizierung der durch RNA-Sequenzierung identifizierten Expressionsprofile von 14 ausgesuchten Genen in SkMZ, Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten nach Toxoplasma-Infektion mittels RT-qPCR.	68
Tabelle 23: Zusammenfassung der Gencluster, die in mindestens zwei Wirtszelltypen nach Toxoplasma- Infektion differentiell reguliert waren.	69
Tabelle 24: Zellzyklusregulatoren, deren Expression nach Infektion von SkMZ mit <i>T. gondii</i> im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen mindestens zweifach hochreguliert waren.	71
Tabelle 25: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die an der DNA-Replikation und der Replikationsinitiation beteiligt sind und nach Infektion von SkMZ mit <i>T. gondii</i> mindestens zweifach hochreguliert waren.	72
Tabelle 26: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die Zellproliferation sowie den Zellzyklus positiv regulieren und nach Infektion von SkMZ mit <i>T. gondii</i> mindestens zweifach hochreguliert waren.	74
Tabelle 27: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die Zellproliferation regulieren und nach Infektion von Neuronen mit <i>T. gondii</i> mindestens zweifach hochreguliert waren.	74
Tabelle 28: Immunregulatoren, die in Toxoplasma-infizierten C2C12-Myotuben (links) und Neuronen (rechts) mindestens zweifach nach Infektion hochreguliert waren und durch DAVID Cluster-Analyse identifiziert wurden.	74

Tabelle 29: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Expressionswerte (RPKM) der Bradyzoiten-spezifischen Gene BAG1, ENO1, LDH2 sowie der ‚Housekeeping-Gene‘ Aktin, Tubulin und GAPDH1 von <i>Toxoplasma gondii</i>	76
Tabelle 30: Funktionelle Gruppen von <i>Toxoplasma gondii</i> -spezifischen Transkripten, die in SkMZ, Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten 24 Stunden nach Infektion mittels genomweiter RNA-Sequenzierung detektiert und nach DAVID-Analyse in den Transkriptomen als signifikant angereichert identifiziert wurden ($p < 0,05$).	77
Tabelle 31: <i>Toxoplasma</i> -Gene der in Tabelle 30 hervorgehobenen funktionellen Gruppe, die ausschließlich in den Transkriptomen von infizierten SkMZ und Neuronen angereichert waren und an der Bildung von Nucleotiden und Nucleosiden, Nucleobasen und Nucleinsäuren beteiligt sind.	78
Tabelle 32: Funktionelle Gruppen von <i>Toxoplasma gondii</i> -spezifischen Transkripten, die spezifisch in SkMZ, Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten 24 Stunden nach Infektion mittels genomweiter RNA-Sequenzierung detektiert und nach DAVID-Analyse in den Transkriptomen als signifikant angereichert identifiziert wurden ($p < 0,05$).....	78

Formelverzeichnis

Formel 1: Normalisierung des Zielgens auf das ‚Housekeeping‘-Gen.	27
Formel 2: Bestimmung der Intensität der <i>Toxoplasma</i> -Replikation.	49

1 Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii stellt einen der bestuntersuchten Protozoen der Apicomplexa dar [Dubey et al., 1988]. Die erste Erwähnung von *T. gondii* stammt aus dem Jahr 1908, nachdem er in einem afrikanischen Nagetier, *Ctenodactylus gundi*, entdeckt wurde [Nicolle & Manceaux, 1908]. Sein evolutionärer Erfolg basiert unter anderem auf der Nutzbarmachung eines breiten Wirtsspektrums und der Entwicklung vielfältiger Strategien, den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entgehen und dadurch zu lebenslanger Persistenz im Wirt zu führen [Lüder et al., 1999]. Dies führt unter anderem dazu, dass circa 10-30 % der Weltbevölkerung von der Infektion betroffen ist. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Seroprävalenz und dem Alter der Infizierten. So steigt in der Bundesrepublik Deutschland die Wahrscheinlichkeit der Infektion proportional zum Alter der Person [Gross, 2004].

T. gondii-Parasiten werden einigen wenigen klonalen Genotypen zugeteilt, wobei in Europa und Nordamerika die Genotypen I, II und III vorherrschen. Die *Toxoplasma*-Stämme des Genotyps I sind durch ihre große Pathogenität in vielen Mausstämmen gekennzeichnet, während die Genotypen II und III weniger virulent sind [Sibley & Ajioka, 2008]. Viele andere Stämme werden als „atypisch“ bezeichnet. Die drei am besten untersuchten klonalen Linien I, II und III von *T. gondii* unterscheiden sich in circa 2% ihres Genoms [Howe & Sibley, 1995]. Darüber hinaus weisen sie nach der Invasion von Wirtszellen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit inklusive der Rosettenbildung von Tachyzoiten, auf. Dennoch besitzen die Parasiten der einzelnen Genotypen weitgehend dieselben Strukturmerkmale [Dubey et al., 1998].

Dardé [2008] zeigte, dass in Europa und den USA meist der Genotyp II prädominant ist. Präliminäre Studien konnten jedoch die Ausbreitung der Stämme I und III in Spanien [Fuentes et al., 2001] und Portugal [de Sousa et al., 2006] nachweisen. Die Stämme in Südamerika sind dagegen höchst divergent. Diese Divergenzen entstehen aufgrund spezifischer Polymorphismen und treten besonders im Bereich des Amazonas auf. Interessanterweise löst der *Toxoplasma*-Genotyp II in Südamerika selten eine Infektion aus [Dubey et al., 2006].

1.1.1 Entwicklung von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii tritt in dreierlei infektiösen Formen auf: eine Form, die außerhalb des Wirtes überleben kann (Oozyste) (Abbildung 1-1; 1) und zwei Formen, die zur weiteren Vermehrung und Persistenz die intrazelluläre Umgebung benötigen (Tachyzoiten und Bradyzoiten) (Abbildung 1-1; 3 und 4). Tachyzoiten und Bradyzoiten entstehen aufgrund asexueller Vermehrung (Endodyogenie), wobei die Tachyzoiten eine starke Vermehrungsrate aufweisen. Bradyzoiten hingegen sind langsam bis nicht replizierend und stellen eine latent persistierende Form des Parasiten dar, die durch einen stark verlangsamten Metabolismus gekennzeichnet ist.

Den Endwirt, in dem die sexuelle Vermehrung (Sporogonie) stattfindet, stellen die Katzen und Katzenartigen dar. Die Tachyzoiten befallen das Epithelium des Endwirdünndarms und differenzieren zu Mikro- und Makrogameten, die anschließend zur Zygote fusionieren, aus der sich die Oozyste bildet. Gelangen Oozysten mit den Fäzes in die Umgebung, sporulieren sie zu Umwelt-resistenten und infektiösen Sporozoiten. Sie können dann vom Zwischenwirt oral aufgenommen werden (Abbildung 1-1; 2, 6b). In epithelialen Zellen des Darms differenzieren sie wieder zu Tachyzoiten, die die akute Phase der Toxoplasmose auslösen. Tachyzoiten können in dieser Phase sämtliche Organe aktiv befallen (u. a. Leber, Nieren, Augen) (Abbildung 1-1; 3). Sie führen intrazellulär bis zu sechs Teilungen durch [Radke & White, 1998] und rupturieren anschließend die Wirtszelle, wobei neue Tachyzoiten freigesetzt werden [Gaji et al., 2011]. Die starke Vermehrung der Tachyzoiten und die damit verbundene Gewebeschädigung stellen für den immunsupprimierten Zwischenwirt eine Lebensgefahr dar. Eine starke zelluläre angeborene und adaptive Immunreaktion, u. a. die Entwicklung aktivierter T-Lymphozyten vom Th1-Typ, kontrolliert wiederum den Ausbruch der akuten Toxoplasmose. Die nicht eliminierten Tachyzoiten differenzieren auf bisher wenig untersuchte Signale hin zu Bradyzoiten, die eine persistierende Form des Parasiten darstellen (Abbildung 1-1; 4). Im Zwischenwirt verbleiben sie vermutlich lebenslang intrazellulär, umgeben von der stabilen Zystenwand, meistens innerhalb von (Herz)-Muskulatur sowie Augen- oder Gehirngewebe. Wird kontaminierte Muskulatur in Form von Fleisch vom Menschen verspeist (Abbildung 1-1; 6a) erfolgt eine erneute Infektion von Zwischenwirten. Die Bradyzoiten gehen nach der Magenpassage und Infektion von Darmepithelzellen in Tachyzoiten über und befallen erneut die Organe (Abbildung 1-1; 9). Fallen jedoch infizierte Säugetiere oder Vögeln dem Endwirt zum Opfer, wird der Lebenszyklus von *T. gondii* vervollständig und die sexuelle Vermehrung des Parasiten erneut eingeleitet (Abbildung 1-1; 5).

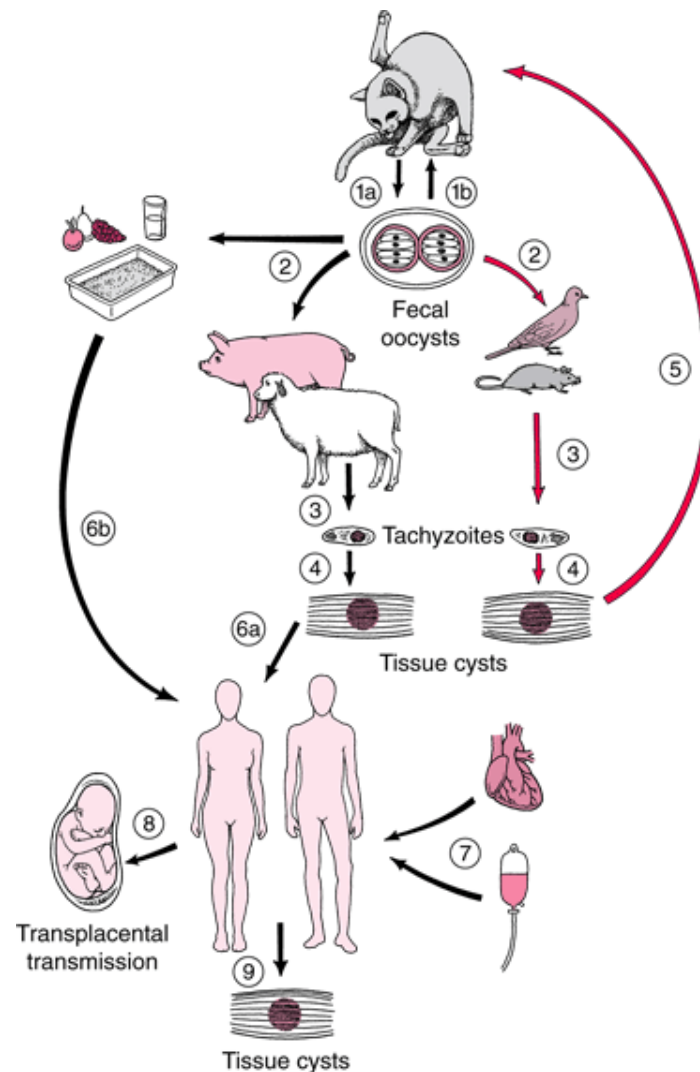


Abbildung 1-1: Lebenszyklus des Parasiten *Toxoplasma gondii*.

Die sexuelle Phase in der Entwicklung von *Toxoplasma* findet in Katzenartigen statt. Die dabei entstehenden Oozysten werden mit den Fäzes in die Umgebung abgesetzt. Ihre orale Aufnahme von Zwischenwirten (Säugetiere, Vögel) (2, 6b) führt zur Tachyzoitendifferenzierung und -vermehrung (3) und anschließend aufgrund bisher unvollständig verstandener Signale (u. a. Immunantwort) zur Bradyzoitenbildung (4), die im Laufe einer asexuellen Entwicklung entstehen. Frisst eine Katze ein infiziertes Nagetier oder einen Vogel, kommt es zur Vervollständigung des *Toxoplasma*-Lebenszyklus (5). Andere Möglichkeiten einer Infektion mit *T. gondii* stellen die orale Aufnahme des mit persistierenden Bradyzoiten kontaminierten Fleisches (6a), eine Organtransplantation, eine Bluttransfusion (7) oder ein direkter Tachyzoitenübergang auf den Fötus dar (8). Die Abbildung wurde dem "Merck Manual of Diagnosis and Therapy" [Robert et al., 2011] entnommen.

1.1.2 Infektion mit *T. gondii*

Die Infektion des Menschen mit *Toxoplasma* kann durchaus mehrere Ursachen haben. Zum einen können infektiöse Sporoziten über kontaminierte Lebensmittel und Wasser oder über den Kontakt mit Erde oral aufgenommen werden (Abbildung 1-1; 2, 6b) [Jones & Dubey, 2012; Tenter, 2009; Kapperud et al., 1996]. Zum anderem können Tachyzoiten bei einer Erstinfektion der Schwangeren auf dem vertikalen Übertragungsweg die placentaren Zellen durchqueren und darauf folgend den Fötus befallen (koninatale Toxoplasmose) (Abbildung 1-1, 8) [Pappas et al., 2009]. Dies kann eine geistige Behinderung, körperliche Missbildungen

(Hydrocephalus), schwere Gewebszerstörung (toxoplasmatische Enzephalitis) oder sogar den Tod des Fötus zur Folge haben [Gross, 2004].

Gelangen Tachyzoiten allein oder aber zusammen mit Bradyzoiten über eine Bluttransfusion oder eine Organtransplantation in den Körper einer immunsupprimierten Person (Abbildung 1-1; 7), kann die dadurch ausgelöste Toxoplasmose aufgrund des geschwächten Immunsystems ebenfalls lebensgefährlich sein [Nissapatorn, 2009; Derouin & Pelloux, 2008; Barsoum, 2006].

Des Weiteren stellt die orale Aufnahme von ungenügend gegartem Fleisch chronisch infizierter Zwischenwirte durch Menschen einen der Hauptübertragungswege der Toxoplasmose dar.

1.1.2.1 Fleischverzehr-bedingte Infektion mit *T. gondii*

Mit der Persistenz innerhalb von neuronalem oder muskulärem Gewebe von Nagetieren bzw. Vögeln wird maßgeblich die Übertragung auf den Endwirt und die sexuelle Vermehrung in Katzenartigen sichergestellt. Im Gegensatz dazu ist die Infektion des Menschen für die sexuelle Entwicklung des Parasiten per se irrelevant. Werden jedoch potentielle Zwischenwirte, die uns als eine Nahrungsquelle dienen wie z.B. Schweine, Schafe, Ziegen oder Vögel infiziert, stellt dies eine Gefahr für den Menschen dar. Die Aufnahme von mit Bradyzoiten kontaminiertem Fleisch oder Fleischprodukten wird als eine der größten Infektionsquellen für den Menschen mit *T. gondii* angenommen [Tenter, 2009; Dzierszinski et al., 2004; Ferguson, 2004; Tenter et al., 2000].

Deutlich wurde dies durch eine multizentrische europäische Studie gezeigt. Der Anteil der konnatalen Toxoplasmosefälle aufgrund des Verzehrs von mit Zysten kontaminiertem rohem oder ungegartem Fleisch wurde auf 30 bis 63% geschätzt [Cook et al., 2000]. Ebenfalls stellt gepökeltes Fleisch ein Risiko bezüglich der Übertragung von *Toxoplasma* dar [Cook et al., 2000; Roghman et al., 1999; Kapperud et al., 1996]. Dies ist nicht nur für die davon betroffenen Föten und Kinder lebensgefährlich, sondern weist auch deutlich auf die Bedeutung der Skelettmuskeln für die Übertragung von *Toxoplasma* auf den Menschen hin.

Der Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie bezifferte die Höhe des Verzehrs von Schweinefleisch im Jahr 2011 auf 39 kg pro Person. Schweine stehen damit an der ersten Stelle der Fleisch-liefernden Haustiere, gefolgt von Geflügel mit 11,2 kg pro Person und Rindfleisch mit 9 kg pro Person und Jahr. Ludewig et al. [2007] zeigten, dass die *Toxoplasma*-Seroprävalenz bei Schweinen deutschlandweit zwischen einzelnen

Mastbetrieben und Bundesländern variiert und zwischen 2,8% bei Mastschweinen und 31,6% bei Sauen beträgt. Diese Unterschiede in der Seroprävalenz von *Toxoplasma* sind auf das Alter der Tiere, die Hygienemaßnahmen und die Art der Tierhaltung zurückzuführen.

Jones und Dubey [2012] haben die Daten zur Bradyzoitendetektion bei Tieren und Fleischproben aus zahlreichen in den USA durchgeführten Analysen zusammengefasst. Je nach Region waren Schweinefleischproben bis zu 92% *Toxoplasma* positiv, was mit Hilfe der Bradyzoiten-Isolation und des anschließend durchgeführten Bioassays ermittelt wurde. In Europa und den USA wird Schweinefleisch als die Hauptinfektionsquelle für die Toxoplasmose-Übertragung auf den Menschen angesehen [Jones & Dubey, 2012; Tenter et al., 2000].

Der Verzehr von mit Bradyzoiten kontaminiertem Geflügelfleisch spielt vermutlich ebenfalls eine große Rolle bei der Epidemiologie der Humaninfektion mit *T. gondii* [Dubey et al., 2005]. Eine Studie zur Seroprävalenz in Hühnern zeigte, dass 66% der untersuchten Tiere Träger von *Toxoplasma*-Antikörpern waren [Aigner et al., 2010; Dubey et al., 2006]. Interessanterweise hängt die Seroprävalenz, wie bei Schweinen, von der Art der Tierhaltung ab, wobei Freilandhühner sogar bis zu 100% infiziert sein können [Dubey, 2010a].

Dubey et al. [2010a] fasste verschiedene Ergebnisse von Untersuchungen zur Verteilung der Zysten im Geflügel zusammen, die in Südamerika, den USA und Portugal durchgeführt wurden. Er konnte zeigen, dass Herz (89,5%), Gehirn (49,2%) und Oberschenkel (44,1%) am häufigsten betroffen waren. Somit kann der Verzehr von ungenügend gekochtem Eingeweide und von Fleisch zur Übertragung der Toxoplasmose beim Menschen beitragen.

1.1.3 Zellinvasion und Stress-vermittelte Differenzierung von *T. gondii*

Werden Bradyzoiten-haltige Zysten zusammen mit Fleisch vom Menschen oral aufgenommen, differenzieren die Bradyzoiten nach Infektion von Darmepithelzellen rasch in die aktiv replizierenden Tachyzoiten. Anschließend folgt eine Verbreitung der Tachyzoiten im Körper bei paralleler Infektion möglichst vieler ein- und mehrkernigen Zellen. Bei der Invasion spielen die Mikronemen-Proteine MIC1-4 und 6-9 eine besondere Rolle, die an extrazelluläre Proteine wie Kollagene, Laminine und Heparansulfatproteoglykane der Wirtszellen binden [Carruthers, 2002; Tuckwell et al., 1993].

Während der Wirtszellpenetration führt der Parasit Gleitbewegungen aus (‘Gliding motility’), die mit weiteren Nachbohrungen des konoidalen Teils fortgesetzt werden. Dabei wird der

Inhalt von Mikronemen, Rhoptrien (ROPs) und von dichten Granula (GRAs) der *Toxoplasma* sequentiell freigesetzt, wobei Rhoptrien- und dichte Granula-Proteine auch zur Bildung der parasitophoren Vakuole (PV) beitragen [Laliberté & Carruthers, 2008]. Deren Membran besteht aus Phospholipiden und Proteinen, die aus Parasiten und Wirtszellen stammen. Erstaunlich ist jedoch die Fähigkeit der PV, den lysosomalen Enzymen der Wirtszelle [Mordue et al., 1999] und der Azidifizierung zu entgehen [Sibley et al., 1985]. Dennoch können Proteine bis ca. 1300 Da sowie Stoffwechselprodukte des Parasiten und Nährstoffe der Wirtszelle die Membran unbeschwert passieren [Schwab et al., 1994]. Außerdem rekrutieren PV von Typ I-Parasiten die Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (ER) seiner Wirtszellen [Sinai et al., 1997].

Es wird vielfach angenommen und ist in verschiedenen Zellmodellen gut dokumentiert, dass die Induktion von Stressfaktoren durch die Wirtszelle oder der Umgebung die Differenzierung zum Bradyzoiten fördert. Darauf folgend kommt es zur Reorganisation der parasitophoren Vakuole zu einer Gewebezyste, die 2 bis mehrere hundert Bradyzoiten beherbergen kann. Der Metabolismus von Bradyzoiten ist stark eingeschränkt und der Parasit ist imstande, lebenslang innerhalb des Wirtes zu persistieren [Dubey et al., 1998].

Einer der meist untersuchten „natürlichen“ Stimulatoren der Bradyzoitenentstehung ist die Antwort des Immunsystems auf die Infektion mit *Toxoplasma* [Gross et al., 1996]. Dass das Immunsystem bei der Stabilisierung der Gewebezyste eine bedeutsame Rolle spielt, zeigt die Tatsache, dass Bradyzoiten in immunsupprimierten Menschen zu Tachyzoiten übergehen können und die lebensbedrohliche reaktivierte Toxoplasmose auslösen können. Ferreira da Silva et al. [2008] haben zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Modelle zusammengefasst, in denen unterschiedliche Stressfaktoren zur Bradyzoitenstimulation bei unterschiedlichen *T. gondii*-Stämmen eingesetzt wurden.

Zum Beispiel können proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ die Bradyzoitenbildung hervorrufen [Bohne et al., 1994]. IFN- γ induziert die iNOS (inducible nitric oxide synthase)-abhängige NO-Produktion, Tryptophanmangel oder die Expression von IRGs (p47 GTPasen), die *in vivo* und *in vitro* starke antiparasitäre Wirkung entfalten [Blader & Saeij, 2009; Collazo et al., 2001; Pfefferkorn, 1984]. Die IFN- γ -induzierte antiparasitäre Wirkung wird durch TNF α (z.B. über eine LPS-Stimulation) verstärkt. Interessanterweise hängt der IFN- γ -Einfluss auf die Bradyzoitenbildung vom Zelltyp und dem *Toxoplasma*-Stamm ab [Takács et al., 2012; Bohne et al., 1993b]. Des Weiteren steigert Interleukin-6 die Zystenbildung von *T. gondii* in humanen Fibroblasten *in vitro* [Weiss et al., 1995].

Sehr effektive Stressfaktoren, die allerdings ausschließlich *in vitro* eine Rolle spielen, stellen ein alkalisches Medium (pH 8-8,2) [Soète & Dubremetz, 1996; Soète et al., 1994] als auch eine Temperaturerhöhung auf 43°C dar [Soète et al., 1994].

Viele chemische Stoffe induzieren die Expression Bradyzoiten-spezifischer Gene und in vielen, aber nicht allen Fällen, die Zystenbildung *in vitro*. Dabei handelt es sich beispielsweise um Chemotherapeutika wie Pyrimethamin [Bohne et al., 1994] oder Sulfadiazine, um Natriumarsenit [Soète et al., 1994] oder um mitochondriale Inhibitoren (Oligomycin, Antimycin A, Rotenone, Myxothiazol, Atovaquone) [Tomavo & Boothroyd, 1995; Bohne et al., 1994]. Es scheint daher ein Zusammenhang zwischen der Stress-induzierten *Toxoplasma*-Differenzierung und der mitochondrialen Funktion unter bestimmten Konditionen vorzuliegen. Darüber hinaus könnte die Bradyzoiten- und anschließende Zystenbildung von unterschiedlichen Checkpoints des parasitären Zellzyklus reguliert werden. Aus diesem Grund ist eine Induktion von bradyzoitenspezifischen Genen ohne darauf folgende Zystenformation möglich [Radke et al., 2003].

In humanen Fibroblasten wurde *in vitro* eine viel versprechende Wirkung von Compound 1 (ein trisubstituiertes Pyrrol) auf die Bradyzoitenbildung nachgewiesen. Compound 1 bewirkte in der Wirtszelle u. a. eine Transkription des negativen Zellzyklusregulators CDA-1 (Cell Division Autoantigen 1), der auf unbekannte Weise einen positiven Einfluss auf die *Toxoplasma*-Differenzierung ausübte [Radke et al., 2006].

Argininmangel ist ebenfalls ein Signal, welches erfolgreich die Replikation von virulenten und avirulenten *Toxoplasma*-Stämmen unterbricht und damit die Bradyzoitenbildung fördert [Fox et al., 2004]. Eine CO₂-Konzentrationsveränderung oder eine permanente sowie eine temporäre Steigerung von zyklischen Nukleotiden (cGMP, cAMP) sind ebenso positive Regulatoren der Stress-vermittelten *Toxoplasma*-Differenzierung [Kirkman et al., 2001].

1.2 Skelettmuskelzellen – Entstehung *in vivo* und Charakteristika von C2C12-Muskelzellen *in vitro*

Die Entstehung einer Skelettmuskelzelle beginnt mit der Bildung einer aus dem Mesoderm stammenden somatischen Zelle, die einer Reihe von molekularen Prozessen und weiteren Umstrukturierungen während der Myogenese *in vivo* ausgesetzt ist [Bentzinger et al., 2012].

Die somatischen Zellen werden zu einkernigen Myoblasten ausgebildet und anschließend zu mehrkernigen Myotuben *in vivo* terminal differenziert. Anschließend bilden die Myotuben die Sarkomere, die kleinste funktionelle Einheit der Myofibrille und somit der Muskulatur, *in*

in vivo aus [Bentzinger et al., 2012]. Neben Myoblasten entstehen Satellitenzellen, die Stammzellen jedes Muskels. Sie stellen eine besondere und mitotisch ruhende Art von Zellen dar, die aufgrund von Stress, wie einer Verletzung oder dem Verlust von neurotrophischen Faktoren, sich wieder aktiv teilen können und die Bildung neuer Myoblasten einleiten [Bentzinger et al., 2012; Burattini et al., 2004; Chargé & Rudnicki, 2004].

Ein *in vitro*-Modell der Myogenese stellt die murine Zelllinie C2C12 dar. Die terminale Differenzierung dieser Zellen wurde bereits gut etabliert und dokumentiert [Curci et al., 2008, Burattini et al., 2004], sodass C2C12-Zellen ihren Einsatz als Zellmodell für Infektionsanalysen mit *Toxoplasma* bereits gefunden haben [Takács et al., 2012].

Die 20-80 µm großen murinen C2C12-Myoblasten stellen adhärente, mononukleäre und fusiforme Zellen dar. Circa 50% der Myoblasten fusionieren während der terminalen Differenzierung zu multinukleären Myotuben (= Myozyten, Synzytien) [Yoshida et al., 1998], die morphologisch und funktionell differenzierten Muskelzellen *in vivo* ähneln. Die restlichen Zellen verbleiben vermutlich in einem ruhenden myoblastischen Zustand [Burattini et al., 2004]. Myotuben können mehr als 20 Zellkerne erhalten [Burattini et al., 2004].

Der Myogeneseprozess wird durch Helix-Loop-Helix Myogenese-regulierende Faktoren (MRF) gesteuert, von denen MyoD und Myf-5 (primäre MRF), sowie MRF4 und Myogenin (sekundäre MRF) zu den bestuntersuchten Regulatoren gehören (Abbildung 1-2). MyoD stimuliert die Transkription muskelspezifischer Gene und vermittelt einen Skelettmuskelzellzyklusarrest [Tapscott, 2005]. Zusammen mit Myf-5 leitet es die Entwicklung einer Myoblastenzelle ein. Diese aktivieren darauffolgend die Proteine Myogenin und MRF4, welche essentiell für den finalen Muskeldifferenzierungsprozess sind [Sabourin & Rudnicki, 2000; Walsh & Perlman, 1997].

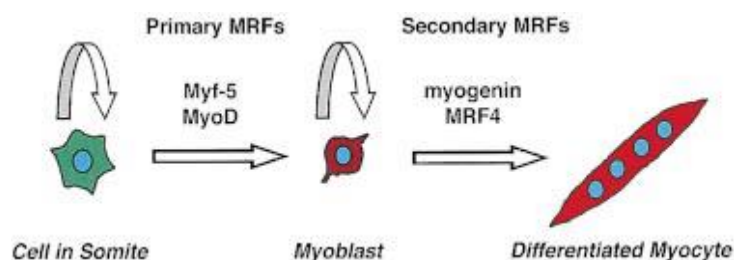


Abbildung 1-2: Vereinfachte Darstellung der Myogenese *in vivo*.

Somatische Zellen mesodermalen Ursprungs formen unter der Wirkung von primären Myogenese-regulierenden Faktoren (MRF) wie MyoD und Myf-5 die einkernigen Myoblasten. Anschließend fusionieren (differenzieren) sie, gesteuert von sekundären MRF wie Myogenin und MRF4, zu mehrkernigen Myotuben. Die Abbildung wurde Sabourin & Rudnicki [2000] entnommen.

1.2.1 Terminale Skelettmuskeldifferenzierung – Zusammenspiel von Zellzyklusregulatoren, myogenen Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren von Signaltransduktionswegen

Neben den in Abbildung 1-2 dargestellten Regulatoren sind weitere komplexe Systeme und Regulatoren an der Muskeldifferenzierung beteiligt. Bis letztendlich ausdifferenzierte Myotuben (Sarkomere) entstehen, stimulieren Liganden bestimmte Signaltransduktionswege, welche darauf folgend die Expression myogener Transkriptionsregulatoren und Zellzyklusregulatoren einleiten.

Der Zellzyklus einer Muskelzelle, so wie jeder anderen Zelle auch, besteht aus 4 Phasen, der G1-, S-, G2- und der M-Phase. Während der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf eine Duplikation des DNA-Strangs vor. In der darauf folgenden S-Phase findet eine DNA-Vervielfältigung statt. Es folgt die G2-Phase, in der die Zellgröße zunimmt, um die neu synthetisierten DNA-Moleküle während der Mitose auf die neuen Tochterzellen zu verteilen. Die G1-, S- und G2-Phasen werden gemeinsam als Interphase bezeichnet. Die Interphase stellt zusammen mit der Mitose einen vollen Zellzyklus dar [Shen et al., 2003].

Fehlen Wachstumsfaktoren, gehen aktiv proliferierende, einkernige Myoblasten von der G1-Phase in die G0-Phase (Ruhephase) über. Während viele ruhende Zellen aus der G0-Phase reversibel in den G1-Zustand und anschließend in die S-Phase übergehen können, bedeutet der Übergang in die G0-Phase für die SkMZ unter physiologischen Umständen einen endgültigen Austritt aus der Zellzyklusprogression. Gleichzeitig wird die bereits oben erwähnte terminale Differenzierung, die den postmitotischen Zustand einer Muskelzelle widerspiegelt, eingeleitet [Shen et al., 2003].

Die wichtigsten Faktoren einer terminalen Differenzierung, die die G1-S-Transition unterbinden, sind die Aktivierung der MyoD-Proteinfamilie (MyoD, Myogenin, Myf-5, MRF4), die Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27, die Inhibierung von zyklinabhängigen Kinasen wie Cdk1, Cdk2, Cdk4 und die Retinoblastoma (Rb)-Hypophosphorylierung [Casadei et al., 2009; Shen et al., 2003].

C2C12-SkMZ können durch Kultivierung in Gegenwart von geringen Mengen Pferdeserum oder mittels erhöhter Zelldichte zu Myotuben differenzieren [Rajan et al., 2012]. Des Weiteren kann eine terminale Differenzierung durch die Anwendung von Insulin [Conejo et al., 2001], von Kreatin [Deldicque et al., 2007] oder sogar von serumfreiem Medium induziert werden [Lawson & Purslow, 2000]. Bereits nach 24 Stunden im Differenzierungsmedium aktivieren C2C12-Myoblasten diejenigen essentiellen Zellzyklusinhibitoren (p21, p27, Rb,

CyclinD3), die den Verlust des Myoblastencharakters hervorrufen. Sogar bei reversibler Zuführung von Wachstumsfaktoren kann die differenzierte Muskelzelle nicht erneut in die S-Phase übergehen. Dafür sorgen erneut p21- und p27-Zellzyklusinhibitoren sowie das hypophosphorylierte Rb- Protein [Casadei et al., 2009; Shen et al., 2003].

Tritt eine Schädigung der DNA auf, wird die p21-Transkription durch p53 hochreguliert [Macleod et al., 1995]. Allerdings ist ebenso eine p53-unabhängige p21-Promotorinduktion durch MyoD während der Muskeldifferenzierung möglich [Walsh & Perlman, 1997; Macleod et al., 1995]. Diese wird von einer Aktivitätsabnahme der zyklinabhängigen Kinasen wie Cdk2-, Cdk4- und Cdk6-Proteine begleitet. Interessanterweise kann MyoD ebenfalls Cdk4 direkt inhibieren, darauf folgend zur Rb-Hypophospholierung und dadurch zur terminalen Differenzierung beitragen [Zhang et al., 1999a; 1999b].

Während Transkriptionsfaktoren die Myogenese bestimmen, kontrollieren die Signalliganden und derer Rezeptoren die Formation und das Wachstum von Myotuben und Myofibrillen. Dazu gehören beispielweise Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF-1), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs), Wnt-Signalwege oder die Mitglieder der Transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β)-Superfamilie [Ewton et al., 1988]. Die Aktivität von MyoD steht beispielweise unter enger Kontrolle von Signaltransduktionswegen wie Phosphoinositol-3 (PI3)-Kinase oder Focal Adhesion Kinase (FAK) [Clemente et al., 2005; Li et al., 2000; Kaliman et al., 1996]. Der p38-MAPK-Signalweg spielt ebenfalls eine prominente Rolle bei der Stimulation der terminalen Differenzierung [Lluís et al., 2006; Wu et al., 2000; Li et al., 2000].

1.3 *Toxoplasma gondii* und SkMZ - eine Beziehung für immer?

1.3.1 Spontane Differenzierung von *T. gondii* in SkMZ *in vitro*

Exogene Stressfaktoren scheinen unter bestimmten Voraussetzungen die *Toxoplasma*-Differenzierung zu Bradyzoiten zu fördern (Abschnitt 1.1.3). Dass *Toxoplasma* jedoch auch in Abwesenheit externer Stressfaktoren spontan zu Bradyzoiten *in vitro* übergehen kann, wurde von Lüder et al. [1999] am Beispiel von murinen (Ratten-) Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen beschrieben.

In den vergangenen Jahren wurde dieser Effekt in primären und permanenten Skelettmuskelzellen von Maus und Ratte *in vitro* demonstriert [Guimarães et al., 2009; Ferreira da Silva et al., 2009a; 2009b; Guimarães et al., 2008; Ferreira da Silva et al., 2008]. Feirerra da Silva et al. [2008] zeigten, dass Tachyzoiten des NTE-Stammes (Genotyp II) nicht

nur spontan in Abwesenheit externer Stressfaktoren wie Hitze, alkalischer pH oder Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu Bradyzoiten differenzieren, sondern dass eine höhere Zystenmenge in primären SkMZ im Vergleich zu murinen Fibroblasten L929 vorliegt. Damit konnte die Vermutung, dass die Zystenentstehung nicht vom Wirtszellgewebe abhängt [Lindsay et al., 1991], widerlegt werden.

Guimarães et al. [2008] zeigten unabhängig davon, dass nur eine Minderheit der ME49-Gewebezysten in primären embryonalen Skelettmuskelzellen zu Tachyzoiten reaktivieren. Während manche davon im Tachyzoitenstadium verblieben, konvertierte die Mehrheit erneut zu Bradyzoiten.

Nach Infektion von primären Skelettmuskelzellen mit Toxoplasmen des RH-Stamms, gingen die Parasiten zwar in geringerem Maße, aber dennoch spontan in Bradyzoiten über [Ferreira da Silva et al., 2009a]. Dies ist verblüffend, da mausvirulente und schnell replizierende Tachyzoiten, wie die des RH-Stamms, ausschließlich mit stressvermittelter Zystenformation assoziiert wurden [De Champs et al., 1997]. Außerdem wird eine reduzierte *Toxoplasma*-Replikation erwartet, die als Voraussetzung für die Induktion bradyzoitenspezifischer Gene gilt [Bohne et al., 1994]. Welche molekularen Faktoren der SkMZ diese spontane Zystenbildung unabhängig von externen Stressfaktoren unterstützen, wurde bisher nicht näher untersucht.

1.3.2 Immunantwort von SkMZ auf eine *T. gondii*-Infektion

Lange Zeit wurde vermutet, dass Myoblasten bzw. Myotuben sich relativ passiv nach einer Infektion verhalten. Diese Annahme hat sich in Bezug auf die zelleigene Immunantwort als falsch herausgestellt. Dabei hängen die Immunantworten von SkMZ u. a. vom Differenzierungsgrad der Muskelzelle ab. Es wurde eine aktive Expression von klassischen und nicht klassischen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen und anderen stimulierenden Faktoren bewiesen. Zu den nachgewiesenen MHC-Klasse I-Molekülen gehören HLA-A, HLA-B und HLA-C [Wiendl et al., 2005a]. Ihre Expression wird zusätzlich durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), IL-1 α , IL-1 β und Chemokinen wie Makrophagen Inflammatorischem Protein-1 α (MIP-1 α) verstärkt. TNF α induziert zusätzlich das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) in Myoblasten und Myotuben *in vitro*. Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) soll dagegen die MHC I-Expression hemmen. Darüber hinaus stimuliert IFN- γ die Expression der MHC Klasse II-Moleküle HLA-DP, -DQ, -DR. Während HLA-DP und HLA-DQ ein variables Transkriptionsprofil

aufweisen, scheint die HLA-DR-Expression nach einer IFN- γ -Stimulation stabil zu sein. Zudem scheint HLA-DR nur auf den Myotuben präsent zu sein [Wiendl et al., 2005b; Rostasy et al., 2004]. Myoblasten und Myotuben können aufgrund von HLA Klasse I-Molekülen von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen beseitigt werden. Interessanterweise fehlen MHC Klasse I- und II-Moleküle in Myotuben unter physiologischen Umständen *in vivo*. Dies ändert sich aber im Laufe einer Myopathie. Unter den „nicht klassischen“ HLA Klasse I-Antigenen wurde HLA-G auf der Myoblastenoberfläche detektiert. HLA-G schützen die Targetzellen vor der zytotoxischen Wirkung der T-Lymphozyten und NK-Zellen [Wiendl et al., 2005a; 2005b]. Myoblasten exprimieren konstitutiv Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und TGF- β *in vitro*. Die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ konnten bei Myoblasten auch nach deren Stimulation nachgewiesen werden, im Gegensatz zu TNF α , IL-1 α und IL-1 β . Da Myoblasten auf diese Zytokine aber *in vitro* reagieren, wird ihre Anwesenheit in der Muskulatur vermutet [Wiendl et al., 2005b]. Allerdings variieren die Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der Zytokine- und Chemokinexpression von Myoblasten und differenzierten Skelettmuskelzellen stark [Wiendl et al., 2005a; 2005b].

Neben der zelleigenen Expression von Immunfaktoren durch SkMZ wandern im Verlauf einer entzündlichen Reaktion professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen *in vivo* ins Muskelgewebe ein. Sie können im Fall einer Inflammation auch durch die von den SkMZ freigesetzten Zytokinen und Chemokinen vermehrt rekrutiert werden [Wiendl et al., 2005a; 2005b].

Während die Zytokin- und Chemokinfreisetzung bzw. die Expression von Adhäsionsmolekülen nach Infektion nicht-hämatopoetischer Zellen mit *T. gondii* in neuronalen [Suzuki et al., 2011; Schlüter et al., 2001], epithelialen Zellen [Denney et al., 1999] oder retinalen Zellen [Kikumura et al., 2012] gut untersucht wurde, ist die Immunreaktivität von SkMZ *in vivo* oder *in vitro* aufgrund einer *Toxoplasma*-Infektion bislang wenig untersucht. Takács et al. (2012) konnten zeigen, dass die Stimulation von primären und permanenten SkMZ mit IFN- γ zu einer verstärkten antiparasitären Wirkung führt. TNF α kann die anti-parasitäre Wirkung von IFN- γ in SkMZ dagegen nicht weiter erhöhen. Interessanterweise fördert eine Stimulation von SkMZ mit IFN- γ oder IFN- γ und TNF α aber nicht die Expression bradyzoitenspezifischer Gene, obwohl IFN- γ die Zystenentstehung in murinen Makrophagen fördert [Bohne et al., 1993b]. Dies deutet auf eine Zelltyp-spezifische Wirkung von IFN- γ bei der Induktion der Stadienkonversion von *T. gondii* hin.

1.4 Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit

Muskulatur und Skelettmuskelzellen stellen für *Toxoplasma gondii* eine für den Lebenszyklus und die Persistenz wichtige Mikroumgebung dar. Die Stadiendifferenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten in Skelettmuskeln ist wegen ihrer Relevanz bei der lebensmittelbedingten Übertragung von *Toxoplasma* von großem Interesse. Sie wurde bislang jedoch wenig untersucht.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Lüder wiesen auf eine spontane Parasitendifferenzierung und Gewebezystenbildung in differenzierten SkMZ unter Ausschluss externer Stressfaktoren hin [Ferreira da Silva et al., 2008]. Da molekulare Skelettmuskel-spezifische Faktoren, die die *Toxoplasma*-Entwicklung, -Differenzierung und -Persistenz in diesem zellulären Kompartiment regulieren, weitgehend unbekannt sind, sind detaillierte Analysen zu diesem Thema dringend notwendig. Ziel dieser Dissertation ist es daher, sowohl neue Erkenntnisse als auch zukünftige Aufgabenstellungen zur Frage der *T. gondii*-Entwicklung und -Differenzierung in SkMZ zu erarbeiten:

- Welchen Einfluss übt die Differenzierung von murinen SkMZ auf das Wachstum von *T. gondii* und die Persistenz *in vitro* aus?
- Kann die verstärkte Persistenz von *Toxoplasma* in neuronalem und Muskelgewebe auf den terminal differenzierten Status beider Zelltypen zurückgeführt werden? Welche zelltypspezifischen Effektormoleküle von murinen SkMZ und Neuronen werden, im Vergleich zu Fibroblasten und Astrozyten, nach einer Infektion *in vitro* reguliert?
- Der negative Zellzyklusregulator CDA-1 stimuliert die Bradyzoitenbildung nach unphysiologischer Behandlung von humanen Fibroblasten mit „Compound 1“ [Radke et al, 2006]. Welche Rolle spielt CDA-1 in der spontanen Stadiendifferenzierung von *T. gondii* in SkMZ?
- Welche biochemischen Auswirkungen hat *T. gondii* in SkMZ auf Zelltyp-spezifische Änderungen in MAP-Kinasen und Akt/PKB-Signaltransduktionswegen?
- Welche pro-inflammatorischen Moleküle werden im Laufe der Immunantwort von *T. gondii*-infizierten SkMZ *in vitro* exprimiert?

In dieser Arbeit sollen neue Ergebnisse zur Replikation und Persistenz von *T. gondii* in der Skelettmuskulatur gewonnen werden, die zur Klärung der Fleisch-bedingten Übertragung vom Parasiten auf den Menschen beitragen können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Bei den Laborarbeiten wurden folgende Materialien eingesetzt

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

	Zusammensetzung	Hersteller
Trypsin	0,25% in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
EDTA	1 % in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren	100x	Biochrom, Berlin
Natrium Pyruvat	100 mM	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pferdeserum (HS)		Biochrom, Berlin
Fetales Kalbserum (FCS)		Biochrom, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)		Sigma-Aldrich, München
DMEM Medium (Basiskulturmedium)	Pulvermedium ohne Natrium Pyruvat mit 4,5 g/l D-Glukose 2 mM HEPES 3 g/l mM NaHCO_3 pH 7,2	Biochrom, Berlin Biochrom, Berlin Merck, Darmstadt
RPMI Medium (Basiskulturmedium)	RPMI1640 Pulvermedium mit 2 g/l NaHCO_3 pH 7,2	Biochrom, Berlin
Natriumdodecylsulfat	10%	Serva, Amstetten
Bromphenolblau	200 mg/l	Amresco, Solon
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)		Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	absolut	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	37%	Merck, Darmstadt
Immersionsöl 518N		Zeiss, Göttingen
Mowiol	7,6 g/ml 20% Glycerin in Tris/HCl pH 8,5	Merck, Darmstadt Avantor, Deventer Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	2%	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
PonceauS	14%	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Sigma-Aldrich, München
RNasin	40 U/ μl	Promega, Madison
TEMED	absolut	Roth, Karlsruhe
Laminin (murin)		Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	4%	Merck, Darmstadt
Na-Cacodylat	0,1 M	Roth, Karlsruhe
Methanol	absolut	Merck, Darmstadt

Ethanol	absolut oder 70%	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl-Lösung	50 mM in 1x PBS	Merck, Darmstadt Biochrom, Berlin
Agarose NEEQ Ultra-Qualität	2%	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x)	40 mM Tris (pH 7,8) 0,5 mM Na-Acetat 0,01 mM 2Na EDTA Bidest H ₂ O	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt

	Zusammensetzung	Hersteller
--	-----------------	------------

Proteinisolaton

Waschpuffer mit Phosphataseinhibitoren	1 mM Natriumorthovanadate 1 mM Natriumfluorid 1x PBS	Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Biochrom, Berlin
Lysepuffer	1% Triton X 100 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 25 mM Natrium Pyrophosphat 50 mM Natriumfluorid 10 µM Leupeptin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Pepstacin 1 mM Na-Orthovanadate 1 mM EDTA Bidest H ₂ O	Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

2x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 65 mM Dithiothreitol 0,002% Bromphenolblau	Merck, Darmstadt Serva, Amstetten Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Amresco, Solon, USA
Trenngel (10%)	0,375 M Tris/HCl pH 8.8 0,2% SDS 10% Acrylamid 0,27% Bisacrylamid 0,04% APS 0,2% TEMED	Merck, Darmstadt Serva, Amstetten Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe
Sammelgel	0,125 M Tris/HCl pH 6.8 0,2% SDS 5% Acrylamid 0,13% Bisacrylamid 0,04% APS 0,4% TEMED 3 µg Bromphenolblau	Merck, Darmstadt Serva, Amstetten Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Amresco, Solon

1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 10% SDS pH 8,5	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Amstetten
-------------------	--	---

Western Blot (Elektrodenpuffer)

Tris-HCl-Puffer (0,3 M)	20 ml 1,5 M Tris-HCl 20 ml 96% Methanol 60 ml Bidest H ₂ O pH 10,4	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Tris-HCl-Puffer (0,025 mM)	20 ml 0,125mM Tris-HCl 20 ml 96% Methanol 60 ml Bidest H ₂ O pH 10,4	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Aminocaprinsäure-Puffer (40 mM)	20 ml 200 mM Aminocaprinsäure 20 ml Methanol 60 ml Bidest H ₂ O pH 7,6	Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt

Immunodetektion

Waschlösung	0,05% Tween 20 1x PBS	Sigma-Aldrich, München Biochrom, Berlin
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver 0,2% Tween 20 0,1% NaN ₃ 1x PBS	Sucofin Sigma-Aldrich, München Biochrom, Berlin
Inkubationslösung	5% Magermilchpulver 0,05% Tween 20 1x PBS	Sucofin Sigma-Aldrich, München Biochrom, Berlin

Immunfluoreszenztest

Blockierungslösung	1% BSA 0,1 mg/ml Saponin 0,02% NaN ₃ 1x PBS	Biochrom, Berlin Biomol, Hamburg Merck, Darmstadt Biochrom, Berlin
Antikörperlösung	Antikörper nach Wahl 1% BSA 0,1 mg/ml Saponin 1x PBS	Biomol, Hamburg Sigma-Adrich, München Biochrom, Berlin
Propidiumiodid	5 µg/ml Propidiumiodidlösung 1x PBS	Sigma-Adrich, München
Zellfixierungslösung	4% Paraformaldehyd 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,4 mit HCl	Biochrom, Berlin Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt

Bromodesoxyuridin-Detektion

Salzsäure	1,5 N	Merck, Darmstadt
Blockierungslösung	0,3% Triton X 100	Merck, Darmstadt
	5% BSA	Biomol, Hamburg
	1x PBS	Biochrom, Berlin
Antikörperinkubationspuffer	1% BSA	Biomol, Hamburg
	1x PBS	Biochrom, Berlin

2.1.2 Anzuchtmedien

Anzuchtmedium	Zusammensetzung	Hersteller
C2C12-/ NIH3T3-Kulturmedium	DMEM (Basismedium)	Biochrom, Berlin
	10% FCS	Biomol, Hamburg
	100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	0,1 mg/ml Streptomycin	
C2C12-Transfektantenmedium	DMEM (Basismedium)	Biochrom, Berlin
	5% FCS	Biomol, Hamburg
	100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	0,1 mg/ml Streptomycin	
	10 µg/ml Puromycin	Sigma-Aldrich, München
C2C12-Differenzierungsmedium	DMEM (Basismedium)	Biochrom, Berlin
	2% Pferdeserum	Biochrom, Berlin
	100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	0,1 mg/ml Streptomycin	
L929-Medium	DMEM (Basismedium)	Biochrom, Berlin
	3% FCS	Biomol, Hamburg
	100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	0,1 mg/ml Streptomycin	
	1x Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
	1 mM Natrium Pyruvate	Biochrom, Berlin
Primäre murine Astrozyten	DMEM (Basismedium)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
	20% FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
	2 mM L-Alanin-L-Glutamin,	Sigma-Aldrich, München
	20 µg/ml Gentamicin	Sigma- Aldrich, München
Primäre murine Neuronen	Nerobasal Medium	Invitrogen, Karlsruhe,
	2% B27	Invitrogen, Karlsruhe,
	500 µM L-glutamine	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Medium für <i>Toxoplasma gondii</i>	RPMI 1640 (Basismedium)	Biochrom, Berlin
	1% FCS	Biochrom, Berlin
	100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	0,1 mg/ml Streptomycin	
Luria-Broth-Flüssigmedium für <i>Escherichia coli</i>	Bacto-Trypton 1%	Otto Nord Wald, Hamburg
	Bacto-Hefeextrakt 0,5%	Otto Nord Wald, Hamburg
	NaCl 0,5%	Meck, Darmstadt

Luria-Broth-Agarplatten für <i>Escherichia coli</i>	Bacto-Trypton 1%	Otto Nord Wald, Hamburg
	Bacto-Hefeextrakt 0,5%	Otto Nord Wald, Hamburg
	NaCl 0,5%	Meck, Darmstadt
	Agar 1,5%	Otto Nord Wald, Hamburg
	Ampicillin 100 µg/ml	Sigma-Aldrich, München

2.1.3 Geräte

Typ des angewendeten Geräts	Hersteller
Brutschrank BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
Chemilumineszenzgerät	Fujifilm, Tokyo
Luminescent Image Analyzer LAS-4000	
Eppendorfpipetten (0,5-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Konfokales Laserscannmikroskop TCS SPII	Leica Microsystem, Wetzlar
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Lightcycler 2.0	Roche, Mannheim
Mikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
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-Elektroblotter	Sartorius, Göttingen
Spektrophotometer <i>NanoDrop</i> ®	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler Lightcycler	Roche, Mannheim
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
VICTOR V Multilabel Plate Readers	Perkin Elmer, Rodgau
Zählkammer Neubauer	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau

2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma Aldrich, München
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Omniskript® Reverse Transkription	Qiagen, Hilden
LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche, Mannheim
GenElute™ HP Endotoxin -Free Plasmid Maxiprep Kit	Roche, Mannheim
DNase I Amplification Grade	Sigma Aldrich, München
FuGENE® Transfection Reagents	Promega, Mannheim
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München

2.1.5 Zelllinien und Parasitenstämme

Zelllinien		Herkunft
C2C12 Wildtypzellen	Permanente murine Myoblasten	ATCC, Wesel
C2C12 Transfektanten	Permanente murine Myoblasten mit <i>Tsply2</i> -shRNA pLKO.1-Plasmid	Institutseigene Herstellung
C2C12 Transfektanten als Negativkontrolle	Permanente murine Myoblasten mit pLKO.1-puro Plasmid	Institutseigene Herstellung
NIH3T3	Permanente murine Fibroblasten	ATCC, Wesel
L929	Permanente murine Fibroblasten	Institutseigene Charge
Neuronen	Emryonale murine Neuronen von C57BL/B6 Mäusen	Instituteigene Gewinnung
Astrozyten	Fetale murine Astrozyten von C57BL/B6 Mäusen	Instituteigene Gewinnung
NEB5- α	Kompetenter <i>Escherichia coli</i> Stamm	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Parasitenstämme		Herkunft
p-CC-NTE	<i>Toxoplasma gondii</i> (Genotyp II)	Klinisches Isolat

2.1.6 Angewendete Softwares und online Tools

Angewendete Softwares/ online Tools	Hersteller
EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	Heidelberg, Deutschland
EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite)	Cambridge, England
Light Cycler Software version 4.05	Roche, Mannheim
Multi Gauge Version 2.0	Fujifilm, Tokyo, Japan
NCBI (National Center Biotechnology for Information)	Bethesda, USA
Primer3 Input Version 0.4.0	Bethesda, USA
Primer-Blast (NCBI)	Bethesda, USA
DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.7	Frederick, USA
Statistica (Software für statistische Datenanalyse)	Hamburg, Deutschland

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Kryoröhrchen (Nunc, 2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glasplättchen (Durchmesser 13 mm)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Objektträger (76 x 26mm)	Knittel Gläser, Braunschweig
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Zellschraber (24 cm)	Biochrom, Berlin
Eppendorfgefäße (Volumen 1,5 und 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße (Volumen 15 und 50 ml)	Sarstaedt, Nürnberg
Multiwell Platten (diverse Größen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.8 Primer

Alle neu und selbst entworfenen Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die benutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: In der quantitativen Real-Time PCR eingesetzte Primer

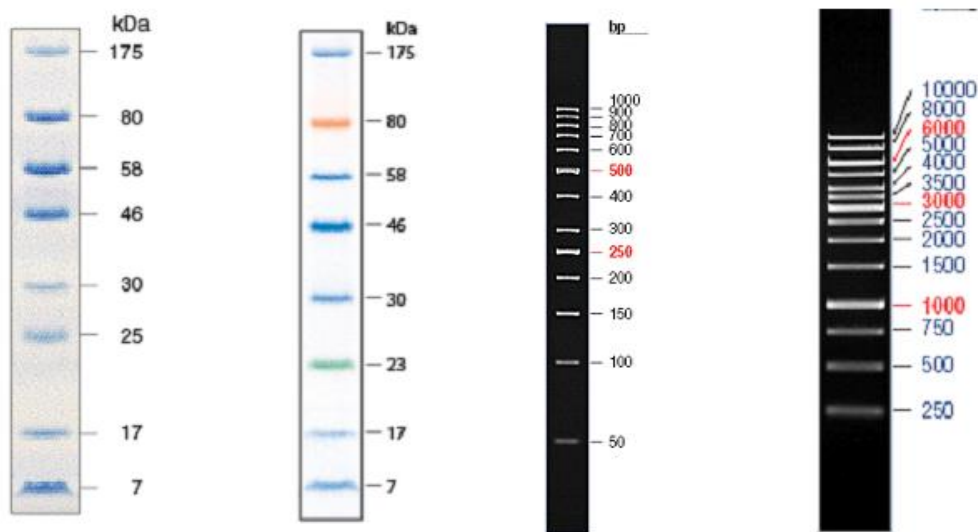
Primerbezeichnung	Primersequenz 5' -> 3'	Annealing-Temperatur [°C]
mPalm2_F	TTTTTCCCCTGCCCCGTGTGC	69
mPalm2_R	CTTCAGACTGCCTGCGCCTGG	
mTtpal_F	CCGAGGAGACCCAGGTGAACG	71
mTtpal_R	CAGCACGGCGTTCCAGGAGG	
mCyr61_F	CCTCCTGCGCGCCACAATGA	71
mCyr61_R	TCCCGGACCAACCCGACTCC	
mUbp1_F	CTACAGCATGAGTGATGTGTTGGCA	67
mUbp1_R	TCGTGCAGCTTAACGGCTGGC	
mSlc44a4_F	TGTGACCCGATGGCCCCGTT	70
mSlc44a4_R	CCCGGCAAGGACACACTGGC	
mPtgs2_F	GACAGATTGCTGGCCGGGTTG	68
mPtgs2_R	TCAGGGAGAAGCGTTTGCGGT	
mNr4a1_F	CTCCGCCTGGCATAACCGATCT	67
mNr4a1_R	AGGCAGGCAAAGGCGGGAAC	
mFosb_F	GCTCGTGCAACCCACCCTCA	68
mFosb_R	GGGTAAGTGTCTCTTCTCGGGGT	
mEgr2_F	CCAGGTAGCGAGGGAGTTGGGT	69
mEgr2_R	ATGCCATCTCCCGCCACTCCGTT	
mSmyd1_F	CGCAGATGAGGATTGAGCTCCGGG	70
mSmyd1_R	TCGCTGCCAGGAAGAGGTCGT	
mSerinc4_F	AGTTCGCCTCCACTCCCCCA	67
mSerinc4_R	AGTTCGCCTCCACTCCCCCA	
m_p21_F	CCGAGAGGTGTGAGCCGCCG	68
m_p21_R	GCATCGCAATCACGGCGCAA	
Tubulin_F (T.g)	CGCCACGGCCGCTACCTGACT	65
Tubulin_R (T.g)	TACGCGCCTTCCTCTGCACCC	
Aktin_F (T.g)	TGGCAACGAGCGATTCCGCTG	63
Aktin_R (T.g)	GTTCCCTTGGTCAGCCTCTCGCC	
ENO1_F (T.g)	CGAGGGGTGGCTGAAAAAGTATCC	65
ENO1_R (T.g)	CAGCGAAGGCCACGACAAG	
BAG1_F (T.g.)	GGAGTCGGTCTTAATCCCATC	68
BAG1_R (T.g.)	ACGATGGCTCCGTTGTGCGACT	
mMyHC_F	CGCTCTCTCAGCACAGAGCTGTT	72
mMyHC_R	AAAGCAGCCTGGAGCTCAGATTTTT	
mMyogenin_F	AGCGGCTGCCTAAAGTGGA	78
mMyogenin_R	CAGCCGCGAGCAAATGAT	

mMyoD_F	CGCCCGCTGCCTTCTACG	72
mMyoD_R	CTCGACACAGCCGCACTCTTC	
mTspyl2_F	AGGAGTTCAGCGCAACCGC	67
mTspyl2_R	TCTGGTGTCATGGCTCCTGCGA	
mCyclinB1_F	TGT GGC CTC ACA AAG CAC AT	64
mCyclinB1_R	TCG ACA ACT TCC GTT AGC C	
mCdk1_F	AAGCGAGGAAGAAGGAGTGC	62
mCdk1_R	TCTCTGTGAAGAACTCGCCG	
mMsx1_F	GCCCCGAGAACTAGATCGG	62
mMsx1_R	TGCAGTCTCTTGGCCTTAGC	
mAktin_F	GTACCACCATGTACCCAGGC	72
mAktin_R	AAGGGTGTA AAAACGCAGCTC	
mTNF α _F	TCTACTGAACTTCGGGGTGATCG	60
mTNF α _R	ACGTGGGCTACAGGCTTGTC A	
mTGF β _F	AACTATTGCTTCAGCTCCACAG	59
mTGF β _R	AGTTGGCATGGTAGCCCTTG	
mIFN- γ _F	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	60
mIFN- γ _R	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
mIL-17d_F	GACTCTGGTCTGGATGCTCG	60
mIL-17d_R	CTGGAGAGAAGACGGGTGTG	
mIL-6_F	GTA CTCCAGGTAGCTATGGTA	62
mIL-6_R	CAGTGCCTTCTTGGGACTGA	
mIL-1 β _F	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	63
mIL-1 β _R	TGTGCTGCTGCG AGATTTGA	
mIL-23_F	CACCAGCGGGACATATGAATC	63
mIL-23_R	GCAGGCTCCCCTTTGAAGAT	
mIL-1 α _F1	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAAT	61
mIL-1 α _R1	AGATGGTCAATGGCAGA ACTGT	
mCCL2_F	TGCTACTCATTACCCAGCAA	57
mCCL2_R	GTCTGGACCCATTCCCTTCTT	
mUhrf1_F	GAAACGCGGCTTCTGGTATG	62
mUhrf1_R	CGATCAAAGGCCTCCTCTCT	
mTrp53_F	TGCTCACCTGGCTAAAGTT	58
mTrp53_R	GTCCATGCAGTGAGGTGATG	
mS100a4_F	CTTGGTCTGGTCTCAACGGT	61
mS100a4_R	GTCCCTGTTGCTGTCCAAGT	
mCxcl10_F	CCAAGTGCTGCCGTCATTTT	60
mCxcl10_R	AGCTTCCCTATGGCCCTCAT	
mDpm1_F	ATGGAATCAAACACGCCACG	60
mDpm1_R	CCCATCCATAAACACCCCCA	
<i>T. gondii</i> repetitive DNA-Sequenz_F	AGGAGAGATATCAGGACTGTAG	63
<i>T. gondii</i> repetitive DNA-Sequenz_R	GCGTCGTCTCGTCTAGATCG	

2.1.9 Größenstandards für Gelelektrophorese

Als Größenstandard für die elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren im Agarosegel dienen 50 bp und 1 kb-Marker der Firma Thermo Fischer Scientific (Schwerte) (Tabelle 2, c, d). Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mit Hilfe der gefärbten Proteinmarker von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bestimmt (Tabelle 2, a, b).

Tabelle 2: Bandenmuster der Marker, welche zur Auftrennung von Proteinen (a, b) und von Desoxynucleinsäurefragmente (c, d) im Agarosegel eingesetzt wurden.



a) Bandenmuster des Prestained Proteinmarkers (New England Biolabs)	b) Bandenmuster des NEB Color Plus Prestained Proteinmarkers (New England Biolabs)	c) Bandenmuster vom GerneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas)	d) Bandenmusters vom O'GerneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
---	--	---	--

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung diverser Gewebezellen sowie Parasiten erfolgte in mit 5% CO₂ begasten Brutschränken bei 37 °C und gesättigter Wasserdampfatosphäre. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen und Parasiten zum Erzielen einer entsprechenden Zell- und Parasitenzahl subkultiviert und in den Versuchen eingesetzt.

2.2.1.1 Passage von L929-Fibroblasten

Die murinen L929-Fibroblasten wurden in supplementiertem DMEM (Abschnitt 2.1.2) bei 37°C und 5% CO₂ in 6-Napf Schalen kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden mit einem Spatel abgeschabt. Anschließend wurden je 8 Tropfen pro Napf der Zellsuspension auf neue 6-Napf Schalen verteilt und mit ca. 2,5 ml Medium aufgefüllt.

2.2.1.2 Anzucht und Passage von *Toxoplasma gondii* - Parasiten

Der p-CC-NTE Stamm von *Toxoplasma gondii* (Genotyp II) wurde in supplementiertem RPMI-Medium (Abschnitt 2.1.2) kultiviert (Abbildung 2-1). Als Anzuchtzellen wurden murine L929-Fibroblasten verwendet. Die Aufteilung der L929-Zellen und Parasiten erfolgte in 12-Napf Schalen nach dem in Abbildung 2-1 dargestellten Gradientenschema.

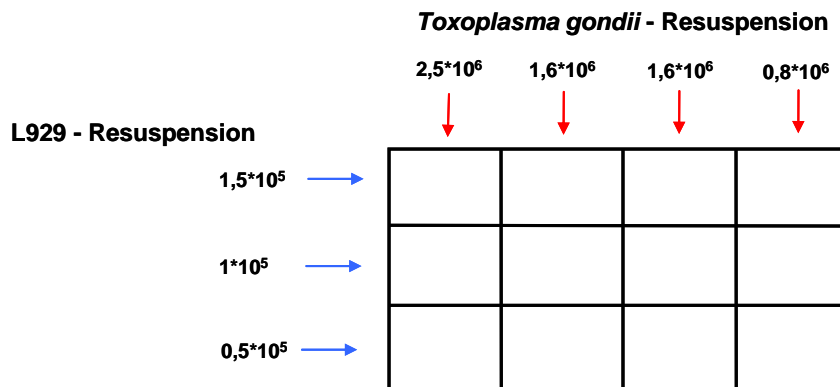


Abbildung 2-1: Aufteilung der L929-Zellen und Parasiten in 12-Napf Schalen.

2.2.1.3 Passage von C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten

C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 3 ml EDTA gespült und anschließend mit 3 ml Trypsin von der Fläche abgelöst. Die Adhäsion der Zellen wurde durch kräftiges Klopfen der Flaschen reduziert. Anschließend wurde die proteolytische Wirkung von Trypsin mit 7 ml supplementiertem DMEM-Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in 50 ml-Röhrchen gesammelt und 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, in

frischem Medium gewaschen und im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt. Ca. 10×10^4 Myoblastenzellen wurden auf je eine neue Kulturflasche verteilt und subkultiviert. Die resuspendierten NIH3T3-Zellen wurden im Gegensatz zu den C2C12-Zellen im Verhältnis 1:20 mit neuem Medium (Abschnitt 2.1.2) verdünnt.

2.2.1.4 Terminale Differenzierung von einkernigen C2C12-Myoblasten zu polykernigen Myotuben

Die terminale Differenzierung der einkernigen C2C12-Myoblasten wurde zum einen mit Hilfe des mit Pferdeserum-supplementierten DMEM-Mediums (Abschnitt 2.1.2) initiiert. Zum anderen konnten sie über ein Aussäen einer erhöhten Zellzahl (70×10^4) zur Differenzierung stimuliert werden. Meistens wurde die erste Methode im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

Je nach Analyse wurden Myoblasten in den 6- bzw. 24-Napf Schalen in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt. Die terminale Differenzierung der Zellen erfolgte für 168 Stunden.

2.2.1.5 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Mit zunehmender Zahl der Zellpassagen verloren die C2C12-Myoblasten ihre Differenzierungsfähigkeit und ihr Kontraktionsvermögen. Um dies zu vermeiden, wurden die C2C12-Myoblasten sowie auch NIH3T3-Zellen regelmäßig nach folgendem Protokoll aufgetaut und nach kurzer Aufzucht als Vorrat wieder eingefroren.

Die Aufbewahrung der Zellstabilate erfolgte in Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Die sanft aufgetauten Zellen wurden in 50 ml DMEM-Medium verdünnt und 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet im 10 ml DMEM-Medium gewaschen und erneut schonend abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 25 ml DMEM-Medium in den Zellkulturflaschen kultiviert und anschließend trypsinisiert. Nach der Zellzahlbestimmung und der Einstellung einer Zellzahl von $0,3 \times 10^7$ pro ml wurden die Zellen erneut eingefroren. Dafür wurde die Zellsuspension mit Einfriermedium im Verhältnis 1:2 gemischt.

Das Einfriermedium bestand zu 40% aus DMEM-Medium, 40% FCS und 20% DMSO, welches vorsichtig hinzugefügt wurde. Die Zellsuspension wurde unverzüglich im Styroporblock bei -80°C gefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Genomische DNA-Isolation

Die Isolierung genomischer Nukleinsäuren wurde mit der Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Isolation Kits von Qiagen durchgeführt. Alle im Versuch eingesetzten Chemikalien wurden im Kit geliefert.

Die zur Lyse ausgesuchten und anschließend pelletierten Zellen wurden zunächst in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zugegeben, gut gemischt und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Danach wurde die Probe mit 400 µl 96% EtOH gemischt und erneut kurz kräftig gemischt. Die dadurch ausgefällte DNA wurde auf die DNeasy Mini Spin column überführt und 1 Minuten bei 6.000 g zentrifugiert. Nachfolgend wurde 500 µl AW1-Puffer zugegeben und 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurde 500 µl AW2 hinzugefügt und die Probe 3 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Die gereinigte genomische DNA wurde mit 200 µl AE-Puffer durch 1-minütige Zentrifugation mit 6.000 g eluiert.

2.2.2.2 Gesamte RNA-Isolation

Qualitativ hochwertige Gesamt-RNA wurde entsprechend den Angaben des GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kits von Sigma-Aldrich isoliert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 g durchgeführt.

Zunächst wurden die in 6-Napf Schalen kultivierten Zellen mit je 350 µl Lysepuffer (enthält β-Mercaptoethanol) pro Napf unter sterilen Bedingungen lysiert und unverzüglich auf GenElute Filtrationsäulchen überführt. Die Probe wurde anschließend 2 Minuten zentrifugiert. Die im Filtrat verbliebene Gesamt-RNA wurde mit 350 µl 70% EtOH gemischt und auf ein GenElute Bindsäulchen pipettiert und 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde die GenElute Binding Column mit 500 µl Waschpuffer 1 gewaschen, 30 Sekunden zentrifugiert, erneut mit 500 µl Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend 2 Minuten lang zentrifugiert. Die gesamte Ribonukleinsäure wurde mit Hilfe von 50 µl des Eluationspuffers eluiert.

2.2.2.3 DNase I -Verdau

Um potentielle Reste von genomischer DNA in den isolierten RNA-Proben zu beseitigen, wurden 50 µl eluierte RNA-Probe mit 5 µl 10x DNase I Verdauungspuffer und 5 µl DNase I Enzym (DNase I Amplification Grade, Sigma Aldrich) 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Stopplösung hinzugefügt und weitere 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.4 DNA- und RNA-Konzentrationsmessung

Nach der Nukleinsäureisolation wurde die Konzentration der Proben mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 3300 (Thermo Scientific) gemessen. Die Qualität der DNA und der RNA wurde anhand der Ratio der gemessenen Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt. Für die Messungen genügte jeweils 1 µl der Nukleinsäurelösung pro Probe. Im Fall einer reinen RNA-Probe entsprach die Ratio 1,8. Ein Absorptionsquotient um 2 wies wiederum auf eine reine DNA-Probe hin.

2.2.2.5 Reverse Transkription (cDNA Herstellung)

Die isolierte RNA wurde zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde entsprechend den Herstellerangaben vom Omniscript® Reverse Transkription Kit von Qiagen durchgeführt. In jeden Reaktionsansatz wurden 2 µg der isolierten RNA, 6,4 µl des Mastermix (Tabelle 3) und RNase-freies Wasser zugegeben. Anschließend wurde die Probe 90 Minuten lang bei 37 °C inkubiert und daraufhin bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes und Pipettierschema zur Vorbereitung der Proben für die Reverse Transkription.

Komponente	Konzentration	Volumen
Buffer	10x	2 µl
dNTP Mix	5 mM	2 µl
Oligo d(T) Primer	50 µM	0,4 µl
Omniscript Reverse Transcriptase	40 U	1 µl
RNAsin	10 U/µl	1 µl
RNase freies H ₂ O		variabel
Gesamt-RNA	2 µg	variabel
Gesamtvolumen		20 µl

2.2.2.6 Real-Time qPCR – relative Quantifizierung von cDNA oder genomischer DNA

Um auch kleinste Unterschiede in der Genexpression zu detektieren, wurden die cDNA-Proben mittels der äußerst sensitiven Real-Time quantitativen PCR-Methode untersucht. Die zur Untersuchung benötigten chemischen Reagenzien stammten aus dem LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit von Roche. Zunächst wurden 14 µl des FastStart® Enzyms zu 70 µl Reaktionsmix gegeben. Der Prämix enthielt einen Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂, SYBR Green I DNA-Interkalator und ein dNTP-Mix. Anschließend

wurde der Prämix mit den übrigen Komponenten wie Forward-, Reverse-Primern und Wasser zu einem Gemisch vereint (Tabelle 4). In den gekühlten Glaskapillaren (Roche) wurden jeweils 18 µl des Gemisches pipettiert. Im Anschluss daran wurde 2 µl, im Verhältnis 1:10 verdünntes Template hinzugegeben und die Kapillare mittels eines Stopfens verschlossen. In Abhängigkeit von der Art des Templates und der Primer wurden die Real-Time qPCR-Programme im Lightcycler 2.0 modifiziert. Für jedes Zielgen wurde ein unterschiedliches Programm eingesetzt. Allerdings bestand jedes Programm aus gleichen und in der Tabelle 5 dargestellten Etappen.

Tabelle 4: Real-Time qPCR-Reaktionsansatz.

Mastermix	Konzentration	Volumen
Prämix		4 µl
Forward primer	10 µM	0,5 µl
Reverse primer	10 µM	0,5 µl
Bidest H ₂ O		13 µl
cDNA oder gDNA		2 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Tabelle 5: Real-Time qPCR-Programm für die Detektion eines Zielgens.

Etappen	Temperatur	Dauer der Phase	Zahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 Minuten	
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	
Annealing	variabel	10 Sekunden	40 bzw. 45
Elongation	72 °C	variabel	
Schmelzkurve	95 °C	0	
	60 °C	15 Sekunden	
	99 °C	0	
Ende	40 °C	10 Sekunden	

Die relative Quantifizierung beruht auf der Normalisierung von Expressionen eines zu untersuchenden Gens auf ein nicht reguliertes ‚Housekeeping‘-Gen (Referenzgen). Die sich nach dem Abschluss des PCR-Laufs ergebenden Crossing point-Werte (Cp) der Ziel- und Referenzgene wurden entsprechend der Formel 1 in die relative Genexpression umgerechnet.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Formel 1: Normalisierung des Zielgens auf das ‚Housekeeping‘-Gen.

Die ‚Crossing point‘-Werte von Kontroll- und Zielproben wurden substrahiert. Anschließend wurde das Verhältnis zweiter Potenzen (E= Effizienz) beider Werte berechnet (Ratio). Das Referenzgen entspricht einem ‚Housekeeping‘-Gen wie Aktin oder Tubulin.

2.2.3 Genomweite Hochdurchsatz RNA-Sequenzierung

Eine genomweite Hochdurchsatz RNA-Sequenzierung (engl. High-throughput RNA-Sequencing) bietet zurzeit eine der effektivsten Methoden zur Übersicht über die Gesamtveränderungen auf der Transkriptionsebene - beispielsweise aufgrund einer Infektion. Eine RNA-Analyse spiegelt viele der aktuellen und zukünftigen Aktivitäten einer Zelle wider. Aus diesem Grund wurde sie in unserem Projekt eingesetzt.

2.2.3.1 Bearbeitung der Zellen

Zur Identifizierung von zelltypspezifisch-exprimierten Genen vor und nach der *Toxoplasma*-Infektion wurden permanente murine differenzierte C2C12-Myotuben, murine NIH3T3-Fibroblasten, embryonale murine Neuronen und fetale Astrozyten verglichen. Die Neuronen wurden aus Embryonen trächtiger C57BL/6 Mäuse von Dr. rer. nat. Ulrike Händel vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg (AG Schlüter) isoliert. Ebenso wurden fetalen Astrozyten aus neugeborenen C57BL/6 Mäusen von Dr. Ulrike Händel präpariert. Anschließend wurden sie in speziell für diese Zelllinien bereiteten Medien (Abschnitt 2.1.2) eine Woche bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Medien schonend erneuert.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden nach dem im Abschnitt 2.2.1.4 beschriebenen Protokoll eine Woche im Differenzierungsmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Fibroblasten wurden 24 Stunden vor der geplanten Infektion in einer Anzahl von 70×10^4 Zellen pro Flasche ebenfalls in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurde von jeder Zelllinie ein doppelter Ansatz vorbereitet. Parallel dazu wurden alle Zellen außerdem auf mit Laminin beschichteten Glassplättchen in 24-Napf Zellkulturplatten ausgesät, um die Qualität und Infektion der Zellen mittels Immunfluoreszenztest nachträglich zu untersuchen.

Nach 1 Woche der Differenzierung und/ oder Vermehrung (C2C12, Neurone, Astrozyten) bzw. 1 Tag nach der Aussat (NIH3T3) wurden die Zellen zum Teil mit *Toxoplasma gondii* (Stamm-NTE) im Parasit-Wirtszell-Verhältnis 5:1 infiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Parasitenzugabe wurde die Gesamt-RNA von infizierten und nicht-infizierten Proben isoliert. Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kits von Sigma-Aldrich und nach dem oben beschriebenen Protokoll (Abschnitt 2.2.2.2) durchgeführt.

2.2.3.2 RNA-Qualitätskontrolle

Die isolierten und für die genomweite High-Throughput RNA-Sequenzierung bestimmten RNA-Proben wurden zunächst auf die RNA-Qualität und –Menge untersucht. Dies erfolgte einerseits durch Konzentrationsmessung mittels des Spektrophotometers NanoDrop 3300 (ThermoScientific) (Abschnitt 2.2.2.4) und andererseits mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Die Untersuchung mit Bioanalyser wurde im Transkriptomanalyselabor der Universitätsmedizin Göttingen ausgeführt. Die Qualität der Total-RNA-Präparate wurde mit Nano- bzw. Pikogramm-Empfindlichkeit mittels Nano- bzw. Pico-Chips (Nano/PicoChip Kit, Agilent Technologies) im Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) gemessen. Die Analysen ermöglichten die Identifikation eines sehr geringen RNA-Degradierungsgrades mittels gelähnlicher Abbildungen, die die Ratio von 28S-rRNA zu 18S-rRNA bestimmen. Parallel wurde jeder RNA-Probe eine RNA-Integritätsnummer (RIN) mittels spezieller Software (Agilent Technologies) zugewiesen, wobei diese maximal den Wert 10 erreichen konnte. Dieser Wert entsprach der größten RNA-Reinheit. Durch diese Vorgehensweise konnten sämtliche RNA-Proben standardisiert werden.

2.2.3.3 Infektionsanalyse

Parallel zur RNA-Qualitätssicherung wurden die in 24-Napf Zellkulturplatten auf Glasdeckgläschen ausgesäten und teilweise infizierten Myotuben, Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die zur Markierung der Wirtszellen einerseits und *Toxoplasma*-Parasiten andererseits angewendeten primären Antikörper sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Die zur Wirtszellcharakterisierung und Infektionsanalyse angewendeten Primärantikörper

Zelllinie/Parasiten	Primäre Antikörper	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
Murine C2C12-Myotuben	MyHC (Myosin Heavy Chain)	Kaninchen	Santa-Cruz	1:100
NIH3T3-Fibroblasten	Aktin, Klon C4	Maus	Prof. J. Lessard, Cincinnati, USA	1:250
Embryonale Neuronen	Beta III Tubulin	Maus	Covance, Princeton, USA	1:100
Embryonale Astrozyten	GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	Ratte	Zymed, San Francisco, USA	1:100
<i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten	Polyklonaler Antikörper	Maus	Instituts-eigene Herstellung	1:1000
<i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten	Polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Instituts-eigene Herstellung	1:1000

2.2.3.4 Ablauf der genomweiten Transkriptomanalyse

Die Infektionsversuche wurden sechs Mal wiederholt. Vier RNA-Proben pro infiziertem und nicht-infiziertem Zelltyp, die während der Infektionsqualitätskontrolle die besten Resultate erzielten, wurden gepoolt. Die gepoolten RNA-Proben (je 5 µg/ml) wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig (Arbeitsgruppe Genomanalytik) zunächst in Template Molekül-Bibliotheken konvertiert, um sie anschließend durch Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels Illumina Genome Analyzer II zu untersuchen. Zur Herstellung der Template-Bibliotheken wurde der RNA-Seq Sample Preparation Kit von Illumina verwendet.

Die Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode mittels Illumina Genome Analyzer beruhte auf der anfänglichen Reinigung und anschließend Fragmentierung der isolierten RNA-Stränge. Anschließend wurden die RNA-Fragmente mit speziellen Adaptoren an ihre Enden ligiert. Darauf folgend erfolgte eine Reverse Transkription von RNA-Fragmenten. Die cDNA-Fragmente banden an die Oberfläche einer Durchflusszelle, die mit einzelsträngigen Oligonukleotiden bedeckt waren. Die Oligonukleotide wiesen eine Sequenzkomplementarität zu bestimmten Adaptoren auf und nach derer Bindung vervielfältigten sich die Fragmente nach der „Brücken-Amplifikation“. Multiple, sich wiederholende Amplifikationen jedes Fragments resultierten in der Entstehung multipler einzigartiger Nukleinsäure-Cluster. Anschließend wurden die Fragmente mittels fluoreszierenden Nukleotiden, die ein elektrisches Signal ergeben, sequenziert, bis sie eine Länge von 36 Basen (Reads) erreicht hatten. Dreißig bis 100 Millionen solcher Reads pro Probe wurden mit dem Mausreferenzgenom und dem *Toxoplasma*-Genom verglichen (Read Mapping).

2.2.3.5 Analyse und statistische Auswertung der Transkriptomdaten

Um die Transkripte anschließend zu normalisieren, wurde für jedes Gen ein RPKM-Wert berechnet. Der RPKM-Wert drückt die Ratio der Readzahl, die innerhalb eines Transkriptes binden, zur Länge des Transkriptes (Exons) (in Kilobasen) und der Gesamtmenge der auf ein Genom passenden Reads (in Millionen) aus.

Für weitere Analysen und statistische Auswertungen wurden statistisch signifikante Transkripte berücksichtigt, wobei die Signifikanz nach dem χ^2 -Test berechnet wurde. Anschließend wurden die Expressionsprofile mittels MarVis-Software im Rahmen einer Zusammenarbeit mit M.Sc. Alexander Kaefer von der Abteilung für Bioinformatik (AG Morgenstern), Georg-August-Universität Göttingen, erstellt. Zur grafischen Darstellung der Expressionsprofile wurden Heat Maps und Dendrogramme der Transkriptome von *Toxoplasma*-infizierten und nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten

zur Verfügung gestellt. Die funktionellen Analysen der Gene/Transkripte wurden mittels Bioinformatikprogrammen wie der DAVID-Analysesoftware (david.abcc.ncifcrf.gov) durchgeführt.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle von amplifizierten DNA-Fragmenten und von isolierten Plasmiden wurden diese in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Das 2%-ige Agarosegel wurde durch Lösen von Agarose NEEO Ultra-Qualität (Carl Roth) in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer hergestellt. Die Lösung wurde bis zur vollständigen Auflösung des Agarosepulvers gekocht. Nach kurzem Abkühlen wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung (0,1%) zugegeben, vorsichtig geschwenkt und in eine Gelkammer mit einem Plastikamm gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden 10 µl des PCR-Amplifikats mit 1 µl 6X DNA-Loading Dye vermischt und in die Agarosegeltasche aufgetragen. Zusätzlich wurden 10 µl des 50 bp bzw. 1 kb GeneRuler-DNA-Marker (Fermentas) (Tabelle 2) als Größenstandard eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte bei 80 mA, wobei Nukleinsäurebanden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Biometra) detektiert wurden.

2.2.5 Untersuchungen zum Tspyl2-,Knock-down‘ mittels RNA-Interferenz

Um das Testis-specific Y-encoded-like protein 2 (*Tspyl2*) – Zielgen auf der mRNA-Ebene auszuschalten, wurden „short hairpin Ribonukleinsäure“ (shRNA)-Sequenzen tragende TRC1-pLKO.1-lentivirale Plasmidvektoren eingesetzt. Das Prinzip des Tspyl2-,Knock-downs‘ beruht auf der Spaltung der Tspyl2-mRNA über einen Tspyl2-siRNA/RISC-Komplex. Die „small interfering RNA“ (siRNA) entstand dabei durch den Abbau des Loops von shRNA durch das Enzym DICER.

Um die Potenz des Tspyl2-mRNA-,Knock-down‘ zu erhöhen und stabile Transfektanten zu erzeugen, wurden fünf unterschiedliche Tspyl2-shRNA-MISSION[®] TRC1 pLKO.1-Plasmide als bakterielle Glycerolstocks verwendet (Sigma-Aldrich). Alle Sequenzen der Tspyl2-shRNA-Fragmente sind in Tabelle 7 aufgelistet. Der Aufbau des pLKO.1-Plasmids ist in Abbildung 2-2 dargestellt, wobei die Ampicillin- und Puromycinresistenzen die wichtigen Selektionsmarkern repräsentierten. Als Negativkontrolle wurde MISSION[®] pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid-DNA (Sigma Aldrich) eingesetzt (Abbildung 2-3). Es stellt ein Plasmid dar, das keine shRNA-Sequenz trägt. Dadurch ist die Aktivierung des RNA induzierten Silencing-Komplexes oder RISCs ausgeschlossen.

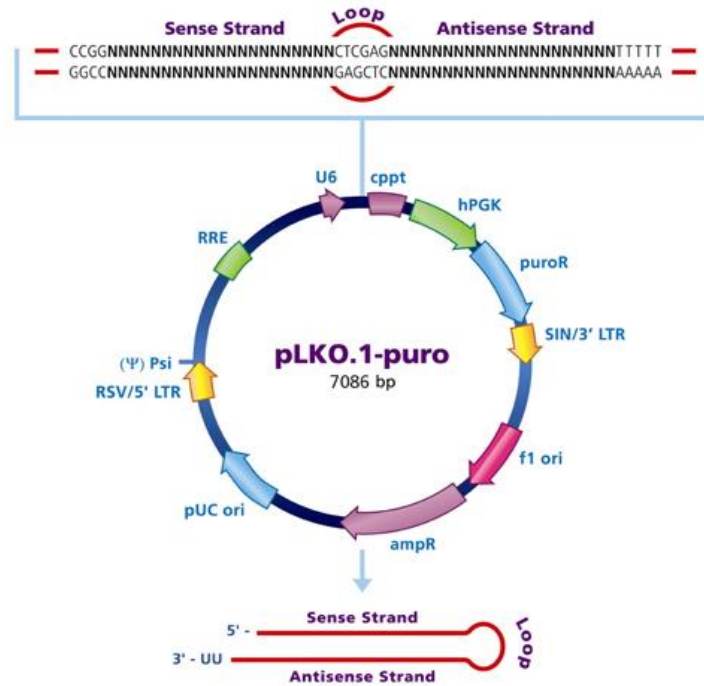


Abbildung 2-2: Darstellung des MISSION® pLKO.1-Plasmids. Die fünf lentiviralen Vektorplasmide trugen unterschiedliche *Tsply2*-shRNA-Sequenzen, die sich zwischen dem Polymerase III Promotor (U6) und dem zentralen Polypurintrakt (cppt) befanden. Die wichtigen Selektionsmarken sind die Ampicillin- und Puromycinresistenz. Abbildung von Sigma Aldrich.

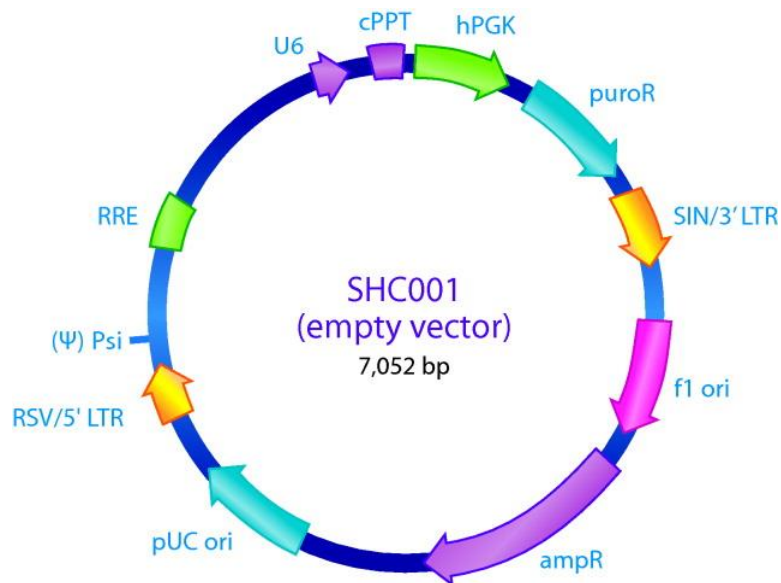


Abbildung 2-3: Darstellung des MISSION® pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA als Negativkontrolle. Dieses Plasmid trägt keine shRNA-Sequenz. Da keine shRNA gebildet wird, wird kein RISC-Komplex aktiviert. Die wichtigen Selektionsmarken sind die Ampicillin- und Puromycinresistenz. Plasmidstruktur entnommen von Sigma Aldrich.

Tabelle 7: Diverse Sequenzen der shRNA-Fragmente, die gegen Tspyl2-mRNA gerichtet sind. Die rot markierten Basen entsprechen der Loop-Stelle innerhalb einer shRNA-Sequenz, welche anschließend durch den DICER-Komplex zu siRNA gespalten werden. Die siRNA-Fragmente binden und spalten daraufhin die Tspyl2-mRNA. Die Negativkontrolle kodiert keine shRNA-Sequenz.

Plasmidname	shRNA-Sequenz
	Tspyl2-shRNA-Insert
MISSION®pLKO.1-shRNA 1	CCGGCGGAAAGGAAAGAGCCAAGAACTCGAGTTCTTGGCTCTTTCCTTCCGTTTTTG
MISSION®pLKO.1-shRNA 2	CCGGGCCCTAGAAACCTGTAGCTTACTCGAGTAAGCTACAGGTTTCTAGGGCTTTTTG
MISSION®pLKO.1-shRNA 3	CCGGCCACTGCCCTATGTCATTCTTCTCGAGAAGAATGACATAGGGCAGTGGTTTTTG
MISSION®pLKO.1-shRNA 4	CCGGGCGTCTCAAGCGCAAATTCATCTCGAGATGAATTTGCGCTTGAGACGCTTTTTG
MISSION®pLKO.1-shRNA 5	CCGGCCAGATGTTAGTTGGTCCGAACTCGAGTTCGGACCAACTAACATCTGGTTTTTG
	Negativkontrolle
MISSION®pLKO.1-puro	kein shRNA-Insert

2.2.5.1 *Escherichia coli*-Anzüchtung für Tspyl2-shRNA-pLKO.1-Plasmidisolation

Tspyl2-shRNA-Inserts tragende Plasmide wurden als *Escherichia coli*-Glycerolstocks von Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Circa 50-100 µl des Glycerolstocks wurden zu 0,5 ml vorgewärmtem LB-Medium im sterilen Kulturröhrchen hingefügt. Anschließend wurde die Kultur bei 37°C für 15-30 Minuten geschüttelt. Danach wurden 20-50 µl der inkubierten *E. coli*-Kultur auf frisch vorbereitete und mit Ampicillin (100 µg/ml) supplementierten LB-Platten nach der *Drei-Strich*-Ausstrichmethode verteilt. Die Platten wurden 15-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Fünf unterschiedliche Tspyl2-shRNA-Plasmid tragende *E. coli*-Kolonien wurden im 5 ml LB-Medium angezüchtet und für die anschließende Plasmidpräparation vorbereitet.

2.2.5.2 *Escherichia coli* -Anzüchtung für die pLKO.1-puro-Plasmidisolation

Der NEB5- α kompetente *Escherichia coli* Stamm wurde schonend auf Eis für 10 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl (= 100 ng) der MISSION®pLKO.1-puro-shRNA-Plasmidlösung zu den aufgetauten NEB5- α -Zellen hinzugefügt und vorsichtig in der Suspension geschwenkt. Dabei wurde nicht gevortext. Die Suspension wurde 30 Minuten lang auf Eis ruhen gelassen, daraufhin 30 Sekunden bei 42 °C inkubiert und erneut für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 950 µl Super Optimal Broth-Lösung (SOB-

Medium) (Tabelle 8) zu der Suspension hinzugefügt und 60 Minuten lang bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Darauf folgend wurde sie vorsichtig gemischt und 1:10, 1:10², 1:10³ und 1:10⁴ verdünnt. Fünfzig bis 100 µl jeder Verdünnung wurden auf vorgewärmtem LB-Agar (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden ausgewählten Kolonien in 5 ml LB Medium angezüchtet und für eine Plasmidpräparation vorbereitet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des SOB-Mediums.

	Zusammensetzung	Hersteller
SOB-Medium	Bacto-Trypton 2% Bacto-Hefeextrakt 0,5% NaCl 10mM KCl 2,5mM Glukose 20mM MgCl ₂ 10mM H ₂ O	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.2.5.3 Plasmidisolation

Die pLKO.1-Plasmide aus *Escherichia coli*-Zellen wurden mit Hilfe des GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) isoliert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 12.000 g durchgeführt. Fünf Milliliter der bakteriellen Übernachtskultur wurden 1 Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 200 µl Resuspensionslösung gemischt und kräftig vorgetext. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer und vorsichtiges Invertieren lysiert. Danach wurden 350 µl Bindungslösung hingefügt und erneut vorsichtig achtmal invertiert und 10 Minuten zentrifugiert. Parallel wurde ein Bindsäulchen vorbereitet, in dem 500 µl Säulenpräparationslösung für 30 Sekunden durch die Membran zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das klare Zelllysate auf die Bindsäule überführt, 30 Sekunden zentrifugiert, mit 750 µl Waschpuffer gewaschen und kurz zentrifugiert. Nach Abgießen des Filtrats wurde die Bindemembran durch erneutes Zentrifugieren getrocknet, um Ethanolreste zu beseitigen. Das Plasmid wurde durch Zugabe von 100 µl Elutionslösung von der Membran gelöst, seine Konzentration bestimmt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.4 Transfektion von C2C12-Myoblasten mit isolierten pLKO.1-Plasmiden

Der Transfer von diversen Tspyl2-shRNA tragenden pLKO.1-Plasmiden in die C2C12-Myoblasten wurde mit Hilfe des FuGENE® Transfektionsreagenz (Roche) durchgeführt. Zunächst wurden 7 x 10⁴ C2C12-Myoblasten ausgesät und nach 24 Stunden in DMEM-Medium mit 3% FCS für 30 Minuten inkubiert. Parallel wurden 2 µg Plasmid mit jeweils 3 µl

oder 6 µl Transfektionsreagenz nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema gemischt und 15 Minuten vorgewärmt. Darauf folgend wurde die Plasmid-Transfektionsreagenz-Mischung vorsichtig und unter Schwenken auf die Zellen getropft. Nach 4 Stunden der Transfektion bei 37 °C wurde erneut das DMEM-Medium (1% FCS) ausgetauscht. Nach 48 Stunden Zellwachstum wurde zu den Transfektanten Puromycin (2,5 µg/ml) zur Selektion zugegeben.

Tabelle 9: Pipettierschema der Proben zur Transfektion von C2C12-Myoblasten mit pLKO.1-Plasmiden

Plasmidname	Plasmidkonzentration	Transfektionsreagenz
pLKO.1- Tspyl2-shRNA 1	2 µg	3 µl bzw. 6 µl
pLKO.1- Tspyl2-shRNA 2	2 µg	3 µl bzw. 6 µl
pLKO.1- Tspyl2-shRNA 3	2 µg	3 µl bzw. 6 µl
pLKO.1- Tspyl2-shRNA 4	2 µg	3 µl bzw. 6 µl
pLKO.1- Tspyl2-shRNA 5	2 µg	3 µl bzw. 6 µl
pLKO.1- puro Kontrollplasmid	2 µg	3 µl bzw. 6 µl

2.2.6 Proteinisolation

Die in 6-Napf Schalen steril kultivierten Zellen wurden mit 500 µl kaltem 1x PBS und anschließend mit EDTA gespült. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und in vorgekühlte 15 ml Röhren überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 g und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Phosphataseinhibitionslösung (Abschnitt 2.1.1) aufgenommen, resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Danach wurde die Probe bei 4 °C und 3800 g für 5 Minuten zentrifugiert und in Lysepuffer (Abschnitt 2.1.1) resuspendiert. Das Lysepuffervolumen bezog sich dabei auf die jeweilige Zellzahl der Probe und betrug 140 µl auf 350 x 10⁴ Zellen. Die Zellen wurden 1 Stunde lysiert und dabei alle 15 Minuten kräftig gevortext und danach 5 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde entnommen und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7 SDS-PAGE

Nach der Proteinisolation erfolgte ihre elektrophoretische Auftrennung durch SDS-PAGE in einem 10%-igen Polyacrylamidgel. Die Zusammensetzung des 10%-igen Trenngels und des Sammelgels ist im Abschnitt 2.1.1 dargestellt. Zur Auftrennung von Proteingemischen wurden jeweils 10 µl Proteinlysate mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde zusätzlich ein Proteinmolekulargewichtsmarker (Tabelle 2) aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine in 1x Laemmli-Elektrophoresepuffer (Abschnitt 2.1.1) nach ihrer Größe bei 25 mA pro Gel für etwa 60 Minuten aufgetrennt.

2.2.8 Western Blotting (Semi dry)

Das Polyacrylamidgel mit den durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde anschließend auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) überführt. Das Polyacrylamidgel und die Nitrozellulosemembran wurden mit in unterschiedlichen Puffern (Abschnitt 2.1.1) getränkten Filtern nach dem in der Abbildung 2-4 dargestellten Schema bedeckt. Von der Kathodenseite aus wurden 9 Filtern auf das Polyacrylamidgel gelegt. Darunter wurde eine Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und anschließend 3 und 6 Filterpapiere mit Anodenlösung 1 bzw. 2 platziert. Der Elektrotransfer der Proteine fand bei 32 mA pro Gel für 90 Minuten statt.

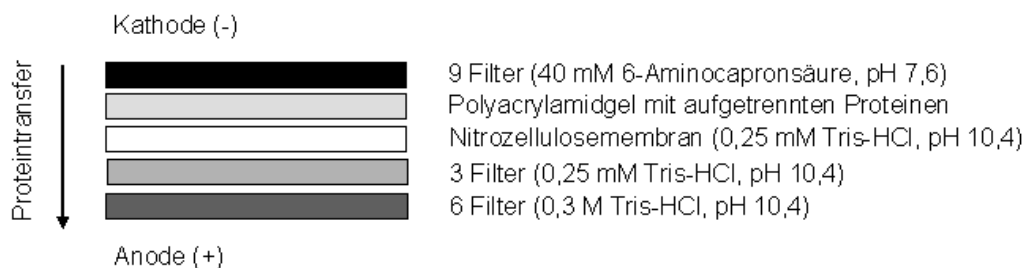


Abbildung 2-4: Schema der Anordnung von Papierfiltern, Gel und Nitrozellulosemembran zum Elektrotransfer von Proteinen.

2.2.9 Immunfärbung von Nitrozellulosemembranen

Die von dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragenen und denaturierten Proteine wurden zunächst mit Ponceaus S reversibel angefärbt und anschließend zwei Mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Darauf folgend wurde die Membran für 2 Stunden mit Blockierungslösung (Abschnitt 2.1.1) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran 5 Minuten mit Waschlösung (Abschnitt 2.1.1) gewaschen und mit einem der in Tabelle 10 aufgeführten Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen und danach mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 11). Beide Antikörper wurden jeweils in Inkubationslösung (Abschnitt 2.1.1) verdünnt. Danach wurde die Membran dreimal 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen, um anschließend für eine ECL- (engl. enhanced chemiluminescence) Detektion vorbereitet zu werden. Zu diesem Zweck wurde ECL™ Western Blotting Detektionsreagenz (GE Healthcare) verwendet. Zunächst wurde eine Mischung aus Luminol und chemischem Verstärker (Phenol) in gleichen Volumenanteilen angesetzt. Eine Oxidation des Luminols durch die Meerrettichperoxidase in Gegenwart des

Phenols bewirkte eine Lichtemission bei 428 nm, die anschließend vom Chemilumineszenzmessgerät Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm) detektiert und optisch mittels der ImageQuant LAS 4000 Control Software dargestellt wurde.

Tabelle 10: In der Immunfärbung von Western Blot verwendete Primärantikörper.

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller	Verdünnung
Akt	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
CyclinB1	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
Erk 1/2	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
MyoD	Kaninchen	BD Phamingen TM	1:250
Myogenin	Maus	BD Phamingen TM	1:250
Myosin Heavy Chain	Mause	BD Phamingen TM	1:1000
p21	Maus	Santa-Cruz	1:200
p38	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
p53	Maus	Santa-Cruz	1:200
P-Akt	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
P-Erk1/2	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
P-p38	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
P-SAPK/JNK	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
SAPK/JNK	Kaninchen	Cell-Signaling	1:1000
β-Aktin	Maus	Prof. J. Lessard, Cincinnati, USA	1:10000

Tabelle 11: Bei der Immunfärbung von Western Blots verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Mouse (H+L)	Jackson ImmunoResearch/Dianova	1:2000
Peroxidase konjugiertes Esel anti-Kaninchen (H+L)	Jackson ImmunoResearch/Dianova	1:5000

2.2.10 Indirekter und direkter Immunfluoreszenztest

Zellen wurden in 24-Napf Zellkulturplatten auf sterile Glasplättchen (Durchmesser 13 mm; Thermo Fisher Scientific) in der in Tabelle 12 dargestellten Zelldichte ausgesät. Die Glasplättchen waren zuvor für 2 Stunden mit 15 µg/ml Maus-Laminin in destilliertem Wasser (Sigma Aldrich) bei 37°C beschichtet und anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen worden.

Durch Immunfluoreszenztest wurden Zielproteine in den fixierten Zellen dank der in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellten primären und sekundären Antikörper (indirekt) beziehungsweise durch *Dolichos biflorans*-Lektins (direkt) nachgewiesen.

2.2.10.1 Fixierung der Zellen

Die Zellen auf den Glasplättchen wurden durch 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal für 5 Minuten mit 1x PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit 350 µl pro Napf 4% PFA überdeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Proben danach 10 Minuten mit NH₄Cl-Lösung behandelt und darauf folgend wiederum mit 1x PBS waschen.

Tabelle 12: Zellzahlen, die für Immunfluoreszenzfärbungen in 24-Napf Zellkulturplatten auf Glasplättchen ausgesät wurden.

Zelllinie	Zellzahl
C2C12-Myotuben	2 x 10 ⁴
C2C12-Myoblasten	8 x 10 ⁴
C2C12-Transfektanten	8 x 10 ⁴
NIH3T3-Fibroblasten	8 x 10 ⁴

2.2.10.2 Immundetektion

Die fixierten Zellen wurden entweder für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht blockiert und permeabilisiert. Die Zusammensetzung der Blockierungslösung ist im Abschnitt 2.1.1 angegeben. Danach wurden die Proben mit 0,1 mg/ml Saponin in 1x PBS für 10 Minuten gewaschen. Die Glattplättchen wurden anschließend mit der Zelleseite jeweils in einen 32 µl-Tropfen der verdünnten Primärantikörper (

Tabelle 13) gelegt und 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes wurden die Proben dreimal 10 Minuten in Saponin-Lösung (siehe oben) gewaschen. Anschließend wurden die Deckplättchen, wie für Primärantikörper beschrieben, in 32 µL-Tropfen der verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 14) gelegt und erneut 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach wurde sie erneut dreimal 10 Minuten in 1x PBS mit Saponin gewaschen. Im Fall der Anwendung vom *Dolichos biflorans*-Lektin wurde kein Sekundärantikörper angewendet. Je nach Fragestellung wurden die Zellen zusätzlich in 5 µg/ml Propidiumiodidlösung 4 Minuten inkubiert und zweimal für je 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Zum Ende wurden die Glasplättchen in entmineralisiertem Wasser eingetaucht und mit Mowiol auf Objektträgern platziert. Die Proben wurden über Nacht im Dunkeln zum Trocknen bei Raumtemperatur gelagert und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt. Die gefärbten Zellen wurden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (Leica TCS SPII) analysiert.

Tabelle 13: Beim Immunfluoreszenztest eingesetzte primäre Antikörper.

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller	Verdünnung
Indirekter Immunfluoreszenztest			
5-Bromo-2'-Deoxyuridine	Maus	Cell-Signalling	1:1000
Desmin	Maus	BD Phamingen TM	1:2000
MyoD	Kaninchen	BD Phamingen TM	1:50
Myogenin	Maus	BD Phamingen TM	1:50
Myosin Heavy Chain	Maus	BD Phamingen TM	1:100
<i>Toxoplasma gondii</i>	Maus	Institutseigene Herstellung	1:500
<i>Toxoplasma gondii</i> (Charge RS7-2)	Kaninchen	Institutseigene Herstellung	1:1000
Direkter Immunfluoreszenztest			
FITC-konjugiertes <i>Dolichos biflorans</i> -Lektin	-	Sigma-Aldrich	1:200

Tabelle 14: Beim Immunfluoreszenztest eingesetzte sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Cy TM 3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 2-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 5-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 2-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 5-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100
Cy TM 2-konjugiertes Esel F(ab') ₂ -Fragment anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg	1:100

2.2.10.3 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) – Einbau und Detektion

Das 5-Bromo-2'-Deoxyuridine ist ein Thymidin- bzw. Desoxyuridinanalogon, das in neu synthetisierte DNA während der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird. Durch eine einstündige Inkubation von Zellen, die in 24-Napf Zellkulturplatten auf Glasplättchen ausgesät waren (Abschnitt 2.2.10.1), mit 10 µg/ml BrdU-Lösung (Sigma Aldrich) bei 37 °C wurde das Nukleosid während der DNA-Replikation in neu synthetisierte DNA eingebaut. Nach 1 Stunde wurde die BrdU-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden mit 70%-igem eiskaltem EtOH für 5 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und danach 30 Minuten in 1,5 N HCl bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie erneut zweimal mit 1x PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierungslösung (Abschnitt 2.1.1) abgesättigt und die Zellen dann mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-spezifischem Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit Sekundärantikörper für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert und danach erneut zweimal gewaschen. Die Zellen wurden abschließend in einem Tropfen Mowiol (circa 10 µl) auf einem Objektträger eingebettet.

2.2.11 Statistische Analyse

Jedes Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt. Aus den einzelnen Daten pro Versuch wurden Mittelwerte berechnet sowie der Standardfehler des Mittelwertes ermittelt. Die Mittelwerte zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines Experimentes wurden statistisch mittels Student's *t*-Test auf Signifikanz überprüft. Wurden *p*-Werte kleiner als 0,05 ermittelt, wurde der Unterschied zwischen zwei Gruppen als signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von C2C12-Muskelzellen während Differenzierung *in vitro*

Die C2C12-Muskelzellen stellen murine Myoblasten dar, die im Laufe der terminalen Differenzierung *in vitro* lange polynukleäre Myotuben formen. Die terminale Differenzierung von C2C12-Myoblasten wurde mit Hilfe von 2%igem Pferdeserum (HS) initiiert. Die Differenzierungseffizienz der Myoblasten wurde anhand der Reversen Transkriptase-quantitativen PCR (RT-qPCR), der Immunfluoreszenztechnik, dem Immunoblot und mittels 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU)-Markierung untersucht.

3.1.1 Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels Immunfluoreszenz

Zunächst wurden die Myosin Heavy Chain (MyHC; Myosin Schwere Kette)- und die Desmin-Proteinexpressionen, die Marker der Muskeldifferenzierung darstellen, im Fluoreszenztest mittels spezifischer Primärantikörper und Cyanin 2 (Cy2)-konjugierter Sekundärantikörper nachgewiesen (Abbildung 3-1). Während zu Beginn der terminalen Differenzierung weder MyHC (Abbildung 3-1; A) noch Desmin (Abbildung 3-1; F) in den Myoblasten nachweisbar waren, stieg ihre Expressionen innerhalb von 144 Stunden stark an. Interessanterweise wurde bereits nach 48 Stunden sowohl MyHC als auch Desmin innerhalb von einkernigen Zellen beobachtet (Abbildung 3-1; B, G).

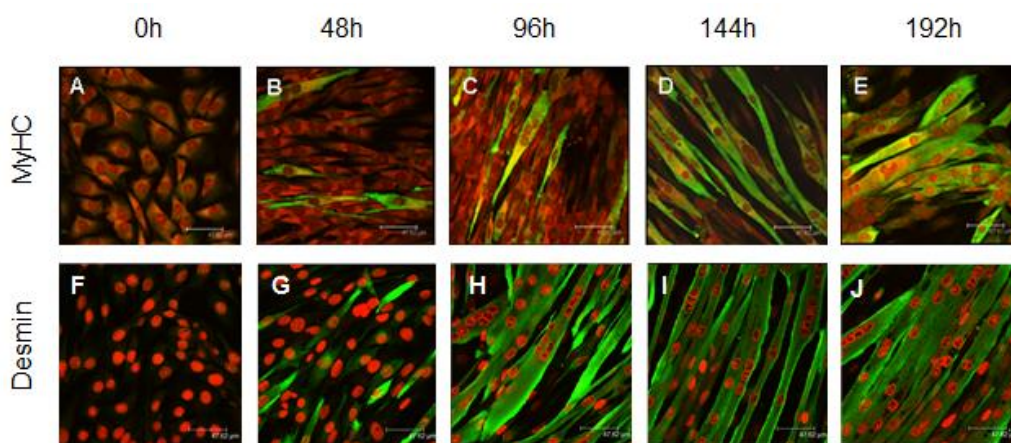


Abbildung 3-1: Nachweis der Expression und Lokalisation der myotubenspezifischen Proteinmarker Myosin Heavy Chain (MyHC; A-E) und Desmin (F-J) mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Es wurden 2×10^4 Myoblasten in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium (0 Stunden) überführt. Alle 48 Stunden wurden Zellen fixiert. Desmin und MyHC wurden anhand spezifischer Antikörper und Cy2-konjugierter Sekundärantikörper (grün) und die Zellkerne mittels Propidiumiodideinsatz (rot) markiert. Die Bilder stammen aus einem repräsentativen Experiment von zwei.

Darüber hinaus nahmen die Myoblasten - trotz relativ kurzer Kultivierungszeit im Differenzierungsmedium (48 Stunden) - die für junge Myotuben charakteristische, verlängerte Struktur an (Abbildung 3-1; B, G). Die ersten ausdifferenzierten Synzytien lagen ab Stunde 96 vor (Abbildung 3-1; C, H). Zum Zeitpunkt von 144 Stunden waren alle Myotuben MyHC- und Desmin-positiv.

3.1.2 Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels Immunoblots

Der Differenzierungsprozess von SkMZ wird u. a. von Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren wie Myogenin und MyoD gesteuert. MyoD spielt während der aktiven Myoblastenproliferation ebenfalls eine wichtige Rolle. Darum ist es sowohl bei Myoblasten als auch bei Myotuben auf der Proteinebene im Laufe der Myoblastenfusion detektierbar.

In Abbildung 3-2 ist eine geringe Abnahme des circa 45 kDa großen MyoD-Proteins nach 48 Stunden der Differenzierung zu erkennen. Danach blieb die MyoD-Menge bis 192 Stunden konstant.

Die Menge an Myogenin-Protein (34 kDa) stieg dagegen im Laufe der Myotubenbildung an, wobei zwischen 96 und 144 Stunden mindestens eine Verdoppelung der Proteinmenge zu erkennen war (Abbildung 3-2). Der stetige Myogenin-Anstieg wurde von einer ebenfalls starken MyHC-Zunahme begleitet (Abbildung 3-2). MyHC ist ein exzellenter Differenzierungsmarker von SkMZ und war bereits 48 Stunden nach Beginn der C2C12-Differenzierung deutlich exprimiert (200 kDa). Zwischen 48 und 144 Stunden war eine weitere Zunahme innerhalb der Myotuben festzustellen, was auf die dynamische MyHC-Expression schließen ließ (Abbildung 3-2).

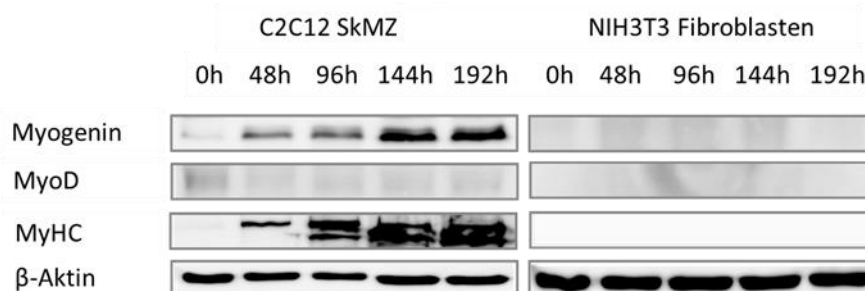


Abbildung 3-2: Nachweis der skelettmuskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin sowie des Myotubenmarkers MyHC in C2C12- (links), nicht aber in NIH3T3 (rechts) -Zellen mittels Western Blot. Es wurden 10×10^4 Myoblasten in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium (0 Stunden) überführt. NIH3T3-Zellen wurden als Kontrollen parallel mitgeführt. Alle 48 Stunden wurden Proteine isoliert und anschließend mittels spezifischer Primärantikörper und HRP-markierter sekundärer Antikörper sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen. Die repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei durchgeführten Experimenten.

Zur Kontrolle wurden beide myogene Transkriptionsfaktoren (MyoD, Myogenin) sowie das MyHC-Protein in murinen NIH3T3 Fibroblasten untersucht. Nach 192 Stunden der NIH3T3 Proliferation konnten keine muskelspezifischen Proteine festgestellt werden (Abbildung 3-2), was die Spezifität der nachgewiesenen Proteine für SkMZ bestätigte. Außerdem deutete dies einerseits auf den myogenen Ursprung der C2C12-Zellen (MyoD, Myogenin) und andererseits auf eine erfolgreiche terminale Differenzierung von Myotuben (Myogenin, MyHC) hin. Aufgrund fehlender myogener Proteine in Fibroblasten, wurde außerdem eine Ladungskontrolle über einen β -Aktin-Nachweis durchgeführt (Abbildung 3-2).

3.1.3 Untersuchung der C2C12-Differenzierung mittels RT-qPCR

Eine effiziente Differenzierung von C2C12-Muskelzellen wurde auch mittels RT-qPCR bestätigt. Die Untersuchung der Expression von MyoD in C2C12-Zellen zeigte ihre höchste Transkription 96 Stunden nach Beginn der Differenzierung (Hochregulation gegenüber 0 Stunden = 67,65). Danach nahm sie im Laufe der weiteren Differenzierung wieder ab. Zwischen 144 und 192 Stunden sank die Menge des MyoD-Transkriptes um das etwa 40-fache auf den Wert wie vor Differenzierung (Abbildung 3-3; Tabelle 15).

Parallel zu MyoD konnte zwischen 48 und 96 Stunden eine Verdopplung der Myogenin-Hochregulation gegenüber 0 Stunden von 16,13 auf circa 36 festgestellt werden. Interessanterweise nahm die Myogenin-Expression zum Ende des Experiments (zwischen 96 und 192 Stunden Inkubationszeit) von 36 auf 18,2 ebenfalls wieder ab (Abbildung 3-3).

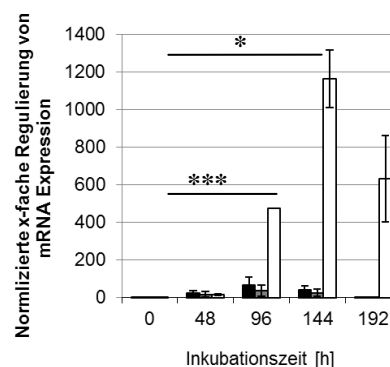


Abbildung 3-3: Mittlere Expression von mRNA der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD (schwarz), Myogenin (grau) und des Myotubenmarkers MyHC (weiß) im Laufe der C2C12-Differenzierung.

Es wurden 10×10^4 Myoblasten in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium (0 Stunden) überführt. Zu verschiedenen Zeitpunkt wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und cDNA-Mengen mittels qPCR mit spezifischen Primerpaaren amplifiziert. Daten stellen die relative Expression der mRNAs zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zum Zeitpunkt 0 Stunden dar. Die Normalisierung dieser Daten wurde anhand der β -Aktin cDNA durchgeführt. Alle Werte stellen die Mittelwerte und die Standardfehler von zwei unabhängigen Untersuchungen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$, *** für $p < 0,001$.

Die MyHC-Expression stieg zwischen 48 und 96 Stunden der Kultivierung um den Faktor 33,85 an (Abbildung 3-3; Tabelle 15). Die stärkste Expression mit einer Hochregulation gegenüber 0 Stunden wurde mit 1164,42, 144 Stunden nach Beginn der terminalen Differenzierung, erreicht (Abbildung 3-3; Tabelle 15).

Tabelle 15: Transkription von den muskelspezifischen Genen *MyoD*, *Myogenin* und *MyHC* in C2C12-SkMZ während der terminalen Differenzierung.

Das Expressionsprofil jedes Gens wurde über den Mittelwert und den Standardfehler (SEM) dargestellt, wobei alle Daten die Hochregulation zu einem bestimmten Zeitpunkt im Vergleich zum Zeitpunkt 0 Stunden darstellen. Alle Werte wurden graphisch in der Abbildung 3-3 dargestellt. Die Expression Muskel-spezifischer mRNAs wurde auf die von β -Aktin normalisiert.

Zeitpunkt [h]	MyoD		Myogenin		MyHC	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
48	25,373	± 11,427	16,138	± 15,242	14,632	± 4,838
96	67,65	± 42,35	35,985	± 28,525	474,88	± 0,02
144	40,458	± 23,082	24,479	± 18,601	1164,42	± 154,86
192	0,688	± 0,682	1,8195	± 1,8055	631,09	± 230,05

3.1.4 Zellzyklusanalyse während der C2C12-Differenzierung mittels BrdU-Interkalation

Tritt eine C2C12-Myoblastenzelle aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase über, wird auch die DNA-Replikation gestoppt. Dieses Ereignis kann mittels 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) sichtbar gemacht werden, denn BrdU wird als Thymidinanalogon aktiv in einen neu synthetisierten Nukleinsäurestrang eingebaut. Die Markierung von Zellkernen mit neu gebildeter DNA durch BrdU-spezifische Antikörper lässt daher auf eine Vervollständigung des Zellzyklus und die Zytokinese einer Zelle zurückschließen. Das Ziel dieser Untersuchung war es daher, teilungsaktive Zellen wie C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten zu markieren und sie von Zellzyklus-arretierten C2C12-Myotuben abzugrenzen.

Wie in Abbildung 3-4 ersichtlich, verblieben Zellkerne von differenzierten C2C12-Zellen BrdU-negativ. Die vielkernigen Myotuben, die sehr deutlich MyHC exprimierten, zeigten keinen Einbau von BrdU in Zellkerne zum Zeitpunkt 0 und 48 Stunden, was auf ihren postmitotischen und damit ruhenden Zellzyklus zurückzuführen war (Abbildung 3-4; A, B). Dagegen erwiesen sich C2C12-Myoblasten (C, D) und NIH3T3-Fibroblasten (E, F) als aktiv proliferierend. Sowohl zum Zeitpunkt 0 Stunden als auch nach weiteren 48 Stunden wurde eine deutlich größere Anzahl an BrdU-markierten Zellkernen sichtbar. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Zellkerne per Sichtfeld zum Zeitpunkt von 0 Stunden und 48 Stunden quantifiziert. Während die Anzahl der BrdU-positiven Kerne in Myotuben über den Zeitraum von 2 Tagen stabil blieb und 10 betrug (Abbildung 3-5; schwarze Balken), stieg die Anzahl markierter Kerne in C2C12-Myoblasten von 30 auf circa 40 und in den NIH3T3-Zellen von ebenfalls etwa 30 auf sogar 50 (Abbildung 3-5; graue bzw. weiße Balken). Eine

aktive Proliferation von C2C12-Myoblasten wurde zusätzlich durch die ersten MyHC-positiven Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden deutlich, die aufgrund enger Zell-Zell-Kontakte zu differenzieren begannen (Abbildung 3-4; D).

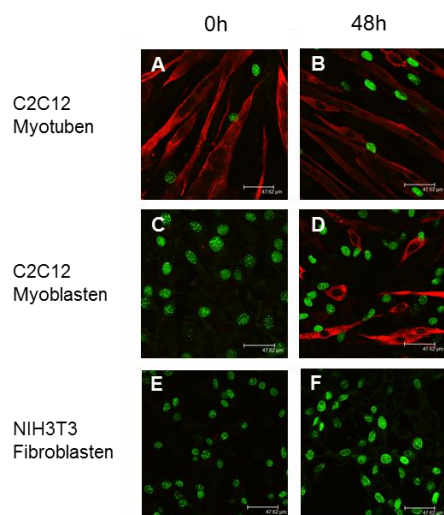


Abbildung 3-4: Nachweis von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-markierter Zellkerne innerhalb der C2C12-Myotuben, Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Doppelimmunfluoreszenz.

C2C12-Myoblasten (2×10^4) wurden 168 Stunden in Differenzierungsmedium kultiviert. C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten wurden 24 Stunden vor der 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Behandlung (8×10^4) ausgesät. Zum Zeitpunkt von 0 und 48 Stunden nach Differenzierung bzw. nach Aussaat wurden alle drei Zelltypen mit $10 \mu\text{g/ml}$ BrdU eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden BrdU-positive Zellkerne und MyHC mittels spezifischer Antikörper und Cy2- (grün, BrdU) bzw. Cy3-markierter Sekundärantikörper (rot, MyHC) detektiert. Die Bilder stammen aus einem repräsentativen Experiment. Insgesamt wurden zwei Experimente durchgeführt.

Maßstab: $47,62 \mu\text{m}$.

3.1.5 Zusammenfassung

Mittels Myosin- und Desminnachweis (Abbildung 3-1), die neben α -Aktin wichtige Komponenten von Muskelfasern darstellen, sowie MyoD- und Myogenin-Expressionprofilen (Abbildung 3-2; Abbildung 3-3), konnte gezeigt werden, dass C2C12-Myoblasten in Gegenwart von Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium effektiv zu Myotuben *in vitro* differenzieren. Dagegen weisen die Myoblasten und Fibroblasten laut BrdU-Analysen einen aktiv proliferierenden Charakter auf (Abbildung 3-4). Somit stellen die differenzierten C2C12-Zellen ein effektives Skelettmuskelzell-Modell *in vitro* dar. C2C12-Myotuben wurden daher für die anschließenden *Toxoplasma*-Infektionsversuche eingesetzt, um den Einfluss der Muskeldifferenzierung auf die Parasitenentwicklung zu untersuchen.

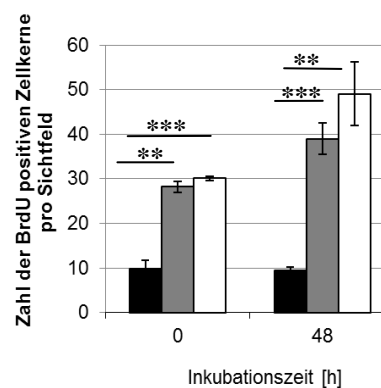


Abbildung 3-5: Quantifizierung der 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-positiven Zellkerne pro Sichtfeld bei C2C12-Myotuben (schwarz), -Myoblasten (grau) und NIH3T3-Fibroblasten (weiß).

Zellen wurden wie in Abbildung 3-4 beschrieben, behandelt. Es wurden die Zellkerne von 10 Sichtfeldern innerhalb einer Probe ausgezählt. Werte stellen den Mittelwert und den Standardfehler von zwei unabhängigen Untersuchungen dar.

Signifikanzniveaus: ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$.

3.2 Untersuchungen zur *T. gondii*-Infektion von SkMZ und Fibroblasten

Differenzierte SkMZ *in vivo* stellen einen wichtigen Zelltyp für die *T. gondii*-Persistenz dar [Dubey et al., 1998]. Zahlreiche *in vitro* Untersuchungen wiesen auf eine erhöhte parasitäre Zystenbildung in Myotuben im Vergleich zu Fibroblasten hin [Ferreira da Silva et al., 2009a; 2009b]. Bisher lagen jedoch keine Daten zu den Unterschieden in der *Toxoplasma*-Stadienkonversion zwischen Myoblasten und Myotuben vor.

Das Ziel der folgender Analysen war es daher zu untersuchen, ob und wie stark sich die Tachyzoiten-Bradyzoiten-Stadienkonversion einerseits und die *Toxoplasma gondii*-Replikation andererseits in unterschiedlichen Zelltypen wie murine SkMZ bzw. murine Fibroblasten *in vitro* unterscheiden und ob die Parasitenentwicklung auch vom Differenzierungsgrad der SkMZ (Myoblasten versus Myotuben) abhängt.

3.2.1 Zelltyp-bedingte Stadiendifferenzierung von *T. gondii*

Mit Hilfe von RT-qPCR-Analysen und Immunfluoreszenz wurde die Bildung von bradyzoitenhaltigen Zysten nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten (Stamm NTE, Genotyp II) sowohl in C2C12- als auch NIH3T3-Zellen ermittelt.

3.2.1.1 Quantifizierung bradyzoitenspezifischer Gene mithilfe RT-qPCR

Das Transkriptionsprofil der Bradyzoiten-spezifischen Marker von *Toxoplasma gondii* BAG1 und ENO1 wurde für infizierte C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten bestimmt. Während 4 Stunden nach der Infektion in keiner der Zelltypen BAG1-Expression detektiert werden konnte, stieg dessen Transkription nach 48 Stunden in Myotuben etwa zweifach stärker an als in Myoblasten und Fibroblasten (Abbildung 3-6; A). Die stärkste Expression von BAG1 wurde zum Zeitpunkt von 96 Stunden in Myotuben festgestellt und war mehr als 20-fach höher als zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der Infektion. Die BAG1-Expression war zu diesem Zeitpunkt damit doppelt so hoch wie die Expression in infizierten C2C12-Myoblasten (Hochregulation 8-fach) und Fibroblasten (11-fach) (Abbildung 3-6; A).

Zugleich wurde ein stetiger Anstieg der Expression von ENO1 in C2C12-Myotuben während der Infektion nachgewiesen (Abbildung 3-6; B). Allerdings wurde ENO1 im Vergleich zu BAG1 deutlich schwächer hochreguliert. Die ENO1-Hochregulation betrug 72 Stunden post infectionem 1,6-fach und erreichte zum Zeitpunkt von 96 Stunden in Myotuben den Wert

2,4-fach (Abbildung 3-6; B). In Myoblasten und Fibroblasten war keine deutliche Hochregulation von ENO1 festzustellen.

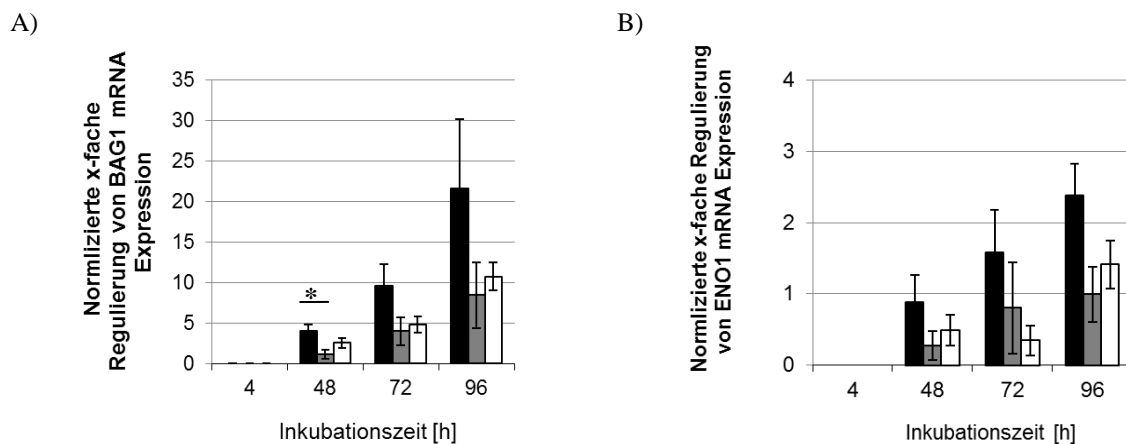


Abbildung 3-6: Bestimmung der Expression von BAG1 (A) und ENO1 (B) in C2C12-Myotuben (schwarz), -Myoblasten (grau) und NIH3T3-Zellen (weiß) während der *Toxoplasma*-Infektion mittels RT-qPCR. Zehn $\times 10^4$ Myoblasten wurden in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt. Sie differenzierten über 168 Stunden. Einen Tag vor der Infektion wurden Myoblasten und Fibroblasten (70×10^4 Zellen) ausgesät. Myotuben, Myoblasten und NIH3T3-Zellen wurden dann mit *T. gondii* im Verhältnis 3:1 (Parasiten- zu Wirtszellzahl) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mRNA gewonnen, in cDNA umbeschrieben und spezifische cDNAs mittels qPCR amplifiziert. Die Proben, die 4 Stunden nach dem Infektionsbeginn entnommen wurden, stellen die Referenzwerte dar. Die BAG1- und ENO1-Expressionswerte wurden auf *Toxoplasma*-Tubulin (Tub) normalisiert. Alle Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$.

3.2.1.2 Nachweis von Gewebezysten mittels Doppelimmunfluoreszenz

Zusätzlich zur Untersuchung der Transkription bradyzoitenspezifischer Gene wie *BAG1* und *ENO1* wurden bradyzoitenhaltige Gewebezysten durch Immunfluoreszenzfärbung mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL) nachgewiesen. Dieses Lektin bindet relativ spezifisch an die zuckerreiche Zystenwand und markiert somit das persistierende Stadium des Parasiten. Die polynukleären Myotuben wurden gleichzeitig durch Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen MyHC und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen.

Wie in Abbildung 3-7 gezeigt, wurden *Toxoplasma*-Gewebezysten in allen drei Zelltypen nachgewiesen. Während 4 Stunden nach der Infektion erwartungsgemäß keine Zysten innerhalb der C2C12-Muskelzellen (A, E) und NIH3T3-Fibroblasten (I) detektiert wurden, wiesen alle drei Zelltypen Zysten ab der 48 Infektionsstunde auf (Abbildung 3-7; B-D versus F-H versus J-L). Innerhalb der DBL-positiven Gewebezysten wurden mittels spezifischem Antiserum und Cy5-gekoppeltem Sekundärantikörper auch *Toxoplasma*-Parasiten sichtbar gemacht (Abbildung 3-7). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen Zystengröße und Zelltyp festgestellt werden. So waren sowohl kleine (2 Parasiten) als auch große Zysten (32

Parasiten) nachweisbar, deren Durchmesser bis zu 25 μm betrug. Junge Zysten zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Infektion enthielten meistens Parasitenzahlen kleineren Umfangs.

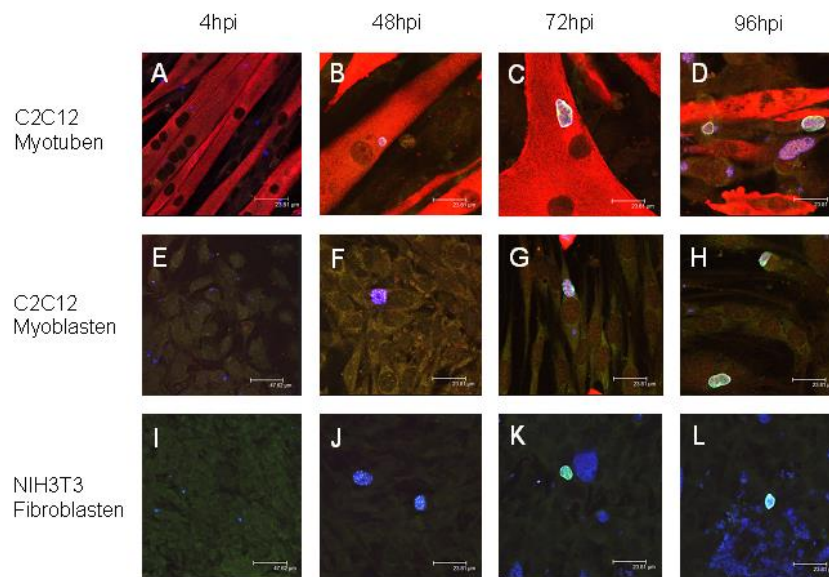


Abbildung 3-7: Nachweis von *Toxoplasma*-Gewebezysten innerhalb von C2C12-Myotuben (A-D), -Myoblasten (E-H) und NIH3T3-Fibroblasten (I-L) mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung.

Zwei $\times 10^4$ C2C12-Myoblasten wurden in 24-Napf Schalen über 168 Stunden in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium differenziert. Einen Tag vor Infektion wurden 8×10^4 Myoblasten und Fibroblasten ausgesät. Danach wurden sie im Parasit zu Wirtszellverhältnis von 3:1 mit *Toxoplasma*-Tachyzoiten für unterschiedliche Zeiten infiziert. Nach Fixierung der Zellen wurden Parasiten mit spezifischem Antiserum und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern (blau) markiert. Die zuckerreichen Wände von Gewebezysten wurden mit FITC-konjugiertem *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL) grün gefärbt. Als Marker für differenzierte Myotuben wurde MyHC mit spezifischen Primärantikörpern und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern rot gefärbt. Die hier dargestellten repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei durchgeführten Experimente.

Maßstab: 11,9 μm und 23,81 μm .

Eine Quantifizierung der DBL-positiven Zysten untermauerte die oberen dargestellten RT-qPCR-Analysen. Bereits 48 Stunden nach der Infektion war die Zystenmenge, mit durchschnittlich 9 pro Gesichtsfeld, in den Myotuben mindestens doppelt so hoch wie in Myoblasten ($x = 4$) und Fibroblasten ($x = 3$) (Abbildung 3-8). Diese stärkere Zystenbildung von *T. gondii* in Myotuben im Vergleich zu Myoblasten und Fibroblasten wurde auch zum Zeitpunkt von 72 Stunden festgestellt. Voraussichtlich aufgrund der zunehmenden Tachyzoitenreplikation wiesen Myotuben und Myoblasten einen leichten Rückgang der Zystenbildung nach 96 Stunden auf (Abbildung 3-8).

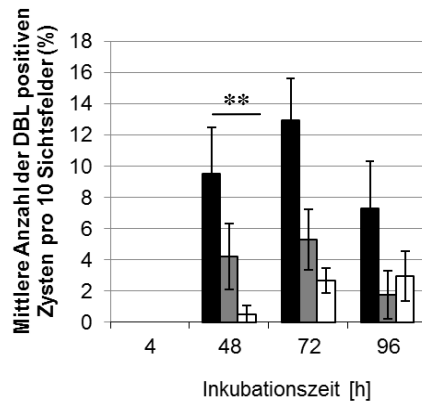


Abbildung 3-8: Quantifizierung der *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL)-positiven Zysten in Myotuben (schwarz), Myoblasten (grau) und Fibroblasten (weiß) zum Zeitpunkt 4, 48, 72, 96 Stunden nach Infektion mit *T. gondii*. Infektionsversuche und Immunfluoreszenzfärbung wurden wie unter Abbildung 3-7 beschrieben durchgeführt. Die Daten stellen das prozentuale Verhältnis der FITC-markierten Zysten zur gesamten Cy5-gefärbten Parasitenzahl aller 10 Sichtfelder dar. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und die Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar. Signifikanzen: ** für $p < 0,01$.

3.2.2 Zelltyp-bedingte Unterschiede in der *T. gondii*-Replikation

Die oben dargestellten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass terminal differenzierte SkMZ die Differenzierung von *T. gondii* zu Bradyzoiten stärker fördern als Myoblasten und Fibroblasten. Dabei waren keine externen Stressfaktoren notwendig, um die spontane Bildung von Bradyzoiten und die darauf folgende Zystenbildung in Myotuben zu induzieren. Parallel dazu wurde auch ein Rückgang der Replikation von *Toxoplasma* während der Stadienkonversion in den Wirtszellen festgestellt. Das Ziel der nachfolgenden Versuche war es daher, die Parasitenreplikation in Skelettmuskelzellen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Zellen mit *Toxoplasma gondii* infiziert. Im Anschluss wurde die Intensität der Parasitenentwicklung mittels qPCR bzw. Immunfluoreszenz analysiert.

3.2.2.1 Untersuchung der *T. gondii*-Replikation mittels qPCR

Die Quantifizierung von *Toxoplasma gondii* hatte zum Ziel, die Replikation des Parasiten in den verschiedenen Zelltypen zu bestimmen. Dazu wurde ein 529 bp langes, repetitiv vorkommendes genomisches Genfragment amplifiziert. Aus den durch qPCR ermittelten Cp-Werten wurde entsprechend Formel 2 die Parasitenzunahme über die Zeit berechnet.

Formel 2: Bestimmung der Intensität der *Toxoplasma*-Replikation.

Die zum Zeitpunkt 4 Stunden post infektionem ermittelten Cp-Werte dienten als Referenzwerte. Von ihnen wurden alle darauf folgenden Cp-Werte subtrahiert. Alle Berechnungen wurden separat für die C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt.

$$Cp\Delta = Cp^{4h} - Cp^{xh}$$

$$\text{Toxoplasma gondii's Replikationsintensität} = 2^{Cp\Delta}$$

Die Untersuchungen zeigten eine annähernd gleiche *Toxoplasma*-DNA-Menge für infizierte Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion (Abbildung 3-9). Dagegen schien das Parasitenwachstum bereits zum Zeitpunkt von 48 Stunden in Myoblasten stärker zu sein als in Myotuben und Fibroblasten. Zum Zeitpunkt von 72 Stunden nach Infektion zeigten sich dann deutliche Unterschiede in der *Toxoplasma*-Teilung. In Myotuben zeigte *T. gondii* eine im Vergleich zu Fibroblasten etwa 50% kleinere und in Bezug auf Myoblasten sogar eine um 100% schwächere Replikation (Abbildung 3-9).

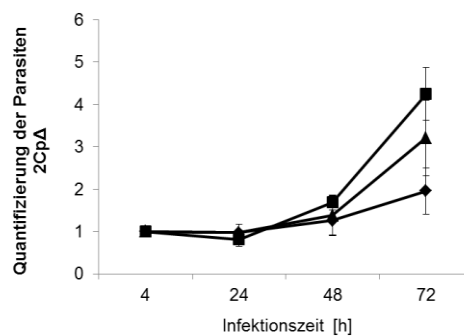


Abbildung 3-9: Quantifizierung der *Toxoplasma*-Parasiten in C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲) mittels qPCR.

Zehn $\times 10^4$ Myoblasten wurden während 168 Stunden in Pferdeserum-haltigem Medium zu Myotuben differenziert. Einen Tag vor Infektion wurden circa 70×10^4 Myoblasten und Fibroblasten ausgesät. Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten wurden anschließend mit NTE-Tachyzoiten im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 5:1 infiziert. Nach 4 Stunden und nachfolgend im Abstand von jeweils 24 Stunden wurde DNA aus extra- und intrazellulären Parasiten extrahiert. Das 529 bp lange Fragment der gDNA wurde mittels spezifischer Primer und quantitativer Real-Time PCR (qPCR) amplifiziert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus sechs unabhängigen Versuchen dar.

3.2.2.2 Untersuchung der *T. gondii*-Replikation mittels Immunfluoreszenz

Um die in Myotuben offensichtlich geringere Parasitenreplikation im Vergleich zu Myoblasten und Fibroblasten zu bestätigen, wurden außerdem Immunfluoreszenzfärbungen des Parasiten mikroskopisch analysiert. Wie aus Abbildung 3-10 ersichtlich, wurden 24 Stunden nach der Infektion keine deutlichen Unterschiede in den *Toxoplasma*-Mengen in C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3 festgestellt (A, D, G). Solche Unterschiede wurden aber zum Zeitpunkt von 48 Stunden deutlich sichtbar. Insgesamt zeigten Myoblasten und Fibroblasten im Vergleich zu Myotuben eine höhere Anzahl und auch größere parasitophore Vakuolen (PV) (Abbildung 3-10; E, H). Große Veränderungen waren vor allem 72 Stunden nach Parasitenzugabe festzustellen. Gegenüber den Myoblasten und Fibroblasten waren in den parasitophoren Vakuolen von Myotuben nur wenige immunfluoreszenzmarkierte Parasiten zu erkennen (Abbildung 3-10; C, F, I). Dagegen führte *T. gondii* in Myoblasten und Fibroblasten, nicht aber in Myotuben, bereits deutlich zur Wirtszelllyse.

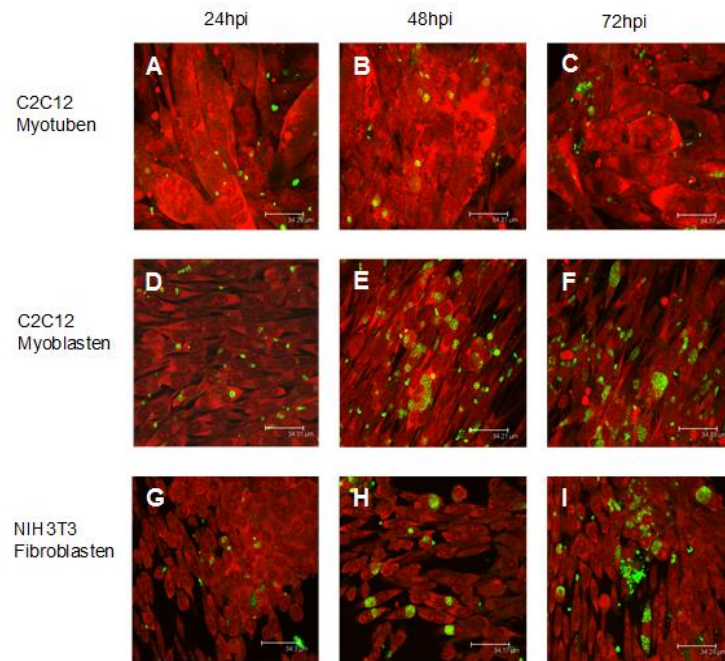


Abbildung 3-10: Immunfluoreszenzfärbung von *Toxoplasma gondii* NTE-Parasiten in C2C12-Myotuben (A-C), -Myoblasten (D-F) und NIH3T3-Fibroblasten (G-I) während 72-stündigen Infektion.

Zwei $\times 10^4$ C2C12-Myoblasten wurden in Pferdeserum-haltigem Medium in 24-Napf Schalen über 168 Stunden differenziert. Einen Tag vor Infektion wurden 8×10^4 Myoblasten und Fibroblasten ausgesät. Am folgenden Tag wurden alle Zellen mit Toxoplasmen im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis von 5:1 infiziert und danach zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden fixiert. Die *Toxoplasma*-Parasiten wurden mittels spezifischer Antikörper und Cy2-gekoppelter Sekundäntikörper grün gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid markiert. Die dargestellten Bilder präsentieren ein von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Maßstab: 34,31 μm .

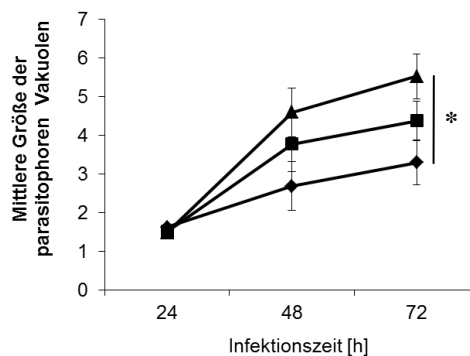


Abbildung 3-11: Bestimmung der mittleren Parasitenzahl pro PV innerhalb von C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).

Infektionsversuche und Parasitennachweis wurde wie in Abbildung 3-10 beschrieben durchgeführt. Die mittlere Parasitenmenge pro PV in jedem Zelltyp und Zeitpunkt wurde nach Auszählung von 100 PV errechnet. Mittelwerte und Standardfehler zeigen Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Signifikanzen: * für $p < 0,05$.

Anschließend wurde die durchschnittliche Größe von 100 PV pro Zeitpunkt und Zelltyp bestimmt, indem die Anzahl der darin enthaltenen Parasiten ausgezählt wurde. Vierundzwanzig Stunden nach Infektion waren die PV in allen drei Zellproben vergleichbar

groß und beherbergten 1 bis maximal 2 Parasiten (Abbildung 3-11). Die PV waren 48 Stunden nach der Infektion innerhalb der proliferierenden Myoblasten und Fibroblasten im Durchschnitt deutlich größer als in Myotuben (Abbildung 3-11).

Insgesamt stieg die mittlere Parasitenzahl pro PV zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Infektion in Myoblasten auf circa 4,5 und circa 5,5 in Fibroblasten, während die PV innerhalb der differenzierten SkMZ durchschnittlich nur 3,5 Parasiten enthielten (Abbildung 3-11).

3.2.3 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse weisen auf eine verstärkte *Toxoplasma*-Stadienkonversion und Zystenbildung bei gleichzeitig reduzierter Parasitenreplikation in terminal differenzierten Myotuben hin. Demgegenüber förderten die proliferierenden Myoblasten und Fibroblasten die Replikation von *Toxoplasma gondii* (Abbildung 3-9; Abbildung 3-10) bei gleichzeitig geringer Bradyzoitenbildung (Abbildung 3-6).

3.3 Serum-bedingte Regulation der terminalen Differenzierung und der *Toxoplasma gondii*-Entwicklung

Einer der Gründe für die schwächere Replikation von *Toxoplasma gondii* in den Myotuben könnte das Differenzierungsmedium darstellen, in dem die infizierten Zellen kultiviert wurden. Um einen potenziellen wachstumshemmenden Einfluss des Pferdeserum-haltigen Differenzierungsmediums im Vergleich zu dem Myoblasten- bzw. Fibroblasten-Medium auf den Parasiten auszuschließen, wurden die SkMZ zunächst in Differenzierungsmedium zu Myotuben differenziert. Unmittelbar vor der Infektion wurde ein Teil der Myotuben in FCS-haltiges Wachstumsmedium überführt, das auch für die Kultur von Myoblasten bzw. Fibroblasten verwendet wird. Ein Teil der Myotuben wurde dagegen während der Infektion weiterhin in Differenzierungsmedium kultiviert. Nach Infektion mit *T. gondii* wurde einerseits die Infektionsstärke mittels qPCR bestimmt und andererseits die mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markierten Parasiten quantifiziert.

3.3.1 Einfluss des Kälberserums auf die Myotubendifferenzierung

Um zunächst jedoch sicherzustellen, dass der Wechsel vom Differenzierungsmedium zu Wachstumsmedium die Differenzierungsstärke der C2C12-Synzytien (Myotuben) nicht negativ beeinflusst, wurde seine Wirkung auf die *MyHC*-Expression überprüft. Dazu wurden zunächst C2C12-Myoblasten 144 Stunden lang zu Myotuben differenziert. Dieser Zeitpunkt entsprach dem Zeitpunkt 0 Stunden (Abbildung 3-12). Anschließend wurde ein Teil der Myotuben im Differenzierungsmedium belassen und ein Teil der Myotuben in

Wachstumsmedium überführt und danach für 72 Stunden inkubiert. Die dadurch eventuell auftretenden Veränderungen in der MyHC-Transkription wurden alle 24 Stunden durch RT-qPCR bestimmt. Wie Abbildung 3-12 zu entnehmen ist, wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen der MyHC-Transkription in den Myotuben aufgrund der Kultivierung in zwei unterschiedlichen Medien festgestellt. Eine De-Differenzierung der Myotuben nach Wechsel der Zellen in Wachstumsmedium konnte damit weitgehend ausgeschlossen werden.

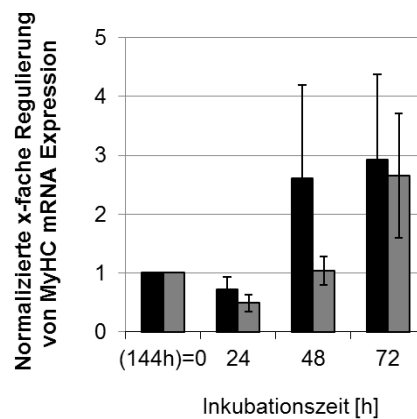


Abbildung 3-12: Bestimmung der *MyHC*-Genexpression in C2C12-Myotuben während Kultivierung in Differenzierungs- (schwarz) bzw. Wachstumsmedium (grau) mittels RT-qPCR.

Zehn $\times 10^4$ Myoblasten wurden in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium für 144 Stunden zu Myotuben differenziert. Danach (0 Stunden) wurde ein Teil der Zellen in FCS-haltiges Wachstumsmedium überführt während die übrigen Zellen weiterhin in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Danach wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von MyHC durch qPCR bestimmt. Die Regulation der MyHC-mRNA zwischen Zeitpunkt 0 und verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation wurde auf die β -Aktin (*Actb*)-cDNA normalisiert. Die abgebildeten Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler von zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.3.2 Einfluss unterschiedlicher Medien auf die *T. gondii*-Teilungsrate

Da polynukleäre Synzytien vom Wachstumsmedium während 72 Stunden nicht negativ beeinflusst wurden, wurden Myotuben beider Kulturbedingungen darauf folgend mit *Toxoplasma* infiziert. Im Laufe der 72-stündigen Infektion wurden die Parasiten mittels qPCR quantifiziert und nach Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch analysiert.

3.3.2.1 Untersuchungen der *T. gondii*-Teilungsrate mittels qPCR

Die in Abbildung 3-13 dargestellte *Toxoplasma*-Quantifizierung wies auf keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Parasitenmenge in beiden Myotubenproben hin. Bereits 24 Stunden post infectionem zeigte sich die Parasitenzahl in beiden Myotubenproben nahezu gleich und betrug circa 1,3. Im Laufe der weiteren Infektion stieg die *Toxoplasma*-Replikation zwar an, es wurden jedoch zwischen den beiden Myotubenpopulationen weiterhin keine Unterschiede in der Parasitenmenge festgestellt. Die *Toxoplasma*-DNA-Menge stieg auf 3,43

in den infizierten C2C12-Myotuben im Differenzierungsmedium bzw. 3,11 im Wachstumsmedium. Myoblasten unterstützten dagegen ein stärkeres Parasitenwachstum als beide Myotubenpopulationen.

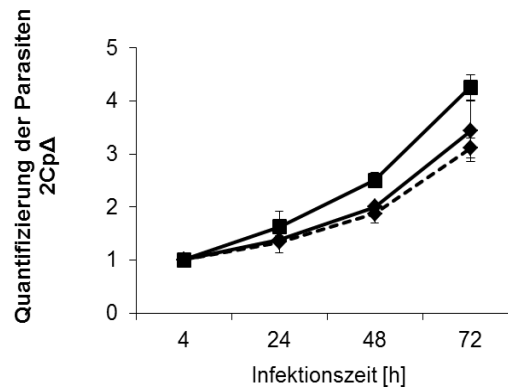


Abbildung 3-13: Bestimmung der Intensität der *Toxoplasma gondii*-Replikation in Myotuben während Inkubation in Wachstums- (gestrichelte Linie; ◆) bzw. Differenzierungsmedium (durchgezogene Linie, ◆) und in Myoblasten (durchgezogene Linie, ■) mittels quantitativer PCR.

Zehn $\times 10^4$ Myoblasten wurden in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium für 144 Stunden zu Myotuben differenziert. Anschließend wurden sie entweder in FCS-haltiges Wachstumsmedium überführt oder in Differenzierungsmedium belassen und zusammen mit nicht-differenzierten Myoblasten im Parasit-Wirtszell-Verhältnis 5:1 mit *T. gondii* infiziert. Nach 4 Stunden und nachfolgend im Abstand von jeweils 24 Stunden wurde DNA aus extra- und intrazellulären Parasiten extrahiert. Das 529 bp-Fragment von *T. gondii* wurde dann durch quantitative Real-Time PCR amplifiziert und die Menge an Parasiten-DNA als Maß für die Infektionsstärke (Formel 2) berechnet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen zwei unabhängige Experimente zusammen und stellen Mittelwerte und Standardfehler dar.

3.3.2.2 Untersuchung der *T. gondii*-Teilungsrate mittels Doppelimmunfluoreszenz

Zur Untermauerung der oben dargestellten Quantifizierungsergebnisse wurden Parasiten nach Infektion der unterschiedlich kultivierten Myotuben außerdem mit spezifischen Antikörpern und Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern fluoreszent gefärbt und darauf folgend die mittlere Größe der PV bestimmt. Außerdem wurde der Differenzierungsgrad der Myotuben durch Immunfluoreszenzfärbung von MyHC untersucht.

Abbildung 3-14 weist auf keine Unterschiede hinsichtlich des Differenzierungsgrades der Myotubenpopulationen, die einerseits in Wachstumsmedium und andererseits in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, hin. Die MyHC-Proteine wiesen im Laufe der 72-stündigen Infektion unter beiden Kulturbedingungen (A-C versus D-F) eine deutliche und stabile Expression auf.

Darüber hinaus konnten keine erheblichen Unterschiede im *Toxoplasma*-Wachstum während der Infektion festgestellt werden (Abbildung 3-14; A-C versus D-F). Die durchschnittliche PV-Größe war in beiden Myotubenproben unabhängig vom Kulturmedium etwa gleich.

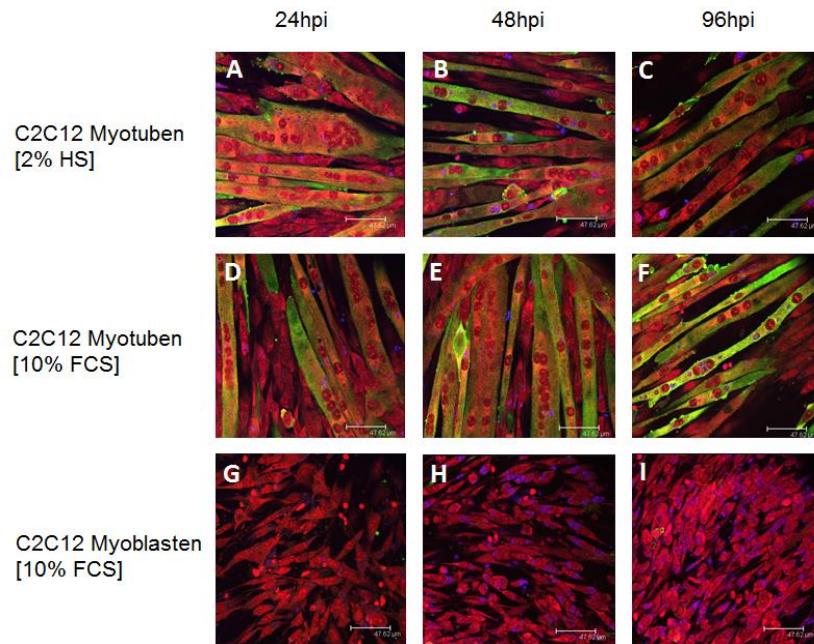


Abbildung 3-14: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von *Toxoplasma*-Parasiten innerhalb unterschiedlich kultivierter C2C12-Myotuben (A-C versus D-F) sowie Myoblasten (G-I).

Nach Differenzierung *in vitro*, wurden Myotuben einerseits in Differenzierungsmedium mit 2% Pferdeserum (HS) und andererseits in Wachstumsmedium mit 10% FCS kultiviert. Nach Infektion (Infektionsdosis 5 Parasiten pro Wirtszelle) der Myotuben und Myoblasten, wurden Toxoplasmen mit einem spezifischen Antiserum und Cy5-konjugiertem Sekundärantikörper (blau) angefärbt. MyHC-Protein wurde parallel mittels indirekter Immunfluoreszenz grün gefärbt. Propidiumiodid (rot) wurde zur Färbung der Gesamtzellpopulation eingesetzt. Die repräsentativ dargestellten Bilder stammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 µm.

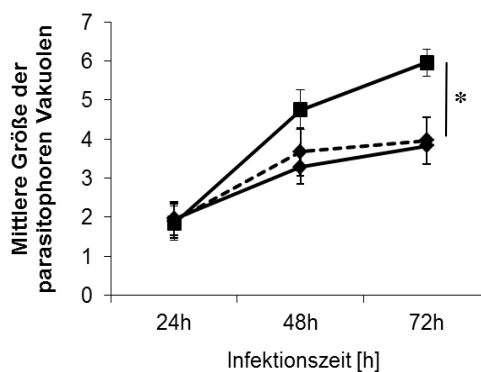


Abbildung 3-15: Bestimmung der mittleren Anzahl von *T. gondii*-Parasiten pro PV innerhalb vom C2C12-Myotuben, die in Differenzierungs- (durchgezogene Linie) bzw. Wachstumsmedium (gestrichelte Linie) kultiviert wurden (◆) und in Myoblasten (■).

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3-14 beschrieben. Es wurden insgesamt 100 PV pro Probe ausgezählt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$.

Während zum Zeitpunkt von 24 Stunden post infektionem die PV im Schnitt zwei Parasiten beherbergten, stieg die Parasitenzahl pro PV in beiden Myotubenproben auf circa 3,5 nach 48 Stunden bzw. 4 nach 72 Stunden an (Abbildung 3-15). Dagegen erlaubten Myoblasten eine

erhöhte *Toxoplasma*-Replikation (Abbildung 3-14; G-I). Diese Beobachtungen wurden zusätzlich durch Quantifizierung der PV untermauert (Abbildung 3-15).

3.3.2.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die verminderte *Toxoplasma gondii*-Replikation in Myotuben vom Differenzierungsgrad der Myotuben, nicht aber vom Kultivierungsmedium, abhängt (Abbildung 3-13; Abbildung 3-14). Unabhängig ob Myotuben während der Infektion in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium oder in FCS-haltigem Wachstumsmedium kultiviert wurden, war im Vergleich zu Myoblasten die parasitäre Entwicklung innerhalb der Myotuben reduziert. Somit lagen keine Gegenanzeigen für eine weitere Anwendung des Differenzierungsmediums in künftigen Infektionsversuchen vor.

3.4 Genomweite Transkriptionsanalysen zur Untersuchungen Zelltyp-spezifischer *T. gondii*-Wirtszell-Interaktionen

Toxoplasma gondii persistiert *in vivo* besonders häufig in differenzierten SkMZ und Neuronen und differenziert *in vitro* effizienter in terminal differenzierten SkMZ zu Bradyzoiten als in anderen Zelltypen (siehe oben). Die Gründe dafür blieben bisher allerdings ungeklärt. Um die Zelltyp-spezifischen Interaktionen zwischen *Toxoplasma* und SkMZ genauer zu untersuchen, wurde eine genomweite Transkriptomanalyse durchgeführt.

Neben SkMZ wurden zusätzlich Neurone, Fibroblasten und Astrozyten in die Analysen mit eingeschlossen. Es wurde der Hypothese nachgegangen, dass SkMZ und Neurone, die terminal differenzierte und Zellzyklus-arretierte Zelltypen darstellen, ein anderes mRNA-Expressionsprofil vor und nach Infektion mit *T. gondii* aufweisen als proliferierende Astrozyten und Fibroblasten.

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der AG Schlüter (Magdeburg) durchgeführt, die viel Erfahrung bei der Isolierung und Kultur von primären murinen embryonalen Neuronen und fetalen Astrozyten haben. Ein Teil der Zellen wurde mit *Toxoplasma gondii* (Stamm NTE) im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 5:1 für 24 Stunden infiziert. Die RNA-Isolation, -Konzentrationsmessung und -Qualitätssicherung von infizierten bzw. nicht-infizierten Wirtszellen wurde im Kapitel 2.2.3 genau beschrieben. Bei jedem Infektionsversuch wurde parallel eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Kontrolle der Wirtszellen und Infektion durchgeführt. Die Infektionsversuche wurden sechsmal wiederholt. Diejenigen RNA-Proben, die während der Infektionsqualitätkontrolle die besten Resultate

erzielten, wurden gepoolt und anschließend mittels Illumina-GAII High-Throughput-Sequenzierung in Zusammenarbeit mit der Abteilung Genomanalytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI, Braunschweig) analysiert.

3.4.1 Untersuchungen zur Kontrolle der RNA-Qualität und der Infektion

3.4.1.1 Bestimmung des RNA-Degradierungsgrades

Die Bestimmung des Degradierungsgrades von isolierten RNA-Proben wurde sowohl bei den einzelnen als auch bei den gepoolten Zelltypen durchgeführt. Da gepoolte RNA-Proben anschließend sequenziert wurden, sind hier nur deren Qualitätsprofile präsentiert (Abbildung 3-16).

Wie stark eine RNA-Probe degradiert vorliegt, wird über das 28S-rRNA zu 18S-rRNA-Verhältnis einerseits und die RNA-Integritätsnummer (RIN) andererseits beschrieben (Abschnitt 2.2.3.2). Die RIN-Nummer kann generell einen Zahlenwert von 1 bis 10 annehmen, wobei der Wert 10 größtmögliche RNA-Reinheit darstellt.

Abbildung 3-16 zeigt die gelelektrophoretischen Auftrennungen der für die Sequenzierung verwendeten gepoolten RNA-Proben. Die obere Bande (ca. 3900 nt) entspricht der 28S-rRNA, die untere Bande der 18S-rRNA (circa 1900 nt). Beide Banden lagen in allen Proben scharf vor und wurden von keinen nennenswerten zusätzlichen unerwünschten Banden begleitet. Die RIN-Werte variierten zwischen 9,7 und 10. Somit wiesen sie auf eine exzellente Qualität der RNA hin, so dass eine RNA-Degradierung ausgeschlossen werden konnte.

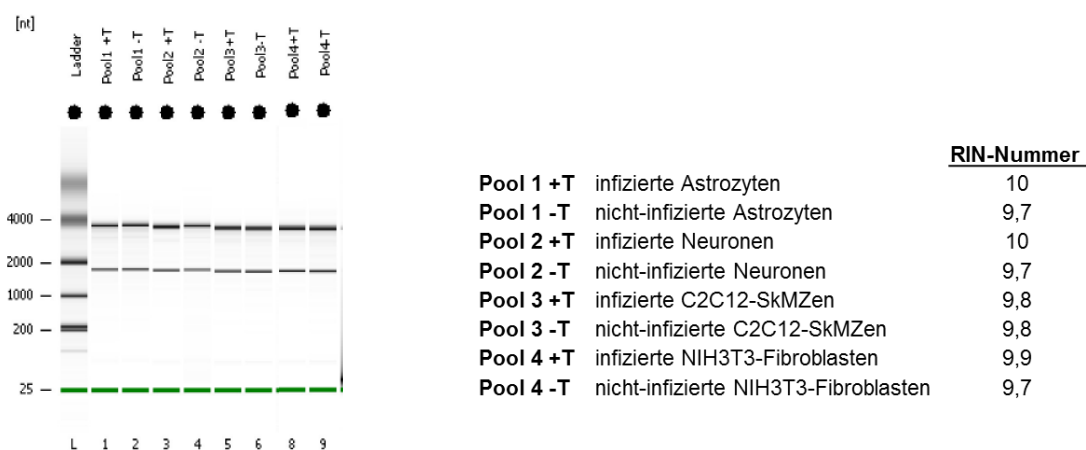


Abbildung 3-16: RNA-Qualitätssicherung mittels Gelelektrophorese (links) und Bestimmung der RIN-Werte (rechts) der aus mehreren Infektionsversuchen gepoolten RNA-Proben.

Total-RNA aus *T. gondii*-infizierten (Infektionsdauer 24 Stunden) und nicht-infizierten murinen Astrozyten, Neuronen, C2C12-Skelettmuskelzellen und NIH3T3-Fibroblasten wurden jeweils gepoolt. Die Qualität der Total-RNA-Präparationen wurde mit Nano- bzw. Pikogramm-Empfindlichkeit mittels spezieller Chips (Nano/PicoChip, Agilent Technologies) gemessen. Ribosomale 28S- und 18S-rRNA der Säugerzellen wurden als gleichmäßig starke und scharfe Banden nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbar dargestellt. Ein Größenstandard wurde parallel aufgetrennt.

3.4.1.2 Qualitätskontrolle der Infektion mittels Doppelimmunfluoreszenz

Zur Entscheidung, welche RNA-Proben für die RNA-Sequenzierung jeweils zusammengefasst werden sollten, trug die Validierung der Infektionsqualität mittels Doppelimmunfluoreszenz bei. Die Wirtszellen aus jedem einzelnen Versuch wurden auf Expression der Zelltyp-spezifischen Proteine MyHC (C2C12-SkMZ), Aktin (NIH3T3-Fibroblasten), β -III-Tubulin (Neurone) und GFAP (Astrozyten) geprüft (Abbildung 3-17). Deren eindeutiger Nachweis deutete auf die erwartete Identität und die gute Qualität der einzelnen Wirtszelltypen hin. Durch Doppelimmunfluoreszenzmarkierung wurde darüber hinaus in allen Fällen intrazelluläre *T. gondii* eindeutig nachgewiesen. In den Astrozyten und Neuronen wurden die Cy5-gefärbten Parasiten in vielen Fällen von GFAP (Abbildung 3-17; A, E) bzw. β -III-Tubulin (Abbildung 3-17; B, F) umhüllt.

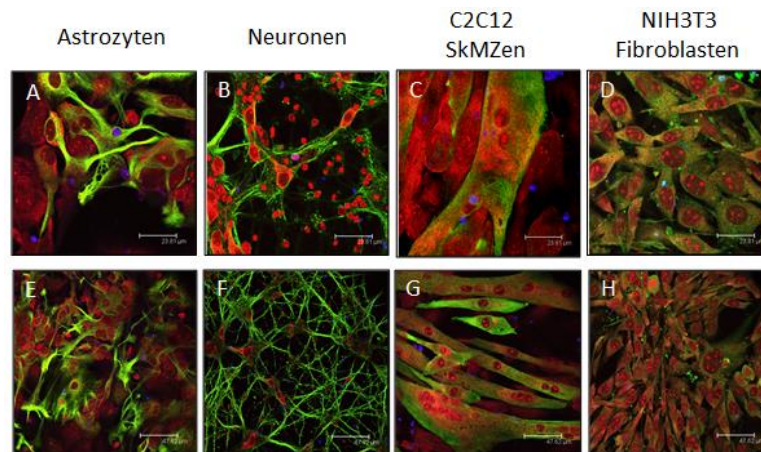


Abbildung 3-17: Qualitätssicherung der mit *Toxoplasma gondii*-infizierten Astrozyten, Neuronen, C2C12-Myotuben und NIH3T3-Fibroblasten mittels Doppelimmunfluoreszenz.

Nach Infektion der verschiedenen Wirtszelltypen mit *T. gondii* für 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und die Wirtszell-spezifischen Proteine GFAP (Astrozyten; A, E), β -III-Tubulin (Neurone; B, F), MyHC (C2C12-Myotuben; C, G) und Aktin (NIH3T3-Fibroblasten; D, H) mittels spezifischer Antikörper und Cy2-markierter Sekundärantikörper grün markiert. *T. gondii* wurde mittels spezifischem Antiserum und Cy5-gekoppelter Sekundärantikörper blau und die Zellkerne mit Propidiumiodid rot markiert. Die dargestellten repräsentativen Bilder stammen aus einem von sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Maßstab: 23,82 und 47,62 μ m.

3.4.1.3 Validierung der *T. gondii*-Infektionsstärke mittels RT-qPCR

Um die Infektionsstärke der C2C12-, NIH3T3-Zellen, Astrozyten und Neuronen mit *T. gondii* untereinander zu vergleichen, wurden die mRNA-Mengen von *T. gondii*- β -Aktin und Maus- β -Aktin in den infizierten Zellen mittels Reverse Transkription und quantitativer PCR gemessen. Die dabei eingesetzten Primer sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die erzielten ‚Crossing point‘-Werte von parasitärer und muriner Aktin-mRNA wurden ins Verhältnis gesetzt (Tabelle 16). Die Infektionsstärken sind insgesamt ähnlich, wobei die verhältnismäßig

größte Menge an *T. gondii*- β -Aktin mRNA in SkMZ, die niedrigste in Astrozyten gemessen wurde. Zur bildlichen Darstellung der relativen Infektionsraten wurden die Werte auch in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3-18).

Tabelle 16: Relative Infektionsraten von murinen C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Astrozyten und Neuronen mit *T. gondii*.

Es wurden die Transkriptmengen von *T. gondii*- β -Aktin und Maus- β -Aktin durch Reverse Transkription und qPCR mit spezifischen Primerpaaren bestimmt und anschließend die ‚Crossing points‘ von *T. gondii*- β -Aktin zu dem der jeweiligen Wirtszelle ins Verhältnis gesetzt.

	Astrozyten	Neuronen	C2C12	NIH3T3
$Cp_{[Toxoplasma\ Aktin]} / Cp_{[Wirtszellaktin]}$	1,471418964	1,27632509	1,14103382	1,39718935

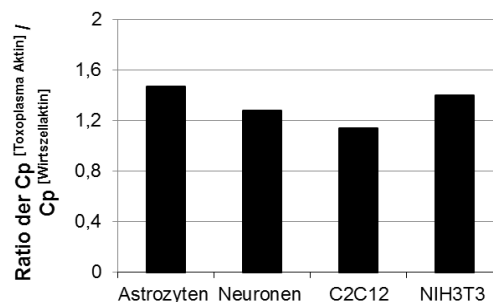


Abbildung 3-18: Graphische Darstellung der in Tabelle 16 aufgelisteten relativen Infektionsstärken für Astrozyten, Neuronen, SkMZ (C2C12) und Fibroblasten (NIH3T3) nach Infektion mit *T. gondii*.

3.4.2 Genomweite Transkriptomanalysen

Die High-Throughput RNA-Sequenzierung ermöglicht einen genauen Einblick in die aktive Genexpression von Wirts- und Parasitenzelle. Werden zelluläre bzw. parasitäre Transkripte aufgrund einer Infektion spezifisch hoch- bzw. runterreguliert, geben sie erste wertvolle Informationen über die Antwort einer Wirtszelle auf *Toxoplasma*-Invasion einerseits und die Anpassungsmechanismen des Parasiten andererseits, um in der Zelle zu überleben.

3.4.2.1 Read Mapping

Im Laufe der Transkriptomanalysen mittels Illumina-Sequenzierung wurden Millionen von 36 bp langen cDNA-Fragmenten (Reads) pro Probe sequenziert, die den Referenzgenomen von *Mus musculus* und *T. gondii* zugeordnet wurden. Die ‚gemappten‘ Reads bestanden aus denjenigen Fragmenten, die spezifisch innerhalb von Exonen von Maus- oder *Toxoplasma*-Genen banden und solchen, die keine Exonaffinität aufwiesen, jedoch in den Referenzgenomen vorkamen. Gleichzeitig wurden ‚Reads‘, die keinem der beiden Genome zugeordnet werden konnten, als „nicht gezählte Reads“ bezeichnet.

Die Gesamtmenge der 36 bp langen Fragmente pro Probe sind Tabelle 17 zu entnehmen. Die Mengen der gesamten ‚Reads‘ sind innerhalb einzelner Zelltypen vergleichbar und variieren

zwischen circa 29 Millionen in den nicht-infizierten SkMZ und 107 Millionen in den infizierten Neuronen. Insgesamt konnten dem Wirtsgenom (*Mus musculus*) je nach Probe zwischen 49,06 und 85,03% der Fragmente zugeordnet werden.

Die Anzahl an ‚Reads‘, die dem *Toxoplasma*-Referenzgenom des ME49-Stammes (Genotyp II) zugeordnet wurde, variierte in den infizierten Zelltypen und betrug zwischen 129,754 (NIH3T3) und circa 2 Millionen (Neuronen). Dem *Toxoplasma*-Genom konnten somit je nach Probe zwischen 0,37 und 2,05% der Fragmente zugeordnet werden. Die deutlich geringere Anzahl von Fragmenten, die auf das *Toxoplasma*-Genom ‚mappte‘ ist dabei auf die deutlich geringere RNA-Menge im Vergleich zur Wirtszell-RNA zurückzuführen. Des Weiteren wiesen die parasitären Transkripte in den infizierten Zellen unterschiedlichen Typs auf eine erfolgreiche Infektion hin.

Eine geringe Anzahl von 36 bp langen Nukleotidfragmenten, die auf das *Toxoplasma*-Genom ‚mappten‘, wurde auch innerhalb der nicht-infizierten Proben identifiziert (zwischen 60 in nicht-infizierten C2C12 und 3,850 in nicht-infizierten Fibroblasten). Der Grund hierfür ist aber nicht eine Kontamination der Proben, sondern vermutlich die Sequenzhomologien von einigen 36 bp-Sequenzen zwischen Maus- und *Toxoplasma*-Genom. Deren Anteil an den Gesamt-‚Reads‘ war jedoch mit höchstens 0.01% sehr gering. (Tabelle 17).

Tabelle 17: Anzahl der Reads, die durch High-Throughput RNA-Sequenzierung in *Toxoplasma*-infizierten bzw. nicht-infizierten C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten identifiziert wurden. Die gesamte Zahl von Reads schließt alle sequenzierten ‚Reads‘ pro Probe ein, die entweder den Exonen von Maus- oder *Toxoplasma*-Genom zugeordnet werden konnten (gemappte ‚Reads‘) oder aufgrund fehlender Homologien als nicht gezählte ‚Reads‘ aufgeführt wurden.

	C2C12		NIH3T3		Neuronen		Astrozyten	
	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>
Gesamte Zahl an Reads	32.928.565	29.070.147	37.403.318	35.352.668	94.193.783	107.842.244	50.126.239	47.375.351
Mit <i>Mus musculus</i>-Genome gemappten Reads	25.925.448 (78,73%)	21.976.713 (75,60%)	27.299.350 (72,99%)	24.138.852 (68,28%)	80.089.115 (85,03%)	89.414.813 (82,91%)	24.594.006 (49,06%)	31.520.886 (66,53%)
Mit <i>T. gondii</i>-Genome gemappten Reads	60 (0,00%)	195.857 (0,67%)	3.850 (0,01%)	129.745 (0,37%)	2.402 (0,00%)	2.214.545 (2,05%)	126 (0,00%)	225.430 (0,48%)
Nicht gezählte Reads	7.003.057 (21,27%)	6.897.577 (23,73%)	10.100.118 (27,00%)	11.084.071 (31,35%)	14.102.266 (14,97%)	16.212.886 (15,03%)	25.532.107 (50,94%)	15.629.035 (32,99%)

3.4.2.2 Bestimmung der Anzahl putativer muriner und parasitärer Transkripten

Aus den ‚gemappten‘ ‚Reads‘ jeder infizierten und nicht-infizierten Zelltyp-Probe wurde eine Liste der nachgewiesenen Transkripte erstellt und jedem Gen/Transkript ein RPKM-Wert zugewiesen. Der RPKM-Wert beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl ‚Reads‘, die innerhalb eines Transkriptes binden, zur Exonlänge dieses Transkriptes (in Kilobasen) und der Gesamtmenge an Genom-spezifischen Reads (in Millionen) (=Gesamtreads). Der RPKM-Wert wird daher als Maß für die Expressionsstärke angesehen.

Die Menge aller mit Hilfe der Illumina-Sequenzierung erfassten Maus-Gene von infizierten und nicht-infizierten Zelltypen, für die mindestens ein ‚Gesamtread‘ identifiziert wurde, sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Dabei wurden zwischen fast 16,000 unterschiedlichen Transkripten in *T. gondii*-infizierten NIH3T3 und etwa 19,500 Transkripten in infizierten Neuronen identifiziert. Die *T. gondii*-Infektion hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Anzahl der exprimierten Mausgene innerhalb der einzelnen Zelltypen.

Darüber hinaus wurden zahlreiche *Toxoplasma gondii*-Gene als exprimiert identifiziert. In der Tabelle 18 wurde die Menge solcher Parasitengene zusammengefasst, von denen in einer Probe mindestens 5 ‚Gesamtreads‘ sequenziert wurden und einen RPKM-Wert von mindestens 10 aufwiesen. Die Menge der *Toxoplasma*-Gene variierte zwischen 4,127 (infizierte Fibroblasten) und 5,630 (infizierte Neuronen) (Tabelle 18). Auch in nicht-infizierten Zellproben wurden wenige *Toxoplasma*-spezifische Gene ermittelt. Sie wurden von denjenigen ‚Reads‘ ‚gemappt‘, die in Tabelle 17 erwähnt wurden. Der größte Teil dieser als „falsch positiv exprimiert nachgewiesenen“ Gene wurde nur von einem Gesamtread erfasst.

Tabelle 18: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Anzahl der exprimierten *T. gondii*- und *Mus musculus*-Gene/ Transkripte in *T. gondii*-infizierten bzw. nicht-infizierten C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten.

	C2C12		NIH3T3		Neuronen		Astrozyten	
	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>	nicht infiziert	<i>T. gondii</i>
<i>T. gondii</i> -Gene	2	4.588	106	4.127	51	5.630	5	4.827
<i>Mus musculus</i> -Gene	16.901	16.736	16.170	15.963	19.467	19.498	18.619	18.910

3.4.2.3 Auswertung der murinen Transkripte vor *T. gondii*-Infektion

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Bioinformatik der Universität Göttingen (Alexander Kaefer, AG Burkhard Morgenstern) wurden alle Transkripte einem (moderaten) χ^2 -Signifikanztest unterzogen. Die statistisch signifikanten (familywise error rate (FWER) < 0,01 [Holm, 1979]) Transkripte der nicht-infizierten Zellproben wurden in Form einer Heat-Map mit Hilfe der MarVis-Software [Kaefer et al., 2012; 2009] dargestellt (Abbildung 3-19). Das Maß der relativen Expression der spezifischen Gene wurde innerhalb der Heat-Map anhand der pro Transkript normalisierten RPKM-Werte (Euklidische Norm) beschrieben. Die normalisierten RPKM-Werte liegen damit auf einer Skala zwischen 1 (dunkelrot, sehr hohe relative Expression) und 0 (dunkelblau, sehr niedrige relative Expression) (Abbildung 3-19, rechte Skala).

Die statistisch signifikanten Kandidatengene ergaben für jeden Zelltyp spezifische Cluster, die sich sehr deutlich in ihrer Expression in den vier unterschiedlichen Zelltypen unterschieden. Interessanterweise wurden nur drei Gencluster identifiziert, die sowohl bei

Skelettmuskelzellen als auch Neuronen gegenüber Astrozyten und Fibroblasten deutlich hoch- oder runterreguliert waren und eine annähernd gleiche Tendenz in der Expression aufwiesen (Abbildung 3-19). Während die Gene in Cluster 1 und 2 in den SkMZ und Neuronen eine vergleichsweise geringe Expression aufwiesen, wiesen die Gene des Clusters 3 eine erhöhte Expression auf.

Eine funktionelle Analyse dieser Gene wurde mittels des Bioinformatikprogramms DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) durchgeführt. Die DAVID-Datenbank ermöglicht eine Genklassifikation nach biologischen Funktionen, wobei ein Gen mehreren Funktionsgruppen zugeteilt werden kann. Ihre Beteiligung an einer Signaltransduktionskaskade kann hierbei ebenso nachgewiesen werden. Um die große Anzahl an Daten möglichst übersichtlich und verständlich darzustellen, wurden generell nur die biologischen Funktionen aufgelistet, von denen in den Transkriptomen mindestens 10 Gene identifiziert wurden.

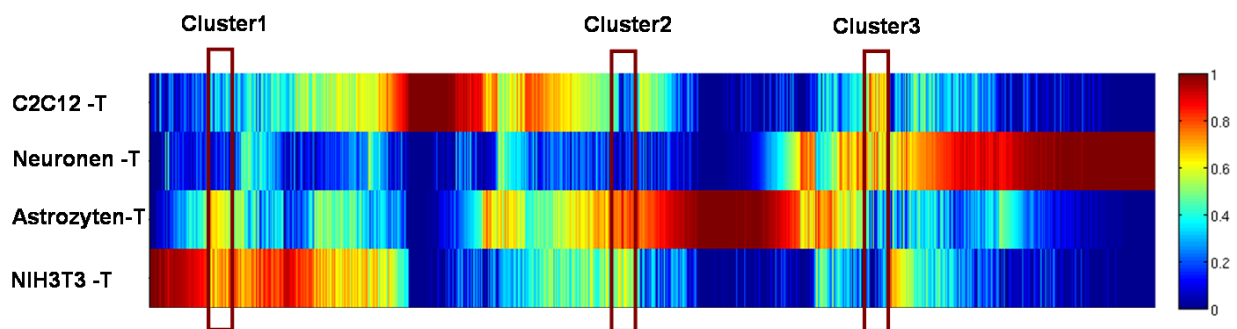


Abbildung 3-19: Darstellung der Transkriptome von nicht-infizierten C2C12-SkMZ, Neuronen, Astrozyten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Heat-Map.

Aufgrund eines (moderaten) χ^2 -Testes als statistisch signifikant identifizierte Transkripte (FWER < 0,01) wurden mittels der MarVis-Software graphisch als Heat-Map dargestellt. Die RPKM-Werte dieser Transkripte wurden entsprechend der Skala 0 bis 1 normalisiert. Der Wert 1 entspricht einem sehr hohen relativen RPKM-Werte pro Transkript, der Wert 0 einem sehr geringen Expressionswert.

Das in Abbildung 3-19 dargestellte Gencluster 1 umfasste insgesamt 370 Transkripte, die in SkMZ und Neuronen deutlich weniger exprimiert waren als in Astrozyten und Fibroblasten. Die größte Gruppe dieser Transkripte (31 Gene) war an Redoxreaktionen in Fibroblasten und Astrozyten beteiligt (Tabelle 19). Die zweitgrößte Gruppe (29) beinhaltete Gene von Zellzyklusregulatoren. Dabei waren speziell solche Regulatoren in Astrozyten und Fibroblasten, nicht aber in SkMZ und Neuronen stark exprimiert, die die Mitose- (M)-Phase, die darauf folgende Zytokinese und die Organellenteilung modulieren. So wurde beispielsweise das Gen für E2F1, einen Zellzyklusaktivator detektiert, der mit dem Tumorsuppressor-Retinoblastoma (Rb) einen Komplex bildet. Außerdem wurde das Gen für

das Retinoblastoma-like 1-Protein (p107) nachgewiesen, welches dem Rb ähnelt und womöglich eines seiner Isoformen darstellt. Ebenso waren Positivregulatoren von Mitose und Zytokinese wie Gas2l3, Cda2p, Dclre1a, Zw10 oder Dsn1 in Astrozyten und Fibroblasten deutlich stärker exprimiert als in SkMZ und Neuronen. Interessanterweise war aber auch der Mitose-Inhibitor Wee1 in Astrozyten und Fibroblasten stärker exprimiert als in Neuronen und SkMZ.

Wurden die Expressionslevel der Zellzyklusregulatoren von nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten näher untersucht, fielen die häufig deutlich kleineren RPKM-Werte von Zellzyklus-Aktivatoren in SkMZ und Neuronen im Vergleich zu Fibroblasten und Astrozyten auf (Tabelle 20). Beispielweise wurden Gene für die G2/M-Phase-spezifischen Cycline A2 (Ccna1), B1 (Ccnb1) und B2 (Ccnb2) in den Zellzyklus-arretierten C2C12-Myotuben und Neuronen nur wenig exprimiert. Des Weiteren war das Gen für das G1/S-Phase-fördernde CyclinD1 (Ccnd1) in den terminal differenzierten und nicht-proliferierenden SkMZ und Neuronen weniger stark exprimiert als in Astrozyten und Fibroblasten. Die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) wiederum wurden zelltyp-spezifisch und unabhängig von einem Zellzyklusarrest exprimiert (Tabelle 20).

Die Transkription von Mini-Chromosome Maintenance-Proteinen (*Mcm*) korrelierte ebenfalls mit dem Differenzierungs- und Zellzyklusstatus von SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten. Als Komponenten des Prä-Replikationskomplexes, der die DNA-Replikation unterstützt, wurden sie am stärksten in Astrozyten und Fibroblasten exprimiert (Tabelle 20). Unter den Zellzyklusinhibitoren wurde das Gen *p21* (*Cdkn1a*) am stärksten in C2C12-Myotuben detektiert. Dagegen wurde der *p27* (*Cdkn1b*)-Zellzyklusinhibitor in Neuronen am stärksten transkribiert.

Im Gencluster 1 (Abbildung 3-19) wurde auch eine signifikante Anzahl von Genen nachgewiesen, die an der Bildung von Stickstoffverbindungen (17 Gene) und dem RNA- bzw. DNA-Metabolismus (16 bzw. 22) beteiligt sind (Tabelle 22). Außerdem waren viele der Genprodukte im Cluster 1 am Monosaccharidmetabolismus (14) bzw. anderen metabolischen Prozessen beteiligt (Tabelle 19).

Das Gencluster 2 (Abbildung 3-19) schloss 240 Transkripte ein, die in Astrozyten und Fibroblasten ebenfalls stärker exprimiert waren als in Neuronen und SkMZ. Dazu gehörten vor allem Genprodukte, die Apoptose (14 Gene), Transmembrantransport (12 Gene) und makromolekulare Komplexbildungen (10 Gene) regulieren (Tabelle 19). Das Gencluster 2

enthielt außerdem den Zellzyklusinhibitor Cdkn3, welcher einerseits Cdk2 dephosphoryliert und andererseits mit Wee1 einen Komplex bildet.

Das Cluster 3 (Abbildung 3-19) beinhaltete 231 Transkripte, die in nicht-infizierten SkMZ und Neuronen deutlich stärker exprimiert waren als in Astrozyten und Fibroblasten. Unter ihnen waren bemerkenswerterweise 36 Gene an der Transkriptionregulation beteiligt (Tabelle 19). Darüber hinaus wurden überdurchschnittlich viele Transkripte detektiert, die an der Regulation von Proteolyse (21), intrazellulären Signalkaskaden (19) und Apoptose (13) beteiligt sind (Tabelle 19).

3.4.2.4 Zusammenfassung

Der Vergleich der Transkriptome aller nicht-infizierten Zelltypen wies auf die einzigartigen Transkriptionsprofile in den vier Zelltypen hin. Wurden die Transkriptome in Form einer Heat-Map miteinander verglichen (Abbildung 3-19), fielen besonders drei große Gencluster auf, die ähnliche Expressionstendenzen entweder innerhalb terminal differenzierter SkMZ und Neuronen oder proliferierender Fibroblasten und Astrozyten zeigten. Die aktive Proliferation der Astrozyten und Fibroblasten wurde durch die Anwesenheit vieler Transkripte, die metabolische und Zellzyklus-regulierenden Prozesse vermitteln, beschrieben (Tabelle 19). Dagegen zeigte die Mehrheit der Zellzyklusregulatoren eine reduzierte und somit differenzierungsabhängige Expressionsstärke in nicht-infizierten SkMZ und Neuronen (Tabelle 20).

Tabelle 19: Funktionelle Klassifizierung der Transkripte, welche die in SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten differentiell exprimierten Cluster 1, 2 und 3 bilden (siehe Abbildung 3-19). Die Clustergene wurden mittels der DAVID-Databse ausgewertet. Es wurden nur statistisch signifikante Gengruppen ($p < 0,05$) aufgelistet, die mindestens 10 Transkripte aufwiesen.

Cluster 1	Cluster 2
actin filament-based process	apoptosis
cell cycle (mitosis, nuclear division, chromosome organisation, M phase of mitotic cell cycle, organelle fission)	macromolecular complex assembly (incl. subunit organization)
cellular homeostasis	transmembrane transport
cellular response to stress (i.e. DNA damage stimulus)	
coenzyme metabolic process	
cofactor metabolic process	
cytoskeleton organization	
DNA metabolic process (incl. DNA repair)	
macromolecular complex subunit organization	
monosaccharide metabolic process	
mRNA metabolic process (incl. splicing, processing)	
nitrogen compound biosynthetic process	
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	
oxidation reduction	
	Cluster 3
	apoptosis
	intracellular signaling cascade
	modification-dependent macromolecule (protein)
	catabolic process
	proteolysis involved in cellular protein catabolic process
	regulation of transcription

Tabelle 20: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Expressionswerte verschiedener positiver und negativer Zellzyklusregulatoren in C2C12-SkMZ, NIH3T3-Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten vor Infektion mit *T. gondii*.

Transkripten ID	C2C12	NIH3T3	Neuronen	Astrozyten
Ccna1	0,00	0,00	0,23	3,82
Ccna2	4,09	40,40	8,63	15,02
Ccnb1	3,15	31,91	2,06	12,67
Ccnb2	4,56	11,72	2,05	19,55
Ccnd1	8,94	48,73	14,91	384,45
Ccnd2	4,35	20,48	61,85	159,16
Ccne1	2,17	13,95	3,65	4,28
Ccne2	0,72	2,02	1,00	1,42
Ccnf	2,07	16,58	2,78	7,23
Cdc20	5,58	92,54	3,79	19,61
Cdc25c	0,96	10,37	0,48	2,29
Cdca2	0,40	3,20	2,11	1,79
Cdca3	1,56	14,25	5,61	10,29
Cdca8	1,30	14,79	3,00	5,41
Cdk1 (Cdc2a)	4,93	43,21	1,40	14,53
Cdk2	18,97	9,21	1,81	11,65
Cdk3	0,04	0,09	-	0,08
Cdk4	41,28	109,09	24,83	42,60
Cdk6	3,98	1,88	0,76	3,67
Cdkn1a (p21)	702,00	80,36	29,44	154,70
Cdkn1b (p27)	9,02	9,72	19,37	15,14
Cdkn1c (p57)	1,51	0,00	2,45	7,69
Cdkn3	0,73	4,81	0,50	6,47
Mcm2	7,13	51,63	3,93	17,98
Mcm3	5,66	56,43	4,84	20,44
Mcm4	6,50	45,07	4,35	20,11
Mcm5	4,12	62,69	5,97	21,04
Mcm6	12,64	50,23	8,35	32,06
Mcm7	6,97	42,35	6,06	14,36

3.4.2.5 Transkriptome in unterschiedlichen Wirtszelltypen nach *T. gondii*-Infektion

Ein wichtiger Aspekt der Transkriptomanalysen war es, Zelltyp-spezifische Wirtsantworten nach Infektion mit *T. gondii* zu identifizieren.

Nicht-infizierte SkMZ, Neurone, Astrozyten und Fibroblasten wiesen sehr deutliche Unterschiede in den Transkriptomen untereinander auf (Abbildung 3-19). Auch nach Infektion mit *T. gondii* variierten die Genexpressionsprofile der infizierten Zellen stark untereinander. Eine Heat-Map-Analyse der Wirtszellantworten nach Infektion zeigte keine eindeutigen Gencluster, die in allen vier Zelltypen nach Infektion gleichermaßen reguliert waren (Abbildung 3-20). Zwar waren in SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten nach Infektion jeweils deutliche Änderungen der Transkriptome festzustellen, diese waren jedoch eindeutig zelltyp-spezifisch (Abbildung 3-20).

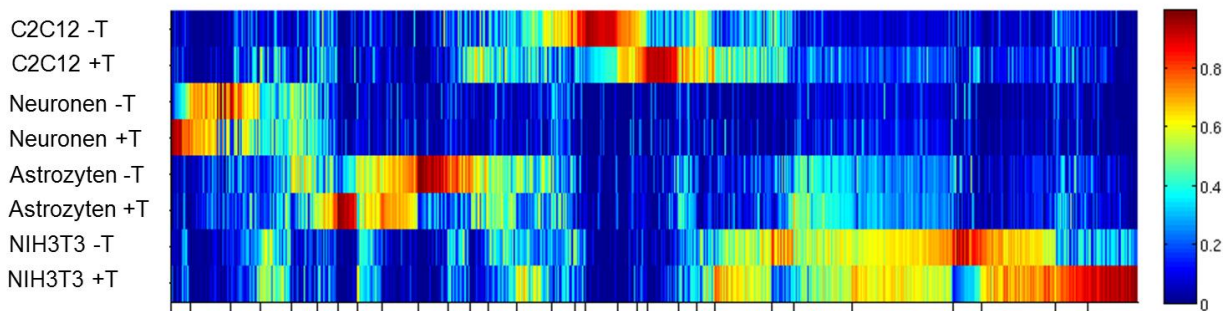


Abbildung 3-20: Heat-Map-Darstellung der Transkriptome von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten.

RNA infizierter und nicht-infizierter Wirtszellproben wurden durch High-Throughput-Sequenzierung charakterisiert, differentiell exprimierte Mause Gene identifiziert und die Expressionsstärken anhand des RPKM-Wertes ermittelt. Sie wurden mittels MarVis-Software geclustert und als Heat-Map mit einer relativen Skala von 0 bis 1 dargestellt. Der Wert 1 entspricht einem hohen relativen RPKM-Werte pro Transkript, der Wert 0 einem geringen Expressionswert.

Anhand einer hierarchischen Clusterung der Proben (log-transformierte RPKM-Werte, average-linkage-Verfahren, Distanz basierend auf linearer Korrelation) wurden anschließend Ähnlichkeiten in den globalen Transkriptionsprofilen der untersuchten Zelllinien sichtbar gemacht (Abbildung 3-21). Die Analyse bestätigte, dass sich die Transkriptome der *Toxoplasma*-infizierten und nicht-infizierten Probe eines Zelltyps jeweils ähnlicher waren als die unterschiedlichen Wirtszelltypen untereinander. Bemerkenswerterweise bildeten dabei Fibroblasten und Skelettmuskeln einerseits und Astrozyten und Neuronen andererseits jeweils eine Gruppe größerer Ähnlichkeit und zwar unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii*. Dies zeigte, dass die zelltyp-spezifische Genexpression einen deutlich größeren Einfluss auf das Gesamttranskriptom ausübte als eine Infektion mit *T. gondii*.

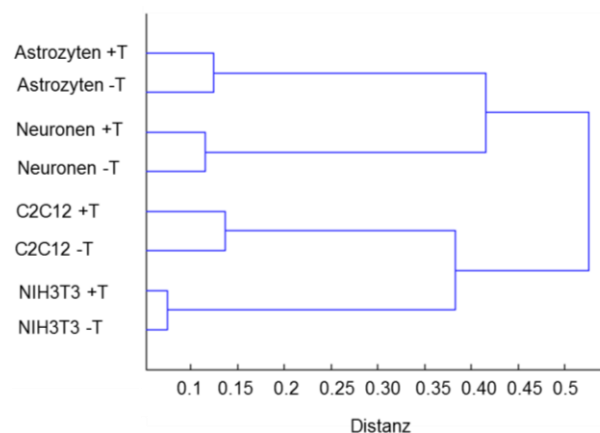


Abbildung 3-21: Darstellung der Ähnlichkeit der Transkriptome von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten mittels Dendrogramm. Die in der Abbildung 3-20 dargestellten Transkriptome wurden mittels MarVis-Software auf Ähnlichkeit untersucht und als Dendrogramm dargestellt. Je geringer die Distanz zwischen zwei Transkriptomen ist, desto ähnlicher sind sie.

3.4.2.5.1 Identifikation von differentiell exprimierten Genen nach *T. gondii*-Infektion

Ziel dieser Analysen war die Bestimmung der Veränderung der Genexpression nach Infektion. Dafür wurden die RPKM-Werte desselben Gens innerhalb eines Zelltyps vor und nach Infektion mit *T. gondii* ins Verhältnis gesetzt. Die Anzahl der statistisch signifikanten ($p < 0,05$) und mindestens 2-fach hoch- bzw. runterregulierten Gene pro Zelltyp sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Anzahl der durch *T. gondii*-Infektion mindestens zweifach hochregulierten Gene variierte zwischen 81 in Astrozyten und 338 in C2C12-Myotuben. Dagegen waren mit 33 (Neuronen) bis 116 (Astrozyten) vergleichsweise deutlich weniger Gene nach Parasiteninfektion mindestens 2-fach herunterreguliert.

Tabelle 21: Anzahl der Transkripte in C2C12-SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten, die aufgrund einer *Toxoplasma*-Infektion mindestens 2-fach hoch- bzw. runterreguliert wurden.

Transkriptome von infizierten und nicht-infizierten Zellen wurden durch High-Throughput-Analyse charakterisiert. Die Regulationsprofile basierten auf der Ratio von RPKM-Werten eines Gens (infiziert zu nicht-infiziert).

	C2C12	NIH3T3	Neuronen	Astrozyten
Hochreguliert	338	125	109	81
Runterreguliert	93	90	33	116

3.4.2.5.2 Verifizierung der RNA-Sequenzierungsergebnisse mittels qRT-PCR

Um die Validität der Transkriptomanalysen mittels High-Throughput-Sequenzierung zu bestimmen, wurden 14 verschiedene Gene ausgesucht, deren Expression laut High-Throughput RNA-Sequenzierung nach Infektion als verstärkt, vermindert oder unverändert exprimiert identifiziert worden waren (Tabelle 22). Anschließend wurden ihre Expressionsprofile mittels RT-qPCR in allen vier Zelltypen bestimmt und den RPKM-Werten der High-Throughput-Sequenzierung gegenübergestellt (Tabelle 22, Abbildung 3-22). Die Daten zeigen, dass Gene, die nach High-Throughput RNA-Sequenzierung als deutlich hoch- oder runterreguliert identifiziert wurden, dieses Ergebnis auch nach RT-qPCR zeigten. Eine Regressionsanalyse ergab einen Determinationskoeffizienten von 0,7299 und einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,854$. Damit konnte eine gute Übereinstimmung zwischen RNA-Sequenzierung und RT-qPCR nachgewiesen werden.

Tabelle 22: Verifizierung der durch RNA-Sequenzierung identifizierten Expressionsprofile von 14 ausgesuchten Genen in SkMZ, Fibroblasten, Neuronen und Astrozyten nach *Toxoplasma*-Infektion mittels RT-qPCR.

Transkripten ID	C2C12		NIH3T3		Neuronen		Astrozyten	
	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq
S100a4	1,0035	1,0298	1,1170	0,9804	14,2455	13,2916	0,9429	0,8861
Egr2	5,4300	7,7918	1,8499	1,1699	0,9380	1,0400	1,2835	1,2945
Cxcl10	9,1194	0,0000	2,4357	0,2827	6,6208	8,2853	3,2419	2,9974
Dpm1	0,9341	0,8600	0,9435	1,1407	0,8795	1,1162	1,2506	0,3596
Fosb	29,3215	18,0582	0,7975	1,0326	0,8105	2,5565	1,5170	1,4981
Ptgs2	6,1955	7,5608	1,1413	0,8150	1,9500	1,2036	1,4270	1,4276
Slc44a4	0,2717	0,4691	0,0000	0,0000	0,0000	0,5374	0,0000	0,0000
Ttpal	0,9924	2,7592	0,9325	6,4994	0,8495	1,1188	2,9045	1,5605
Serinc4	0,9798	2,4160	0,5160	0,2827	0,5979	1,8300	1,1227	0,5480
Palm2	0,7565	0,9527	1,1465	0,4462	0,8445	0,9859	5,4665	1,2342
Nr4a1	4,5505	6,0031	0,7629	1,0587	0,8980	1,1923	1,3895	1,2397
Ubp1	0,7800	1,0000	0,9061	0,4707	0,7401	1,0723	2,3860	0,8640
Cyr61	2,2475	2,9540	1,0235	1,1390	1,1885	1,0925	1,0035	0,9390
Smyd1	0,7768	0,8479	0,5390	3,3927	0,3265	1,3550	0,7715	0,8970

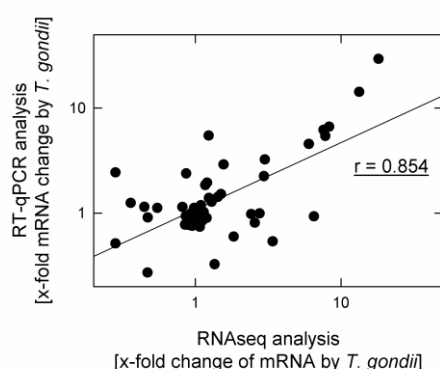


Abbildung 3-22: Korrelation der Expressionsprofile von 14 ausgesuchten Wirtszellgenen nach Infektion unterschiedlicher Zelltypen mit *T. gondii*.

Die in Tabelle 22 dargestellten Ergebnisse der Regulation von Wirtszellgenen nach *T. gondii*-Infektion, die durch High-Throughput RNA-Sequenzierung und RT-qPCR bestimmt wurden, wurden grafisch dargestellt und eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient r zwischen beiden Datensätzen ist angegeben.

3.4.2.5.3 Bioinformatische Analysen der durch *T. gondii*-Infektion regulierten *Mus musculus*-Transkripte

Die nach Infektion von SkMZ, Neuronen, Astrozyten oder Fibroblasten mindestens 2-fach hoch- und runterregulierten Wirtszelltranskripte wurden mit Hilfe des Bioinformatikprogrammes DAVID ausführlich analysiert. Das DAVID-Internetportal ermöglicht es, Gene, Transkripte oder Proteine nach biologischen und molekularen Funktionen sowie der zellulären Lokalisation zu gruppieren. Das Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es daher, alle nach Infektion als differentiell exprimiert erkannten Transkripte (Tabelle 21) hinsichtlich ihrer biologischer Funktionen zu gruppieren, einzeln zu identifizieren und nach Möglichkeit in zelluläre Signalwege einzubauen.

Tabelle 23 stellt eine Zusammenfassung der Gengruppen dar, die mittels DAVID-Auswertung nach ihren biologischen Funktionen klassifiziert und in mindestens zwei Zelltypen ermittelt wurden. Ausschließlich statistisch signifikante ($p < 0,05$) Gencluster dienten als Basis für

weitere Analysen. Dabei ist zu beachten, dass biologische Funktionen, die laut DAVID-Clusteranalyse in mehreren Zelltypen als signifikant reguliert erkannt wurden, unterschiedliche Gene enthielten konnten.

Interessanterweise waren in NIH3T3-Fibroblasten und Astrozyten nach Infektion translationsassoziierte Transkripte besonders häufig hoch- und runterreguliert (Tabelle 23), während diese Gruppe von Transkripten in Neuronen nach Infektion vor allem runterreguliert war. In SkMZ war diese Gengruppe nicht signifikant reguliert.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Gencluster, die in mindestens zwei Wirtszelltypen nach *Toxoplasma*-Infektion differentiell reguliert waren.

Die Gencluster beinhalteten Transkripte, die nach Infektion in wenigstens zwei Wirtszelltypen mindestens zweifach hoch- bzw. runterreguliert waren. Die funktionellen Analysen wurden mit Hilfe der DAVID-Analysesoftware durchgeführt.

Genecluster	C2C12		NIH3T3		Neuronen		Astrozyten	
	hochreguliert	runterreguliert	hochreguliert	runterreguliert	hochreguliert	runterreguliert	hochreguliert	runterreguliert
cell cycle regulation	+				+			
immune response	+				+			
translation			+	+		+	+	+
chromosome organization (DNA packaging/ DNA-protein complex)	+	+	+					
nucleosome/chromatin assembly	+	+	+			+		
actin filament-based process				+	+			

Die *Toxoplasma*-Infektion führte in SkMZ und Fibroblasten auch zu spezifischen Veränderungen in den Transkriptmengen, die die Chromosomen- bzw. Nukleosomenstruktur regulieren (Tabelle 23). Dabei waren Transkripte dieser Gruppe in NIH3T3 vor allem hochreguliert, während sie in SkMZ nach Infektion teilweise hoch- und teilweise runterreguliert waren. In Neuronen waren die für Nukleosomen- und Chromatinorganisation zuständigen Gene nach Infektion vor allem inhibiert.

Bemerkenswerterweise wurden mehr Transkripte, die als Zellzyklus- und Immunregulatoren fungieren, in SkMZ und Neuronen nach *Toxoplasma*-Entwicklung signifikant hochreguliert, als in Fibroblasten und Astrozyten (Tabelle 23).

So wurden 88 Transkripte ($p = 5 \times 10^{-56}$) in SkMZ nach Infektion mindestens 2-fach hochreguliert, die unterschiedliche Phasen des Zellzyklus steuern, wobei 57 (64,7%; $p = 1,3 \times 10^{-47}$) dieser Gene direkt bzw. indirekt die Mitose-Phase regulieren. Darüber hinaus wurden besonders Genprodukte, die die S-Phase (DNA-Replikation) betreffen, nach Infektion von SkMZ hochreguliert. Welche Gene im Speziellen innerhalb dieser Gruppe vorzufinden waren, wird in Tabelle 24 dargestellt.

Zellzyklusregulatoren der S-Phase

Zu den S-Phaseregulatoren, die nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* verstärkt exprimiert wurden, gehörten Komponenten des Prä-Replikationskomplexes wie die stark konservierten Mini-Chromosome Maintenance-Proteine (Mcm) 2, 3, 5-7 und 10 (*T. gondii*-induzierte Hochregulation = 2,4- bis 3,75-fach), die zusammen mit CyclinE2 (Ccne2; 2,8-fach) die Genomreplikation initiierten (Tabelle 25; gelbe Markierung). Die Mcm4- und Mcm8-spezifischen Transkripte wiesen nur eine 1,88- bzw. 1,96-fache Erhöhung nach Infektion auf und wurden somit nicht in die Analysen miteinbezogen.

Zu den durch *T. gondii*-Infektion in SkMZ regulierten Komponenten des Prä-Replikationskomplexes gehörten auch Cdt1 (2,23-fach), Cdc6 (2,24-fach) und Orc11 (5,6-fach). Der Prä-Replikationskomplex wird durch das ebenfalls nach Infektion hochregulierte Cdc28 (= Cks2) phosphoryliert (Tabelle 24).

Die Initiation der DNA-Replikation wird darüber hinaus durch den Cdc7/Dbf4-Komplex vorangetrieben, dessen Komponenten nach Infektion ebenfalls verstärkt exprimiert wurden (2,14-fach bzw. 1,93-fach) (Tabelle 24).

Des Weiteren waren auch DNA-Replikation-modulierende Faktoren (beispielsweise p60, p150 und Bloom Syndrome Homolog-Gen) nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* signifikant hochreguliert ($p = 0,0023$; Tabelle 25). Das traf auch für zwei Inhibitoren der DNA-Replikation zu ($p = 1,2 \times 10^{-12}$; Tabelle 25; rot markiert). Beispielsweise wurde Claspin, welches in enger Verbindung zum Checkpoint Protein 1 (Chk1) steht, nach der Infektion hochreguliert (2,51-fach). Die durch *T. gondii* induzierten Transkripte Chk1 (3,2-fach) und Chk2 (= Chk2; 2,05-fach) sowie das inaktivierte Cdc25c (2,31) blockierten dabei die Cyclin-abhängige Kinase Cdc2a (=Cdk1) (2,6) (Tabelle 24). Demzufolge wurde die Zellzyklustransition in der M-Phase unterbunden (Tabelle 24).

Unter den S/G2-Phase-regulierenden Proteinen wurden nach Infektion neben Claspin weitere Transkripte hochreguliert, wie beispielsweise CyclinA2 (Ccna2; 2,8-fach) (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zellzyklusregulatoren, deren Expression nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen mindestens zweifach hochreguliert waren. Das Gencluster und die darin enthaltenen, durch *T. gondii* regulierten Gene wurde durch DAVID-Analyse identifiziert. Die gelb unterlegten Transkripte regulierten die M-Phase, rot markierte Gene regulieren die Zellkern- und Organellenteilung. Die Zytokineseregulatoren sind mit Sternchen markiert. Die x-fache Erhöhung der Gentranskriptionen mancher Zellzyklusregulatoren nach *T. gondii*-Infektion wurden im Text angegeben.

Cell-cycle regulators (M-Phase, nuclear division, organelle fission)	
RIKEN cDNA 4632434I11 gene	RIKEN cDNA F630043A04 gene
anillin, actin binding protein *	family with sequence similarity 83, member D
asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	Fanconi anemia, complementation group D2
aurora kinase A	Fanconi anemia, complementation group I
aurora kinase B *	F-box protein 5
baculoviral IAP repeat-containing 5 *	similar to growth arrest-specific 2 like 3; growth arrest-specific 2 like 3
breast cancer 1	H2A histone family, member X
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	helicase, lymphoid specific
budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	inner centromere protein *
expressed sequence C79407	kinesin family member 11
coiled-coil domain containing 99	similar to Kifc1 protein; kinesin family member C1
cyclin A2	kinetochore associated 1
cyclin B1	minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (S. cerevisiae)
cyclin B2	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)
cyclin E2	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)
cyclin F	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)
cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
Cyclin dependent kinase 1 (Cdk1)	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae); predicted gene 3833; similar to Meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)
cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae); predicted gene 9430; similar to cell division cycle 6 homolog	myelocytomatosis oncogene
cell division cycle 7 (S. cerevisiae)	non-SMC condensin I complex, subunit H
cell division cycle associated 2	NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)
cell division cycle associated 3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
cell division cycle associated 8	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	similar to Nuf2 protein; NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
chromatin licensing and DNA replication factor 1	nucleolar and spindle associated protein 1 *
centromere protein E	origin recognition complex, subunit 1-like (S. cerevisiae)
centromere protein F	pelota homolog (Drosophila)
centromere protein H	polo-like kinase 1 (Drosophila)
centrosomal protein 55	proline/serine-rich coiled-coil 1
chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	pituitary tumor-transforming gene 1
chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	shugoshin-like 1 (S. pombe)
CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	shugoshin-like 2 (S. pombe)
cytoskeleton associated protein 2	RIKEN cDNA 2810433K01 gene
CDC28 protein kinase 1b	stathmin 1
similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2); CDC28 protein kinase regulatory subunit 2; predicted gene 15452	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
claspin homolog (Xenopus laevis)	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)
discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	thyroid hormone receptor interactor 13
E2F transcription factor 7	protein kinase
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like	ubiquitin-conjugating enzyme E2C; predicted gene 8956
establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1; predicted gene 5648; similar to nuclear zinc finger protein Np95
extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)	Zwlich, kinetochore associated, homolog (Drosophila)
exonuclease 1	S100 calcium binding protein A5

Tabelle 25: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die an der DNA-Replikation und der Replikationsinitiation beteiligt sind und nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* mindestens zweifach hochreguliert waren.

Die gelb unterlegten Transkripte stellen Replikationsinitiatoren dar. Die rot unterlegten Gene kodieren für Replikationsinhibitoren.

Regulation der DNA-Replikation (incl. Initiation)

Bloom syndrome homolog (human)
 DNA replication helicase 2 homolog (yeast)
 GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)
 RAD51 homolog (S. cerevisiae)
 breast cancer 1
 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae); predicted gene 9430;
 similar to cell division cycle 6 homolog
 chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
 chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
 chromatin licensing and DNA replication factor 1
 connective tissue growth factor
 cyclin E2
 denticleless homolog (Drosophila)
 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)
 minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (S. cerevisiae)
 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)
 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46
 (S. cerevisiae)
 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S.
 pombe) (S. cerevisiae)
 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)
 origin recognition complex, subunit 1-like (S. cerevisiae)
 predicted gene 6091; thymidine kinase 1
 inhibitor of DNA binding 3
 claspin homolog (Xenopus laevis)

Zellzyklusregulatoren der Mitose-Phase

Die entsprechend der funktionellen Klassifizierung ermittelten M-Phase-Regulatoren, die nach *Toxoplasma*-Infektion in SkMZ hochreguliert waren, sind in Tabelle 24 gelb markiert. Manche der in Tabelle 24 aufgeführten Zellzyklusregulatoren, wurden der DAVID-Analyse zufolge, nicht dem M-Phase-Gencluster zugeteilt, obwohl sie laut NCBI (National Center for Biotechnology Information) und MGI (Mausgenom-Databse) an der Regulation der Mitose-Phase beteiligt sind. Dies betraf z.B. durch *Toxoplasma* hochregulierte Gene wie *Aurka* (2,4-fach), *Pelo* (4,41-fach), *Psrl1* (2,1-fach) und *Cdk1* (2,6-fach).

Desgleichen wurden wenige Gene, deren Produkte an der Kernteilung beteiligt sind (Tabelle 24; rote Schrift), entsprechend der DAVID-Analysen nicht dem M-Phase-Gencluster zugeordnet, obwohl die Kernteilung einen essentiellen Teil der Mitose-Phase darstellt.

Der Mitoseeintritt wird durch den „Mitose-promoting factor“ (MPF) eingeleitet. Komponenten dieses Komplexes wie CyclinB1 (Ccnb1; 2,75-fach), CyclinB2 (Ccnb2; 2,73-fach) und Cdk1 waren nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* hochreguliert. Andere wichtige M-Phase-regulierende Kinasen wurden ebenfalls nach Infektion verstärkt exprimiert. Dazu

zählen neben den bereits erwähnten Kinasen wie Cdk1 und Aurora A (Aurka), Aurora B (Aurkb; 3,14-fach), Plk1 (2,9-fach) und BubR1 (=Bub1b; 2,98-fach).

Der größte Teil der nach Infektion von SkMZ hochregulierten M-Phase-spezifischen Transkripte war jedoch an der Kinetochorganization, dem Spindel-Checkpoint und damit an der Kernteilung beteiligt. Dazu zählten u. a. die Mitose fördernde Centromerproteine E, F, H, Cdc20, Ndc80, Nuf2 und Nek2 sowie Ccdc99. Außerdem wurden fünf Gene als differentiell exprimiert erkannt, die die Zytokinese ($p = 6.6 \times 10^{-4}$) regulieren (Tabelle 24; mit Sternchen markiert).

Nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* waren laut DAVID-Datenanalyse keine negative Regulatoren der Wirtszellproliferation hochreguliert. Dagegen wurden durch Analyse mit alternativen Datenbanken (MGI) durchaus Inhibitoren der Zellproliferation wie Breast cancer 1 (Brca1), der Cyclin-abhängige Kinaseninhibitor 3 (Cdkn3) und der E2F-Transkriptionsfaktor 7 (E2F7) erkannt. Dagegen wurden mittels DAVID-Datenanalyse Gencluster nachgewiesen, die wenige positive Zellproliferationsregulatoren ($p = 0.016$) bzw. positive Zellzyklusregulatoren ($p = 0.00163$) umfassten und nach *T. gondii*-Infektion von SkMZ hochreguliert waren (Tabelle 26).

Zellzyklus-regulierende Gene wurden auch in Neuronen nach Infektion mit *T. gondii* signifikant stärker exprimiert als in nicht-infizierten Neuronen (Tabelle 26; $p = 0.019$). Dieser Gencluster war jedoch deutlich kleiner als im Falle der Skelettmuskelzellen und umfasste neun Transkripte (Tabelle 27). Fünf von ihnen waren auch in infizierten C2C12-Zellen stärker exprimiert als in nicht-infizierten Kontrollen. Dagegen waren die Gene Annexin A1, Geminin, S100A6 und High-mobility group AT-hook 2 (HMGA2) in infizierten Myotuben offensichtlich nicht differentiell exprimiert.

Zusätzlich zu den oben dargestellten Gemeinsamkeiten in der Regulation von Zellzyklusproteinen zwischen SkMZ und Neuronen nach *Toxoplasma*-Infektion wiesen viele der in SkMZ geclusterten Zellzyklusregulatoren (besonders M-Phase-Regulatoren) in infizierten Neuronen eine geringe, aber dennoch signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen auf. Da die meisten diese Transkripte nach Infektion aber lediglich zwischen 1,3-fach und 1,99-fach hochreguliert waren, erfüllten sie nicht die hier angegebenen Kriterien für die weiterführenden funktionellen Klassifizierungen.

Tabelle 26: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die Zellproliferation sowie den Zellzyklus positiv regulieren und nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* mindestens zweifach hochreguliert waren.

Regulation of cell proliferation
Bloom syndrome homolog (human)
E2F transcription factor 7
RecQ protein-like 4
adenosine A2a receptor
cell division cycle associated 7
cell division cycle associated 7 like
centromere protein F
chemokine (C-C motif) ligand 2
endothelin 1
forkhead box M1; RIKEN cDNA 4933413G19 gene
interleukin 6
leukocyte specific transcript 1
myelocytomatosis oncogene
nucleoporin 62
prostaglandin-endoperoxide synthase 2
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1

Positive regulation of cell cycle
baculoviral IAP repeat-containing 5
centromere protein E
centromere protein F
leukocyte specific transcript 1
nucleolar and spindle associated protein 1

Tabelle 27: Mittels DAVID-Funktionsanalyse ermittelte Gene, die Zellproliferation regulieren und nach Infektion von Neuronen mit *T. gondii* mindestens zweifach hochreguliert waren.

Cell cycle
S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
annexin A1
cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
chromatin licensing and DNA replication factor 1
cyclin E2
cyclin-dependent kinase inhibitor 3
geminin
predicted gene 7996; high mobility group AT-hook 2

Immunregulatoren

Gemeinsam war SkMZ und Neuronen auch die Hochregulation einer signifikanten Anzahl von Immunregulatoren nach Infektion mit *T. gondii* ($p = 0,026$ für SkMZ bzw. $p = 0,015$ für Neurone) (Tabelle 28). Dabei wurden Gene wie CD74, CXCL1, CXCL2 oder Proteasome Subunit Beta Type 8 (PSMB8) in beiden Zelltypen gleichermaßen nach Infektion hochreguliert während andere Transkripte Zelltyp-spezifisch hochreguliert waren.

Tabelle 28: Immunregulatoren, die in *Toxoplasma*-infizierten C2C12-Myotuben (links) und Neuronen (rechts) mindestens zweifach nach Infektion hochreguliert waren und durch DAVID Cluster-Analyse identifiziert wurden.

Immune response
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
chemokine (C-C motif) ligand 2
chemokine (C-C motif) ligand 9
chemokine (C-X-C motif) ligand 1
chemokine (C-X-C motif) ligand 9
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
exonuclease 1
interleukin 6
leukocyte specific transcript 1
oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
ring finger protein 125
single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
uracil DNA glycosylase

Immune response
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
chemokine (C-C motif) ligand 2
chemokine (C-X-C motif) ligand 1
chemokine (C-X-C motif) ligand 10; similar to Small inducible cytokine B10 precursor (CXCL10) (Interferon-gamma-induced protein CRG-2) (Gamma-IP10) (IP-10) (C7)
guanylate binding protein 3
guanylate binding protein 5
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)

3.4.2.5.4 Zusammenfassung

Ziel der High-Throughput RNA-Sequenzierung war u. a., die Wirkung von *T. gondii* auf die Gentranskription von SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten in der frühen Infektionsphase (24 Stunden) zu untersuchen. Alle hoch- bzw. runterregulierten Transkripte wurden entsprechend ihrer biologischen Funktionen mit Hilfe der DAVID-Analysesoftware geclustert. Es konnte gezeigt werden, dass eine *Toxoplasma*-Infektion eine signifikante Expressionsteigerung von Zellzyklus- und Immunregulatoren innerhalb terminal differenzierter SkMZ und Neuronen vermittelte (Tabelle 23). Im Vergleich zu Neuronen (9 Transkripte; Tabelle 27) wurden in infizierten C2C12-Myotuben circa 90 Zellzyklusregulatoren identifiziert, derer Mehrheit (circa 65%) die Mitose-Phase moduliert (Tabelle 24). In beiden infizierten Zelltypen waren auch wenige Immunfaktoren ähnlich reguliert (Tabelle 28).

3.4.2.5.5 Bioinformatische Analysen der *T. gondii*-Transkriptome

Bisherige Daten wiesen auf eine stärkere Tachyzoiten-Bradyzoiten-Konversion in terminal differenzierten SkMZ im Vergleich zu anderen Zelltypen hin (Abschnitt 3.2.1). Es wurde daher zunächst geprüft, ob dieses Ergebnis durch die Transkriptomanalysen mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung bestätigt wurde (Tabelle 29). Dazu wurden die Expressionswerte von Bradyzoiten-spezifischen Genen wie Bradyzoiten Antigen 1 (*BAG1*), Enolase 1 (*ENO1*) und Lactat-Dehydrogenase 2 (*LDH2*) als Marker für die Parasitendifferenzierung verwendet. Anschließend wurden diese Transkripte ‚Housekeeping‘-Genen wie Aktin, Tubulin und Glycerinaldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase 1 (*GAPDH1*) zur Bestimmung des relativen Expressionsprofils gegenübergestellt. Abbildung 3-23 können die berechneten Ratios entnommen werden. Die Daten zeigten, dass das Verhältnis von *BAG1* zu Aktin (schwarz) und Tubulin (grau) in Neuronen am höchsten und in C2C12-Myotuben am zweithöchsten war. In Astrozyten war die relative *BAG1*-Expression dagegen etwa zweifach niedriger als in SkMZ und in infizierten Fibroblasten war das *BAG1*-Transkript nicht nachweisbar (Abbildung 3-23). Eine ähnliche Tendenz wurde für die Expression von *BAG1* im Verhältnis zu *GAPDH1* (grün) festgestellt. Vergleichbare Ratios *BAG1* zu *GAPDH1* wurden in Neuronen (0,085) und C2C12-Zellen (0,089) berechnet, die damit deutlich größer waren als in Astrozyten oder Fibroblasten. Somit konnte eine Korrelation zwischen Zellzyklus-arretierten SkMZ bzw. Neuronen und erhöhter Expression der bradyzoitenspezifischen Gene gezeigt werden.

Tabelle 29: Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelte Expressionswerte (RPKM) der Bradyzoiten-spezifischen Gene *BAG1*, *ENO1*, *LDH2* sowie der ‚Housekeeping-Gene‘ Aktin, Tubulin und *GAPDH1* von *Toxoplasma gondii*.

Bradyzoiten-spezifische Gene			
NCBI_ID	BAG1	ENO1	LDH2
	TGME49_059020	TGME49_068860	TGME49_091040
Astrozyten	3,422813904	0	8,255521375
Neuronen	13,93703787	0,228291217	18,48818969
C2C12	7,879268428	0	7,918371497
Fibroblasten	0	0	7,171922554

Housekeeping-Gene			
NCBI_ID	Aktin	Tubulin	GAPDH1
	TGME49_009030	TGME49_066960	TGME49_089690
Astrozyten	1269,046491	414,4033208	967,0978412
Neuronen	1050,161172	323,8475442	1638,397925
C2C12	1298,076087	509,7570491	879,5493866
Fibroblasten	1436,977748	467,6415839	881,4783251

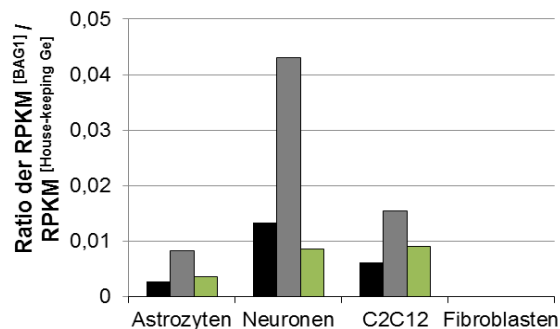


Abbildung 3-23: Relative Expression von Bradyzoiten-spezifischer BAG1-mRNA in *T. gondii*-infizierten Astrozyten, Neuronen, C2C12-SkMZ und Fibroblasten.

Einen Tag nach Infektion der unterschiedlichen Zelltypen mit *T. gondii* wurde Gesamt-RNA isoliert und Transkriptome mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung charakterisiert. Die Expressionslevel einzelner Gene wurde durch Bestimmung der RPKM-Werte ermittelt. Dargestellt ist die relative Expression von BAG1 im Verhältnis zu Aktin (schwarz), Tubulin- (grau) und GAPDH1 (grün) von *Toxoplasma gondii* in Astrozyten, Neuronen, C2C12- und NIH3T3-Zellen.

Neben dem Nachweis Bradyzoiten-spezifischer Transkripte in den Transkriptomen *T. gondii*-infizierter SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten, wurden Parasitengene mit mindestens 5 Gesamtreads und RPKM-Werten von mindestens 10 (siehe Tabelle 18) mit Hilfe der DAVID-Analysesoftware nach biologischen Funktionen analysiert und gruppiert. Gengruppen, die in den unterschiedlichen Transkriptomen signifikant angereichert waren ($p < 0,05$) sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Dabei waren die *Toxoplasma*-Gencluster, die ausschließlich in infizierten C2C12-Myotuben und Neuronen angereichert waren bzw. fehlten, von besonderem Interesse, da sie auf spezifische Parasitenreaktionen nach Infektion von Persistenz-fördernden Zelltypen hindeuteten.

Tabelle 30: Funktionelle Gruppen von *Toxoplasma gondii*-spezifischen Transkripten, die in SkMZ, Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten 24 Stunden nach Infektion mittels genomweiter RNA-Sequenzierung detektiert und nach DAVID-Analyse in den Transkriptomen als signifikant angereichert identifiziert wurden ($p < 0,05$). Gelb unterlegt ist eine Gruppe von *Toxoplasma*-Genen, die ausschließlich in den Transkriptomen infizierter SkMZ und Neuronen angereichert war.

Genes / Transcripts (No.)	C2C12 Neuronen NIH3T3 Astrozyten			
	4.588	5.630	4.127	4.827
ATP metabolic (incl. biosynthesis) process	+		+	
ATP synthesis coupled proton transport	+		+	
cation transport	+		+	
cellular homeostasis		+		+
cellular macromolecule (protein) catabolic process	+	+	+	
cellular macromolecule (protein) localization		+	+	+
energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	+		+	
establishment of protein localization	+	+		+
generation of precursor metabolites and energy	+		+	+
homeostatic process		+		+
hydrogen transport	+		+	+
intracellular protein transport		+	+	+
intracellular transport		+		+
macromolecule (protein) catabolic process	+	+	+	+
monovalent inorganic cation transport	+		+	+
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	+	+		
oxidative phosphorylation	+		+	+
protein folding	+	+	+	+
protein localization	+	+		+
protein transport	+	+	+	+
proteolysis involved in cellular protein catabolic process	+	+	+	
proton transport	+			+
Ribosome	+	+	+	+

Tatsächlich wurde durch Clusteranalyse eine große *Toxoplasma*-Gengruppe (59 Gene) identifiziert, die nur in infizierten SkMZ und Neuronen signifikant angereichert war (Tabelle 30; gelbe Markierung). Sie schloss Transkripte ein, welche die Bildung von Nucleosiden, Nucleotiden und Nucleinsäuren vermittelten. Die einzelnen Gene dieses Clusters wurden anschließend mithilfe der *Toxoplasma*-Datenbank (<http://toxodb.org>) analysiert (Tabelle 31). Sie umfassten Gene, die für zahlreiche Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase sowie viele Lyasen (Adenylatcyclasen, Adenylatsuccinasen) kodierten. Außerdem wurden in dieser Gruppe Gene identifiziert, die für mehrere Untereinheiten von ATP-asen des V- und P-Typs kodieren. Außerdem wurden einige wenige Enzyme identifiziert, die indirekt am Prozess der DNA-Synthese beteiligt sind (z.B. IMP-Dehydrogenase, Thymidylat-Kinase).

Interessanterweise wurden keine statistisch signifikanten Gengruppen in den Astrozyten und Fibroblasten detektiert, die nicht in SkMZ und Neuronen vorkamen. Allerdings wies jeder Zelltyp *Toxoplasma*-spezifische Gene auf, die ausschließlich in einer Zellprobe nachgewiesen wurden (Tabelle 32).

Tabelle 31: *Toxoplasma*-Gene der in Tabelle 30 hervorgehobenen funktionellen Gruppe, die ausschließlich in den Transkriptomen von infizierten SkMZ und Neuronen angereichert waren und an der Bildung von Nukleotiden und Nucleosiden, Nucleobasen und Nucleinsäuren beteiligt sind.

Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	
Adenosine/AMP deaminase domain-containing protein	hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HXGPRT)
adenylate and guanylate cyclase catalytic domain-containing protein	IMP dehydrogenas (IMPDH)
adenylate cyclase, putative	kinase, pfkB family protein
adenylosuccinate lyase, putative	nicotinate phosphoribosyltransferase
adenylosuccinate synthetase, putative	nucleoside diphosphate kinase, putative
AMP deaminase	orotate phosphoribosyltransferase
	orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase
aspartate carbamoyltransferase	phospholipid-translocating P-type ATPase, flippase subfamily protein
ATP synthase beta subunit ATP-B (ATPB)	phosphoribosylpyrophosphate synthetase
ATP synthase F0 subunit 9, putative	plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase A1 PMCAA1 (PMCAA1)
ATP synthase F1 gamma subunit	proton ATPase, putative
ATP synthase F1, delta subunit protein	P-type ATPase of unknown pump specificity (type V) protein
ATP synthase F1, epsilon subunit, putative	P-type ATPase4, putative
ATP synthase, putative	ribose-phosphate diphosphokinase subfamily protein
ATPase synthase subunit alpha, putative	
bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase
bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	vacuolar ATP synthase subunit 54kD, putative
calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type protein	vacuolar ATP synthase subunit A, putative
cation-transporting atpase family protein	vacuolar ATP synthase subunit B, putative
CTP synthase	vacuolar ATP synthase subunit C, putative
dihydroorotate dehydrogenase reveal, putative	vacuolar ATP synthase subunit D, putative
E1-E2 ATPase subfamily protein	vacuolar atp synthase subunit E, putative
glutamine-dependent NAD(+) synthetase protein, putative	vacuolar atp synthase subunit F, putative
guanylyl cyclase	vacuolar ATP synthetase
haloacid dehalogenase family hydrolase domain-containing protein	vacuolar proton translocating ATPase subunit A, putative
heavy metal translocating P-type ATPase subfamily protein	vacuolar proton translocating ATPase subunit, putative
hypothetical protein	V-ATPase subunit c' proteolipid, putative
hypothetical protein	V-type ATPase, D subunit protein

Tabelle 32: Funktionelle Gruppen von *Toxoplasma gondii*-spezifischen Transkripten, die spezifisch in SkMZ, Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten 24 Stunden nach Infektion mittels genomweiter RNA-Sequenzierung detektiert und nach DAVID-Analyse in den Transkriptomen als signifikant angereichert identifiziert wurden ($p < 0,05$).

Dargestellt sind funktionelle Gruppen, die ausschließlich in einem Zelltyp angereichert vorlagen.

	C2C12	Neuronen	NIH3T3	Astrozyten
	4.588	5.630	4.127	4.827
cell redox homeostasis	+			
ion transmembrane transport			+	
ion transport			+	
nucleoside triphosphate metabolic process (incl. biosynthesis)			+	
oxidation reduction	+			
Proteasome			+	
purine nucleoside triphosphate metabolic process (incl. biosynthesis)			+	
purine ribonucleoside triphosphate metabolic process (incl. biosynthesis)			+	
ribonucleoprotein complex biogenesis		+		
ribonucleoside triphosphate metabolic process (incl. biosynthesis)			+	
ribosome biogenesis		+		
Spliceosome				+
translation		+		
translational initiation				+
transmembrane transport		+		

3.4.2.5.6 Zusammenfassung

Nach erfolgreichen Analysen muriner Transkripte wurden auch *Toxoplasma*-spezifische Gene innerhalb jedes Zelltyps nachgewiesen. Zum einen bestätigten die genomweiten Transkriptomanalysen eine erhöhte Präsenz Bradyzoiten-spezifischer Gene wie *BAG1* und *ENO1* in infizierten Neuronen und SkMZ (Tabelle 29). Zum anderen waren vor allem diejenigen parasitären Gene von Interesse, die besonders in SkMZ und Neuronen exprimiert wurden. Es wurde allerdings nur ein Gencluster spezifisch in infizierten SkMZ und Neuronen identifiziert, derer Transkripte an der Bildung von Nukleotiden bzw. Nukleinsäuren beteiligt sind (Tabelle 30; gelbe Markierung). Im Speziellen enthielt der Cluster diejenige Gene, die für mehrere Untereinheiten von ATP-asen des V- und P-Typs kodieren (Tabelle 31). Zugleich wurden *Toxoplasma*-spezifische Transkripte ausschließlich in einem der Zelltypen nachgewiesen (Tabelle 32).

3.5 Zelltyp-bedingte Regulation von Zellzyklusregulatoren während der *T. gondii*-Infektion

Zum einen wies die genomweite Transkriptomanalyse auf eine erhöhte Expression vieler Zellzyklusregulatoren insbesondere in terminal differenzierten SkMZ im Vergleich zu Fibroblasten 24 Stunden nach *Toxoplasma*-Infektion hin, zum anderen ist bekannt, dass der Zellzyklusregulator *CDA-1* als Bradyzoiteninduktor in humanen, mit *Toxoplasma* (Stamm RH)-infizierten Fibroblasten (HFF) fungieren kann [Radke et al., 2006]. Wurden HFF-Zellen mit einer Compound 1 genannten Substanz stimuliert, stieg die *CDA-1*-Transkription in den Wirtszellen an, was sich positiv auf die *BAG1*-Expression auswirkte. Darauf aufbauend wurde die Transkription dieses Gens in den mit *Toxoplasma* (Stamm NTE)-infizierten C2C12- und NIH3T3-Zellen charakterisiert. Da *Tspyl2* (*CDA-1*-orthologes Gen der Maus) in Zusammenhang mit weiteren Zellzyklusregulatoren wie *p21* (*Cdkn1a*), *Uhrf1* und *CyclinB1* (*Ccnb1*) steht, wurden sie ebenfalls mittels Reverse Transkriptase-qPCR und zum Teil durch Immunoblot analysiert. Diese Methoden sollten die potentiellen Unterschiede ihrer Expressionen bezüglich der Muskeldifferenzierung und des Zelltyps erfassen.

3.5.1 Expression von Zellzyklusregulatoren während der C2C12-Differenzierung

Zunächst wurden die Expressionsprofile der Gene zweier negativer Zellzyklusregulatoren (*Tspyl2* und *p21*) sowie zweier Zellzyklusaktivatoren (*Uhrf1* und *Ccnb1*) im Laufe der C2C12-Differenzierung in Differenzierungsmedium ermittelt. Im Abstand von jeweils 48 Stunden wurde RNA isoliert und anschließend das Targetgen mittels Reverser

Transkription und PCR quantifiziert. Da *Tspyl2* als negativer Zellzyklusregulator und *p21* als Zellzyklusinhibitor fungiert, hemmen sie die Myoblastenteilung. Dies ermöglicht eine Initiation der Zellfusion und die darauf folgende Myotubenbildung.

Bezüglich des *Tspyl2*-Gens stieg die Expression von circa 1,3-fach zum Zeitpunkt 48 Stunden der Differenzierung auf 3,5-fach nach 192 Stunden (Abbildung 3-24; A), während die Transkription des *p21*-Gens bereits 48 Stunden nach der Differenzierungsstimulation 4,8-fach höher war als zum Zeitpunkt 0 Stunden. Danach wurde eine weitere 6-fache *p21*-Expressionserhöhung zwischen 48 und 192 Stunden festgestellt (Abbildung 3-24; B).

Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers konnte das *Tspyl2*-Protein nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde die *p21*-Proteinmenge über die gesamte terminale Myotubendifferenzierung erfasst (Abbildung 3-24; C). Zwischen 0 und 48 Stunden konnte eine deutliche Steigerung der *p21*-Proteinmenge nachgewiesen werden. Bis 144 Stunden blieb *p21* auf gleichbleibend hohem Niveau und sank zum Zeitpunkt 192 Stunden leicht ab (Abbildung 3-24; C). Da *Tspyl2* die *p21*-Expression über *p53*-Transkription reguliert [Tu et al., 2007], wurde auch die Menge an *p53*-mRNA und -Protein während der terminalen Differenzierung von C2C12-SkMZ untersucht. Es konnte jedoch keine Regulation des *p53*-Gens oder Proteins auf molekularer Ebene festgestellt werden (Abbildung 3-25; A, B).

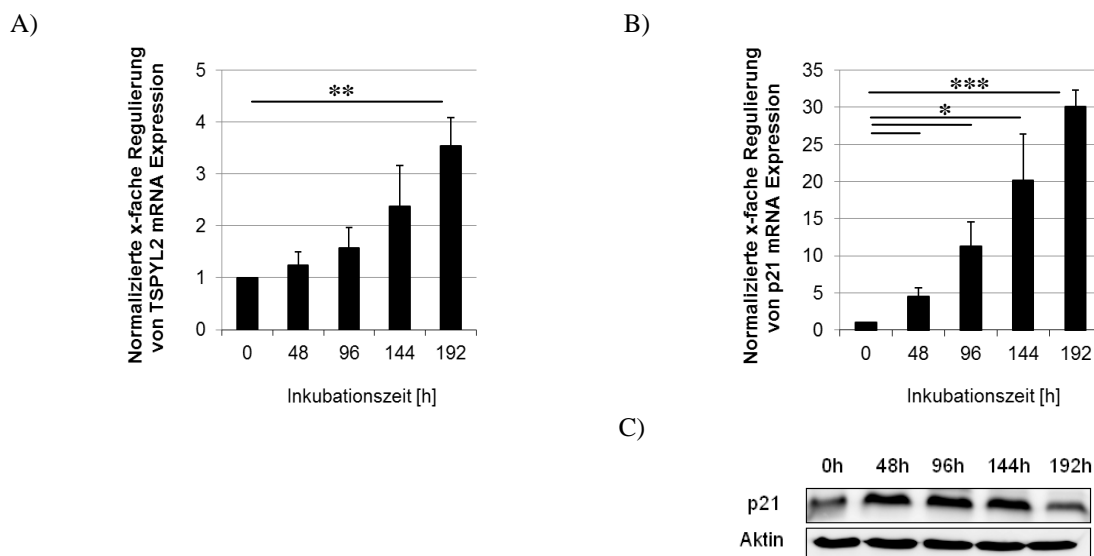


Abbildung 3-24: Ermittlung der *Tspyl2*- (A) und der *p21*-Expression (B) mittels RT-qPCR sowie der *p21*-Proteinmenge (C) durch Immunoblot im zeitlichen Verlauf der terminalen C2C12-Differenzierung. C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (0 Stunden). Alle 48 Stunden wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und *Tspyl2* sowie *p21* cDNA mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert.

Parallel wurden die Zellproteinlysate hergestellt und via Western Blot aufgetrennt. Neben dem *p21*-Targetprotein wurde Aktin-Protein zur Kontrolle detektiert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$,

*** für $p < 0,001$.

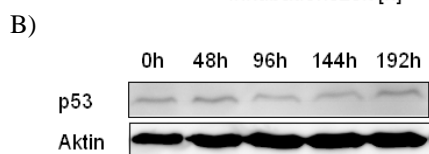
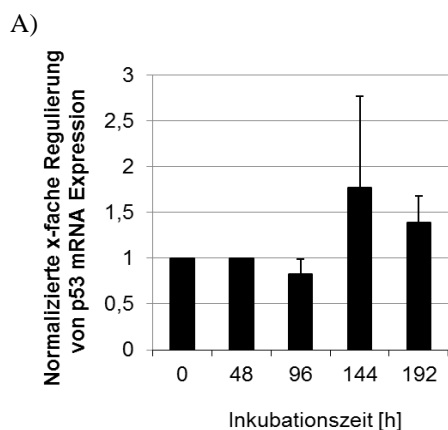


Abbildung 3-25: Ermittlung der p53-mRNA- (A) und Proteinmengen (B) mittel RT-qPCR beziehungsweise Immunoblot im zeitlichen Verlauf der terminalen C2C12-Differenzierung.

Es wurden C2C12-Myoblasten (10×10^4) in Wachstumsmedium ausgesät und 24 Stunden später in Differenzierungsmedium überführt (0 Stunden). Alle 48 Stunden wurde die gesamte RNA isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend p53 cDNA mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert.

Parallel zur RNA-Gewinnung wurden Proteinlysate hergestellt und anschließend p53-spezifischem Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle wurde Aktin-Protein detektiert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

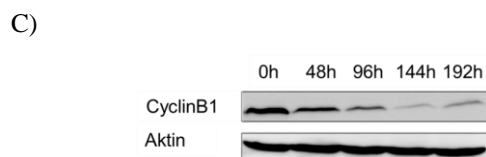
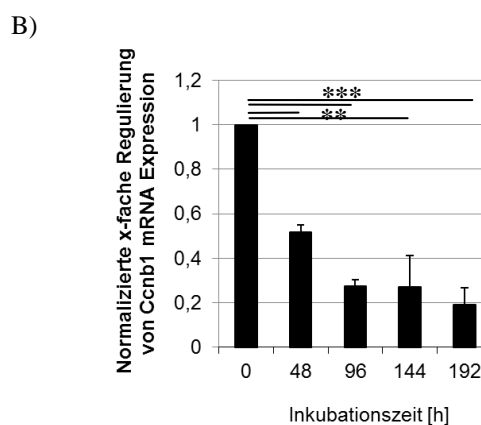
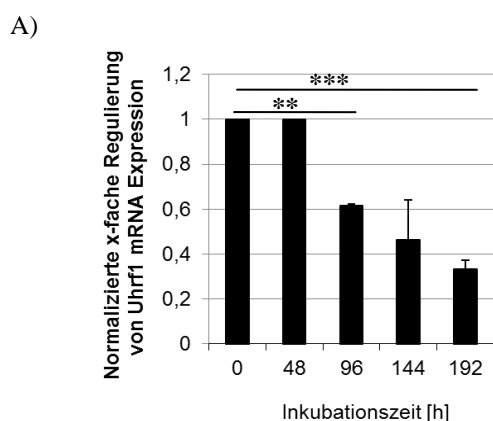


Abbildung 3-26: Ermittlung der Uhrf1- (A) und CyclinB1 (Ccnb1)-Expression (B) mittels RT-qPCR sowie der CyclinB1-Proteinmenge mittels Immunoblot (C) während terminaler C2C12-Differenzierung.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden 24 Stunden vor Zugabe von Differenzierungsmedium (0 Stunden) in Wachstumsmedium ausgesät. Alle 48 Stunden wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend Uhrf1- und CyclinB1-cDNA mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert.

Parallel zur RNA-Gewinnung wurden Proteinlysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit CyclinB1-spezifischen Antikörpern analysiert wurden. Zur Kontrolle wurde Aktin nachgewiesen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar. Signifikanzen: ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$.

Demgegenüber wurden Zellzyklusaktivatoren im Laufe der terminalen Differenzierung von C2C12-SKMZ herunterreguliert. Die Uhrf1-mRNA war nach 192 Stunden mehr als 2-fach (0,4) und statistisch signifikant niedriger im Vergleich zum Zustand nach 0 Stunden

(Abbildung 3-26; A). Des Weiteren war die Expression von CyclinB1 (Ccnb1) zurückgegangen, was mit der fehlenden G2-Mitose-Transition innerhalb der differenzierten C2C12-Zellen im Einklang steht. Es wurde ein etwa 5-facher Ccnb1-Expressionsrückgang ermittelt (Abbildung 3-26; B). Parallel wurde eine starke Abnahme des CyclinB1-Proteins im Verlauf der C2C12-Differenzierung festgestellt (Abbildung 3-26; C).

3.5.2 Expression von Zellzyklusregulatoren während der *T. gondii*-Infektion

Um den Einfluss der *T. gondii*-Infektion auf ausgesuchte Zellzyklusregulatoren zu untersuchen und eine mögliche Zelltyp-abhängige Regulation zu erkennen, wurden C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mit *T. gondii* infiziert. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen des jeweiligen Typs parallel mitgeführt. Die Infektion erfolgte über 72 Stunden, wobei die Referenzwerte dem Zeitpunkt 4 Stunden post infektionem entsprachen.

Im Vergleich zu nicht-infizierten C2C12-Myotuben, -Myoblasten und Fibroblasten, die keine verstärkte *Tspsyl2*-Expression im Verlauf der 72-stündigen Inkubation aufwiesen (Abbildung 3-27; A, graue, hellrote, hellblaue Balken), wurde ein fast 4-facher Anstieg der *Tspsyl2*-mRNA in C2C12-Myotuben 72 Stunden nach *T. gondii*-Infektion festgestellt (Abbildung 3-27; A, schwarze Balken).

Da der negative Zellzyklusregulator *Tspsyl2* den abwärtsliegenden Inhibitor p21 positiv beeinflusst [Tu et al., 2007], wurde dessen Expression ebenfalls untersucht. Wie aus Abbildung 3-27.B zu entnehmen ist, bewirkte eine *Toxoplasma*-Infektion erstaunlicherweise keine erhöhte Expression von p21-mRNA in infizierten Myotuben (schwarz), obwohl das aufgrund der *Tspsyl2*-Zunahme zu erwarten war. In nicht-infizierten Myoblasten wurde dagegen ein statistisch signifikanter p21-Expressionsanstieg festgestellt, sodass ein signifikanter Unterschied in der p21-mRNA-Menge zwischen infizierten (rot) und nicht-infizierten Myoblasten (hellrot) 72 Stunden post infektionem nachgewiesen wurde.

Interessanterweise stieg die *Uhrf1*-Genexpression ausschließlich in den 72 Stunden lang infizierten differenzierten C2C12-SkMZ gegenüber dem Zeitpunkt 4 Stunden um das 10-fache an (Abbildung 3-27; C (schwarze Balken)). In den nicht-infizierten Myoblasten war dagegen die *Uhrf1*-Expression stark hochreguliert, während eine *Toxoplasma*-Infektion die *Uhrf1*-Transkription vollständig hemmte (Abbildung 3-27; C (hellrote bzw. rote Balken)).

Bezüglich des *Ccnb1*-Gens wurde eine Zelltyp- und Infektions-spezifische deutliche Steigerung der Expression in *T. gondii*-infizierten Myotuben nachgewiesen. Die gesteigerte Expression von *Ccnb1* war bereits 24 Stunden nach der Infektion statistisch signifikant (Abbildung 3-27; D (schwarze Balken)). Dagegen hatte die Infektion sowohl in den infizierten Myoblasten (Abbildung 3-27; D (rote Balken)), den infizierten Fibroblasten (Abbildung 3-27; D (blaue Balken)) sowie in allen drei nicht-infizierten Zelltypen keinen Einfluss auf die *Ccnb1*-Expression (Abbildung 3-27; D (graue, hellrote bzw. hellblaue Balken)).

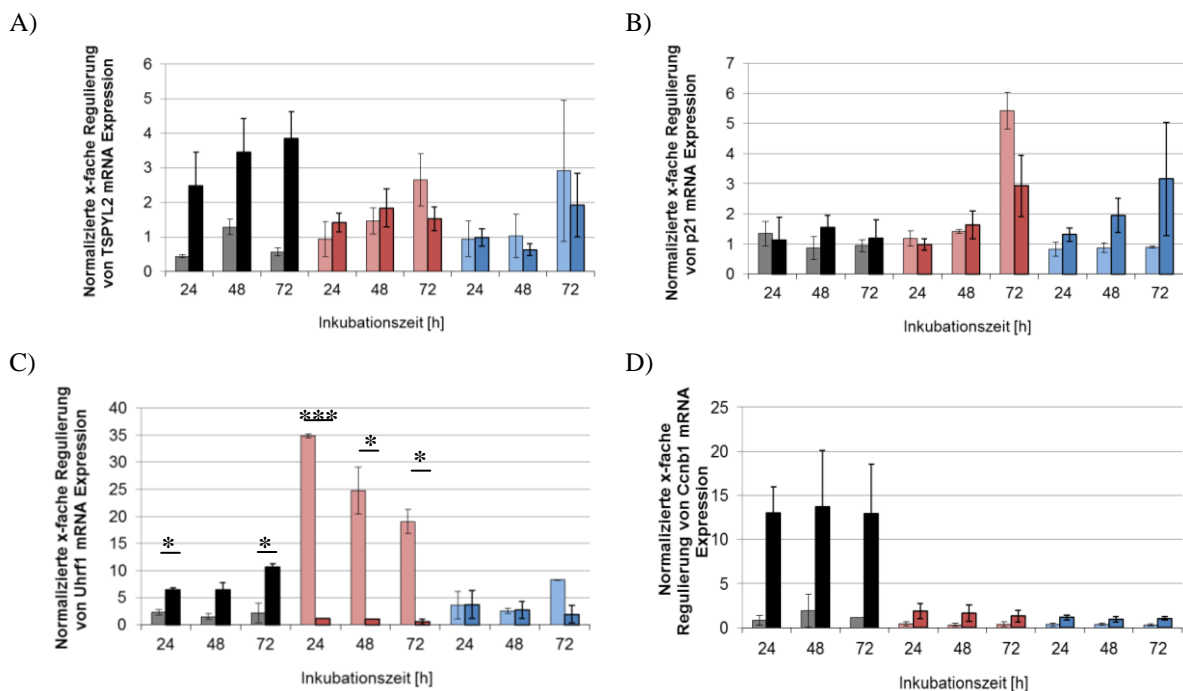


Abbildung 3-27: Bestimmung der mRNA-Mengen der negativen Zellzyklusregulatoren Tspyl2 (A) und p21 (B) sowie der Positivregulatoren Uhrf1 (C) und CyclinB1 (*Ccnb1*) (D) in *T. gondii*-infizierten (dunkle Balken) bzw. nicht-infizierten (helle Balken) C2C12-Myotuben (grau/schwarz), C2C12-Myoblasten (hellrot/rot) und NIH3T3-Fibroblasten (hellblau/blau) mittels RT-qPCR.

C2C12-Myoblasten wurden in Wachstumsmedium ausgesät und 24 Stunden später in Differenzierungsmedium für 168 Stunden überführt. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden C2C12-Myoblasten und die NIH3T3-Fibroblasten (70×10^4) ausgesät. Die Zellen wurden zum Teil mit *T. gondii* vom Stamm NTE im Verhältnis (Parasit:Wirtszelle) 5:1 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Gesamt-RNA aus infizierten und nicht-infizierten Kontrollen isoliert. Nach Umschreiben der mRNA in cDNA, wurde deren Level durch quantitative Real-Time PCR und spezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dargestellt ist die Regulation der spezifischen cDNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen mit Zeitpunkt 0 Stunden. Alle Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$.

3.5.3 Einfluss der *Toxoplasma gondii*-Infektion auf den SkMZ-Zellzyklusarrest in Myotuben

Da die Zellzyklusaktivatoren (CyclinB1, Uhrf1) nach *T. gondii*-Infektion in terminal differenzierten C2C12-Zellen in ihrer Expression verstärkt wurden, war von besonderem Interesse zu wissen, ob der Parasit den unter physiologischen Bedingungen irreversiblen

Zellzyklusearrest von Myotuben aufheben kann. Um dies zu untersuchen, wurden C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten teilweise mit *Toxoplasma* 1:1 und 3:1 (Parasit:Wirtszelle) für 24 (Abbildung 3-28; graue Balken) und 48 Stunden (Abbildung 3-28; rote Balken) infiziert. Eine Stunde vor der Zellfixierung wurden infizierte und nicht-infizierte Wirtszellen mit BrdU inkubiert. Darauf folgend wurden die BrdU-positiven Zellkerne durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen und quantifiziert.

Zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden BrdU-positive Zellkerne vor allem in Myoblasten und NIH3T3-Zellen nachgewiesen (circa 30 pro Sichtfeld) (Abbildung 3-28; B, C). Dagegen waren zum gleichen Zeitpunkt nur circa 10 BrdU-markierte Zellkerne pro Sichtfeld in Myotuben vorhanden (Abbildung 3-28; A). Nach 24 Stunden Inkubation bzw. Infektion mit *T. gondii* stieg die Anzahl der BrdU-Kerne auf circa 45 bis 49 in den Myoblasten und auf bis zu 40 in den Fibroblasten an (Abbildung 3-28; B, C (graue Balken)). Somit hatte die *Toxoplasma*-Infektion in beiden Zelltypen keinen Einfluss auf die BrdU-Kernzahl. Dasselbe galt auch für die C2C12-Myotuben, in denen die Anzahl BrdU-positiver Kerne nur geringfügig und unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii* anstieg (Abbildung 3-28; A (graue Balken)). Im Gegensatz dazu wurde 48 Stunden post infektionem sogar eine leichte Abnahme der BrdU-positiven Zellkerne in infizierten Myotuben nachgewiesen (Abbildung 3-28; A (rote Balken)). Obwohl C2C12-Myoblasten und Fibroblasten sich aktiv teilende Zellen verkörpern, verstärkte die *Toxoplasma*-Infektion die Zellzyklustransition und die damit verbundene Proliferation nicht. Diese Daten zeigen, dass *T. gondii* vom Stamm NTE die DNA-Synthese und Zellzyklusprogression weder in Zellzyklus-arretierten Myotuben noch in Myoblasten oder Fibroblasten fördert.

3.5.4 Zusammenfassung

Während negative Regulatoren des Zellzykluses wie Tspyl2 bzw. Inhibitoren (p21) im Laufe der terminalen Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 3-24), wurden Zellzyklusinduktoren wie *Uhrfl* bzw. *Ccnbl* in ihrer Transkription gehemmt (Abbildung 3-26). Interessanterweise wiesen C2C12-Myotuben eine erhöhte Tspyl2-Regulation nach *Toxoplasma*-Infektion auf. Des Weiteren antworteten dieselben Wirtszellen auf die *Toxoplasma*-Infektion mit der erneuten Aktivierung der *Uhrfl*- und *Ccnbl*-Transkription trotz ihres ruhenden Zellzykluses.

Dennoch wurde keine Zunahme der Anzahl BrdU-positiver Zellkerne in infizierten C2C12-Myotuben nachgewiesen (Abbildung 3-28; A). Die durch *Toxoplasma*-Infektion

hervorgerufene Uhrf1- und Ccnb1-Aktivierung scheint daher für die Aufhebung des Zellzyklusarrestes und den Zellzyklusfortgang der terminal differenzierten Myotuben nicht auszureichen.

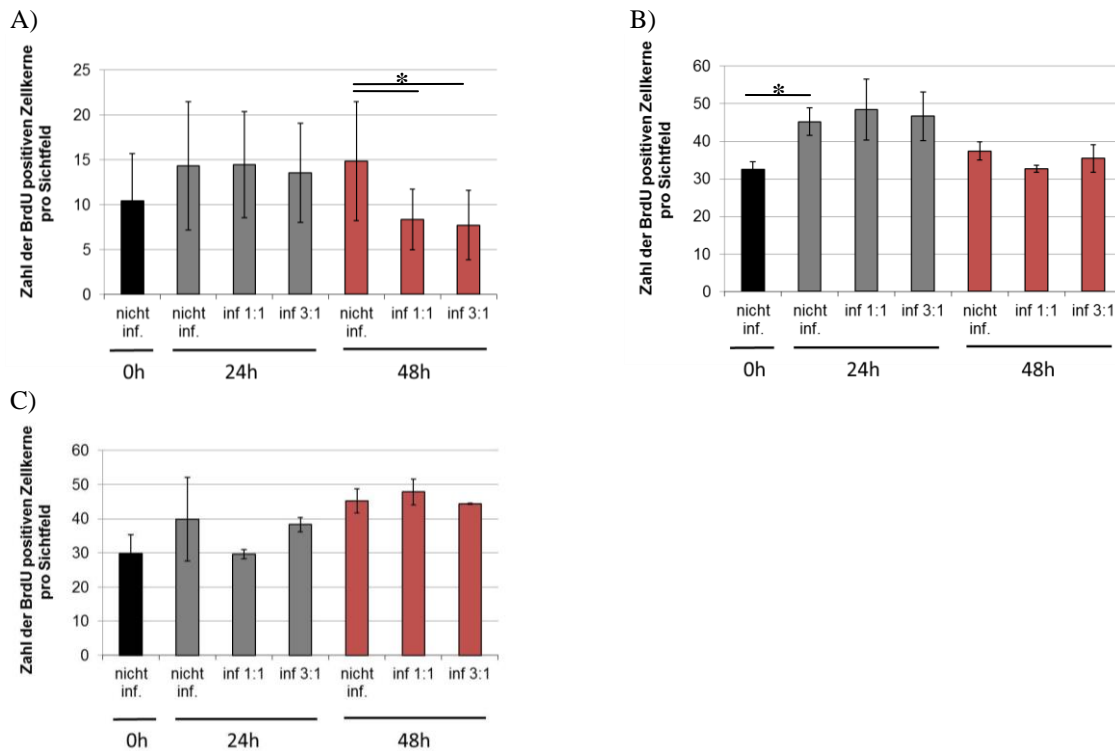


Abbildung 3-28: Quantifizierung der BrdU-positiven Zellkerne in C2C12-Myotuben (A), C2C12-Myoblasten (B) und NIH3T3-Fibroblasten (C) 24 Stunden (grau) und 48 Stunden (rot) nach *Toxoplasma*-Infektion oder Kontrollinkubation.

C2C12-Myoblasten (2×10^4) wurden 168 Stunden lang zu Myotuben differenziert. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden 8×10^4 Myoblasten- und Fibroblasten ausgesät. Anschließend wurde ein Teil der Zellen 1:1 bzw. 3:1 mit *T. gondii* (Stamm NTE) infiziert (Parasiten:Wirtszellen). Die BrdU-Inkubation (10 $\mu\text{g/ml}$) erfolgte für 1 Stunde bei 37°C bevor die Zellen fixiert wurden. Die BrdU-positiven Zellkerne wurden mittels spezifischer Antikörper und fluoreszierender Sekundärantikörper nachgewiesen und anschließend ausgezählt. Pro Probe wurden Zellen aus 10 Sichtfeldern ermittelt. Die Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$.

3.6 Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von *Tsyp12* für die *T. gondii*-Entwicklung in SkMZ

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigten eine Zelltyp-spezifische Expression von Zellzyklusregulatoren in Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten sowie eine Zelltyp-spezifische Modulation der Zellzyklusregulatoren aufgrund einer *T. gondii*-Infektion. Bemerkenswert war dabei die auch nach Infektion weiter gesteigerte Transkription des negativen Zellzyklusregulators *Tsyp12* speziell in infizierten C2C12-Myotuben. Die mögliche Bedeutung von *Tsyp12* in der Induktion von *Toxoplasma*- Bradyzoiten wurde bereits in humanen Zellen anhand des Orthologs CDA-1 nachgewiesen [Radke et al., 2006]. Aus diesem Grund wurde die funktionelle Bedeutung des *Tsyp12*-Gen für die C2C12-Myoblastendifferenzierung und die Parasitenentwicklung in SkMZ durch RNA-Interferenz

untersucht. Das daraus resultierende Tspyl2-mRNA-Silencing wurde zunächst mittels qRT-PCR, Immunoblot und Immunfluoreszenz validiert.

3.6.1 Tspyl2-, Knock-down‘ in C2C12-SkMZ

Zunächst wurden C2C12-Myoblasten mit fünf pLKO.1-Plasmiden, die unterschiedliche *Tspyl2*-DNA-Teilsequenzen trugen, stabil transfiziert. Anschließend wurden die unterschiedlichen Transfektanten einerseits mittels Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium (Abbildung 3-29) und zum anderen über erhöhte Zelldichte (Abbildung 3-30) zur terminalen Differenzierung angeregt. Als Kontrolle wurde ein Teil der Myoblasten mit einem pLKO.1-Plasmid, welches nicht für eine *Tspyl2*-shRNA-Sequenz kodierte, transfiziert. Sie wurden zusammen mit den *Tspyl2*-shRNA-Transfektanten sowie den Wildtyp-C2C12-Myoblasten terminal differenziert (Abbildung 3-31).

Vor Zugabe des Pferdeserum-haltigen Differenzierungsmediums (0 Stunden) exprimierten weder *Tspyl2*-shRNA-Transfektanten (Abbildung 3-29; A, C, E, G, I), noch Kontrolltransfektanten oder WT-Myoblasten (Abbildung 3-31; A, E) das Markerprotein MyHC. Dagegen konnte dieser Muskeldifferenzierungsmarker 144 Stunden nach der Inkubation im Differenzierungsmedium sehr deutlich in Kontrolltransfektanten und Wildtyp-Myotuben (Abbildung 3-31; B, F), nicht aber oder nur in geringem Ausmaß in *Tspyl2*-shRNA-Transfektanten (Abbildung 3-30; B, D, F, H, J), nachgewiesen werden. Obwohl die Zahl der einkernigen *Tspyl2*-shRNA-Transfektanten aufgrund starker Zellteilung zunahm, konnte auch kaum Synzytienbildung und die damit verbundene Myotubenbildung ausgelöst werden. Nur in den Transfektanten *Tspyl2*-shRNA 3, 4 und 5 wurden vereinzelt multinukleäre, MyHC-positive Zellen gesichtet (Abbildung 3-29).

Auch *Tspyl2*-shRNA Transfektanten, die über eine erhöhte Zelldichte in Wachstumsmedium zur Differenzierung gebracht wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolltransfektante und zu Wildtyp-Myotuben (Abbildung 3-31; D, H) einen deutlichen Defekt in der Expression von MyHC und der Synzytienbildung (Abbildung 3-30; B, D, F, H, J).

Aufgrund der vielversprechenden Resultate der Immunfluoreszenzfärbungen wurde der Abbau von *Tspyl2*-mRNA und der darauf folgende Rückgang der *p21*-Transkription anschließend in den shRNA-Klonen 1 und 2 mittels RT-qPCR bestimmt (Abbildung 3-32; A). Die Ergebnisse zeigten, dass die *Tspyl2*-shRNA 1 und 2 Transfektanten nach Induktion der Differenzierung im Vergleich zu Kontrolltransfektanten und Wildtyp-Myotuben stark reduzierte Mengen an *Tspyl2*- und *p21*-mRNA aufwiesen.

Da die Bemühungen, das Tspyl2-Protein durch Immunoblot nachzuweisen, scheiterten, wurden stattdessen p21- und MyHC-Proteine detektiert. Dabei konnte ein eindeutiger Rückgang in den p21-Mengen und eine sehr deutliche Abnahme in der MyHC-Proteinmenge in den beiden Tspyl2-shRNA-Transfektanten 1 und 2 im Vergleich zur Kontrolltransfektante und zu WT-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-32; B).

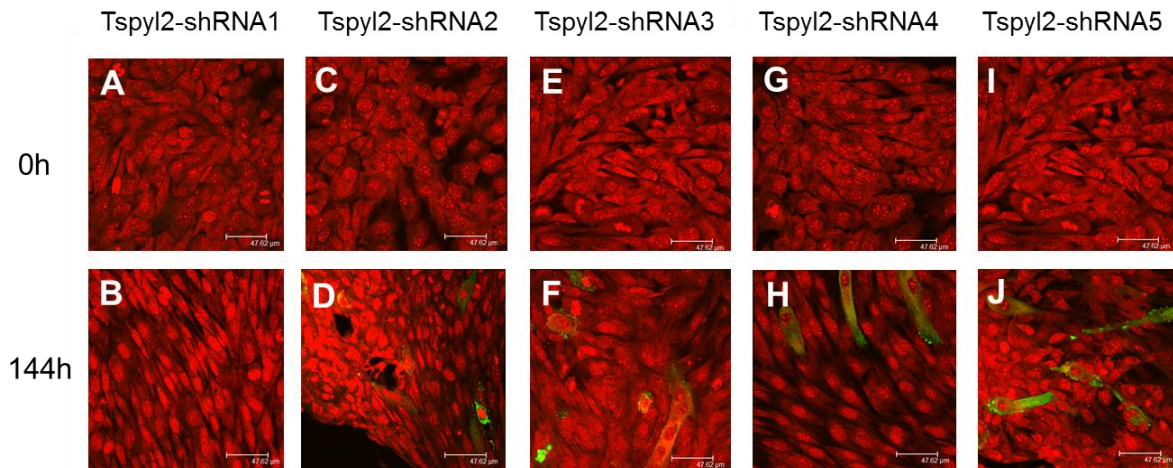


Abbildung 3-29: Nachweis von MyHC-Protein in Tspyl2-shRNA-Transfektanten vor und nach Induktion der Differenzierung in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium mittels Immunfluoreszenz. Es wurden je 2×10^4 C2C12-Myoblasten der 5 unterschiedlichen Transfektanten in Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden sie in Differenzierungsmedium überführt (0 Stunden) und weitere 144 Stunden kultiviert. Nach Fixierung der Zellen wurde MyHC mittels spezifischer Antikörper und Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper markiert (grün). Durch Propidiumiodid wurde die Gesamtzellpopulation rot angefärbt. Die repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 μm .

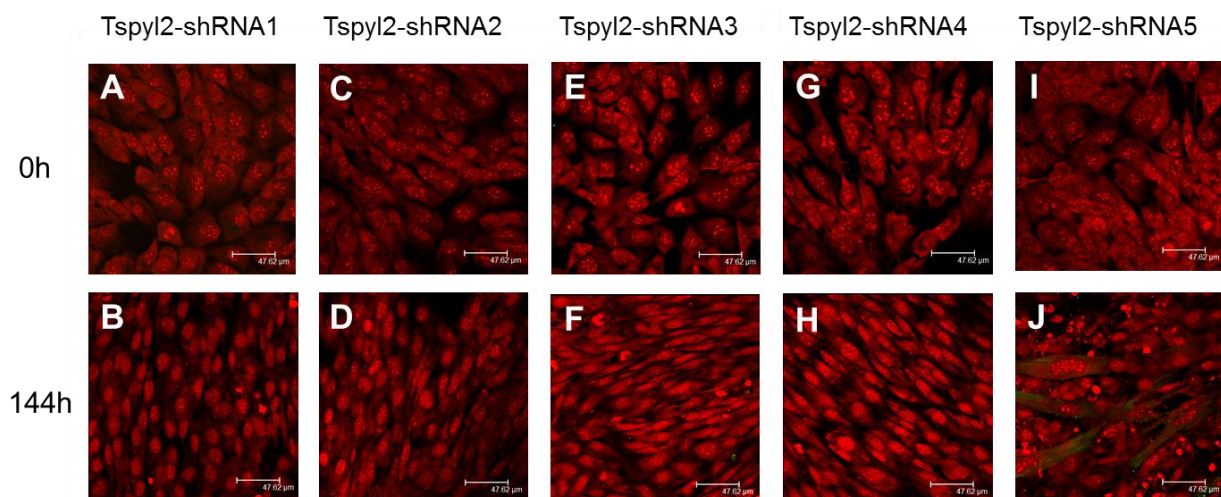


Abbildung 3-30: Nachweis des MyHC-Proteins innerhalb der in Wachstumsmedium kultivierten Tspyl2-shRNA-C2C12-Zellen mittels Immunfluoreszenz.

Von den 5 unterschiedlichen Tspyl2-shRNA-Transfektanten wurden jeweils 10×10^4 Zellen in Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden (Zeitpunkt = 0 Stunden) wurden die Zellen für weitere 144 Stunden inkubiert. Nach der Zellfixierung wurden der MyHC-Muskeldifferenzierungsmarker mittels spezifischer primärer und Cy2-markierter sekundärer Antikörper grün gefärbt. Die Gesamtzellpopulation wurde via Propidiumiodid rot angefärbt. Die repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 μm .

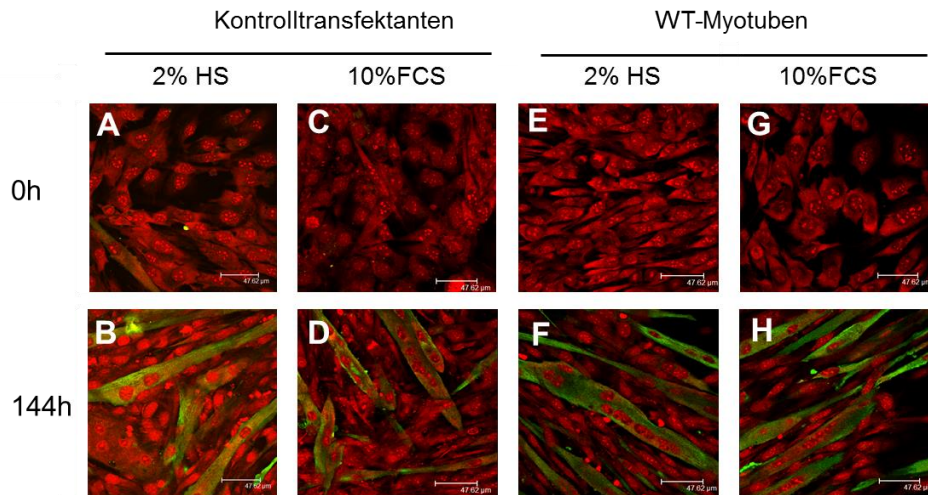


Abbildung 3-31: Nachweis des MyHC-Proteins innerhalb der im Differenzierungs- (HS) und Wachstumsmedium (FCS) kultivierten C2C12-Kontrolltransfektanten (A-D) und –Wildtypzellen (E-H) mittels Immunfluoreszenz.

C2C12-Kontrolltransfektanten und WT-Myoblasten (2×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden sie in Pferdeserum-haltiges Differenzierungsmedium überführt (0 Stunden) und weitere 144 Stunden kultiviert. Außerdem wurden die Zellen mit erhöhter Dichte (10×10^4) in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden (= 0 Stunden) für weitere 144 Stunden inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurde MyHC mittels spezifischer Antikörper und Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper grün markiert. Durch Propidiumiodid wurde die Gesamtzellpopulation rot angefärbt. Die repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 µm.

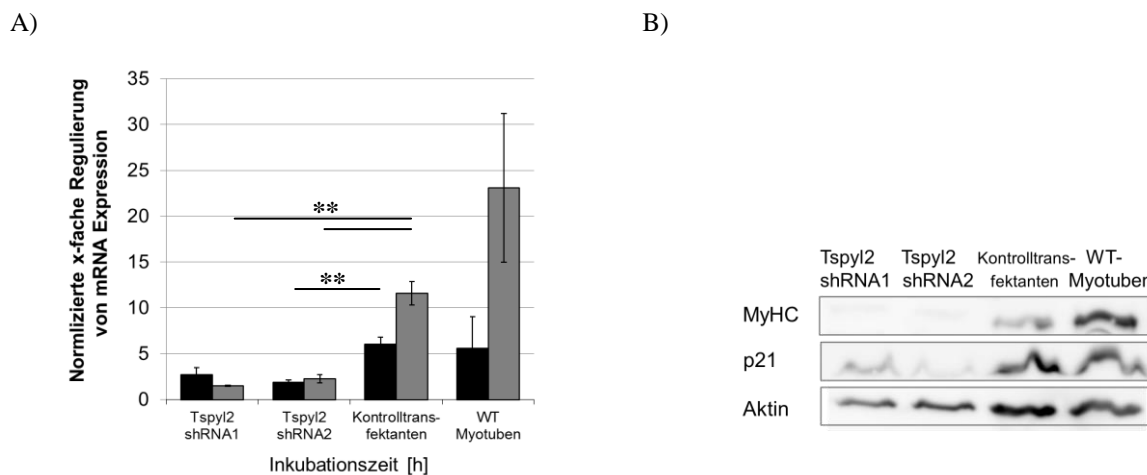


Abbildung 3-32: Bestimmung der Tspyl2- (schwarz) bzw. p21- (grau) Expressionstärken (A) sowie der MyHC- und p21-Proteinmengen (B) in den Tspyl2-shRNA-C2C12-Transfektanten 1 und 2, Kontrolltransfektanten und Wildtyp-Myotuben mittels RT-qPCR und Western Blot.

Die Zellen wurden mit erhöhter Zelldichte (70×10^4) in Wachstumsmedium ausgesät und nach 24 Stunden weitere 5 Tage in Wachstumsmedium weiterkultiviert. Zum Zeitpunkt 0 und 144 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels spezifischer Primer und Real-Time PCR quantifiziert. Die Expressionswerte wurden auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt der Wirtszelle normalisiert. Parallel zur RNA-Gewinnung wurden Proteinlysate zum Zeitpunkt 0 und 144 Stunden isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und durch Immunoblot analysiert. Die MyHC- und p21-Proteine wurden anhand spezifischer Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde Aktin detektiert. Die repräsentativen Bilder stammen aus einem von drei (RT-qPCR) bzw. vier (Western Blot) durchgeführten Experimenten. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar. Signifikanzen: ** für $p < 0,01$.

3.6.2 Einfluss des Tspyl2-,Knock-downs‘ in C2C12-SkMZ auf die *T. gondii*-Entwicklung

Um den Einfluss der deutlich verminderten Tspyl2-Expression auf die Replikation und Stadiendifferenzierung von *T. gondii* zu untersuchen, wurden die beiden erfolgreichen Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten und die Kontrolltransfektanten nach Induktion von SkMZ-Differenzierung sowie Wildtyp-Myotuben und -Myoblasten mit *T. gondii*-NTE für bis zu 72 Stunden infiziert. Im Abstand von 24 Stunden wurde der Verlauf der parasitären Entwicklung mittels Immunfluoreszenz und qPCR verfolgt.

Interessanterweise führte die runterregulierte Tspyl2-Expression dazu, dass *T. gondii* sich deutlich stärker vermehrte als in Kontrolltransfektanten oder WT-Myotuben (Abbildung 3-33). Dabei wiesen Mutanten, Kontrollen und WT-Zellen 24 Stunden post infektionem noch keine deutlichen Unterschiede in der Infektionsstärke auf (Abbildung 3-33; A, D, G, J, M). Zwischen 24 und 72 Stunden der Infektion stieg die Replikationsstärke der Parasiten in allen Proben, wobei eine deutlich stärkere Replikation des Parasiten in den Transfektanten Tspyl2-shRNA 1 und 2 (C, F) sowie den WT-Myoblasten (O) im Vergleich zu Kontrolltransfektanten und WT-Myotuben festgestellt wurde. Dagegen konnten wie in den vorhergehenden Experimenten in den WT-Myotuben sowie in den Kontrolltransfektanten zum Zeitpunkt von 48 und 72 Stunden hauptsächlich deutlich kleinere PV und nur wenige rupturierende SkMZ beobachtet werden (H, K, I, L). Trat Zellruptur in diesen Proben auf, so betraf sie ausschließlich nicht-fusionierte, einkernige Zellen.

Die Quantifizierung der *Toxoplasma*-Parasiten mittels qPCR von genomischer DNA bestätigte eine stärkere Vermehrung von *T. gondii* in den Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten im Vergleich zur Vermehrung in Kontrolltransfektanten und WT-Myotuben (Abbildung 3-34). Die Parasitenmenge in den beiden Tspyl2-shRNA-Transfektanten war dabei im Mittel sogar größer als in WT-Myoblasten, allerdings war dieser Unterschied aufgrund der relativ großen Standardabweichung nicht statistisch signifikant.

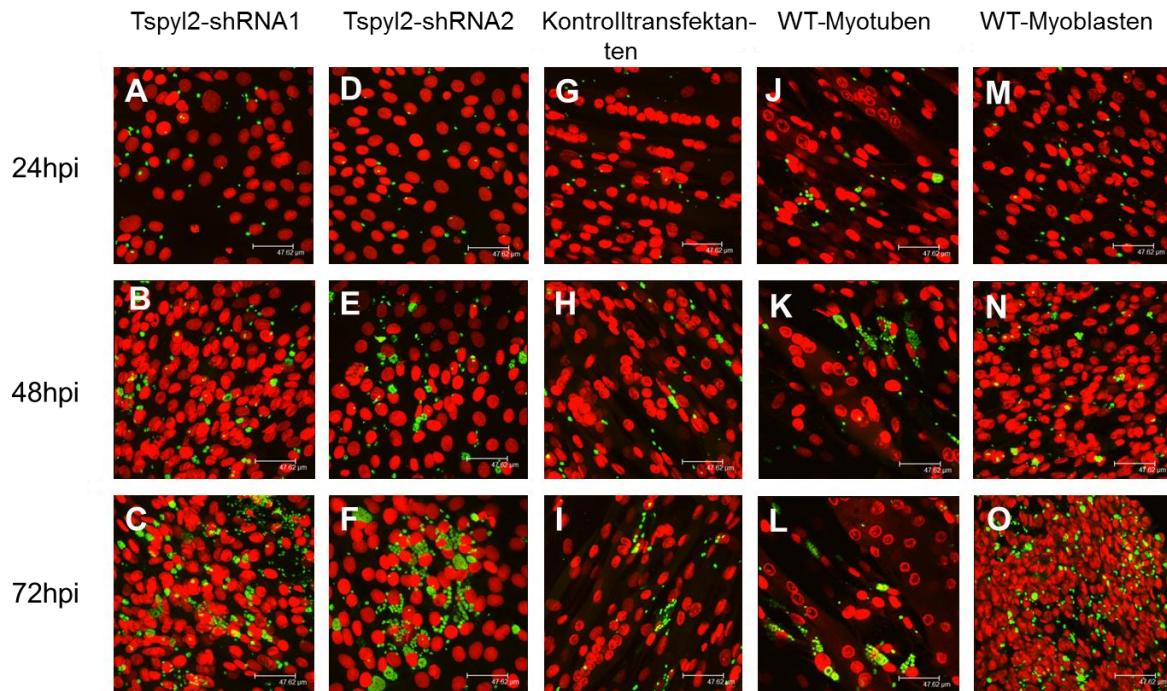


Abbildung 3-33: Immunfluoreszenzfärbung von *T. gondii* (Stamm NTE) in C2C12 Tspyl2-shRNA Transfektanten 1 und 2 (A-C, D-F), C2C12-Kontrolltransfektanten (G-I), C2C12-WT-Myotuben (J-L) und C2C12-WT-Myoblasten (M-O) während Infektion für 72 Stunden.

Die Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten sowie Kontrolltransfektanten (10×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und für 168 Stunden inkubiert. C2C12-WT-SkMZ wiederum wurden im Wachstumsmedium (2×10^4) ausgesät aber nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (= 0 Stunden) und weitere 144 Stunden inkubiert. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden Wildtyp-Myoblasten ausgesät (8×10^4). Am folgenden Tag wurden die Zellen mit *Toxoplasma* 3:1 infiziert (Parasit:Wirtszell-Verhältnis) und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. *T. gondii* wurde mittels spezifischer Primärantikörper und Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper grün gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid markiert. Die dargestellten Bilder repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 µm.

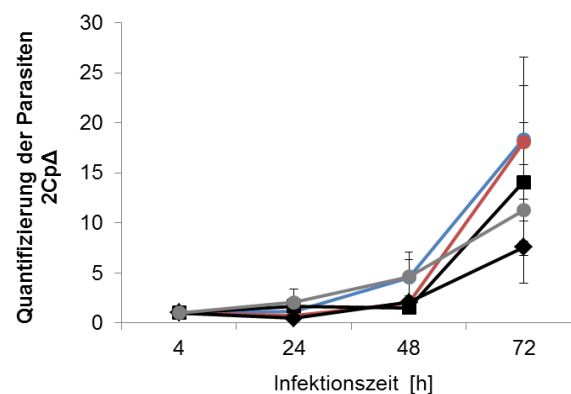


Abbildung 3-34: Quantifizierung von *T. gondii* NTE-Parasiten nach Vermehrung in Tspyl2-shRNA 1- und 2-C2C12-Transfektanten (●, blau (Tspyl2-shRNA 1), rot (Tspyl2-shRNA 2)), C2C12-Kontrolltransfektanten (●, grau), C2C12-Myotuben (◆) und -Myoblasten (■) mittels qPCR.

Die Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten sowie Kontrolltransfektanten (70×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und für 168 Stunden inkubiert. C2C12-WT-SkMZ wurden im Wachstumsmedium (10×10^4) ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (= 0 Stunden) und weitere 144 Stunden inkubiert. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden Wildtyp-Myoblasten ausgesät (70×10^4). Alle Zellen wurden mit *T. gondii*-Tachyzoiten im Verhältnis 3:1 infiziert. Nach 4 Stunden und alle 24 Stunden wurde genomische DNA aus extra- und intrazellulären Parasiten extrahiert und das 529bp repetitive DNA-Fragment durch quantitative Real-Time PCR amplifiziert. Die ermittelten Cp-Werte wurden nach Formel 2 umgerechnet. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.6.3 Einfluss des Tspyl2-,Knock-downs‘ in C2C12-SkMZ auf die *T. gondii*-Stadiendifferenzierung

Zusätzlich zur Bestimmung der Parasitenreplikation wurden Untersuchungen bezüglich der Zystenbildung in C2C12-SkMZ mit deutlich verminderten Tspyl2-Transkriptmengen durchgeführt. Dabei wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung außer den bradyzoitenhaltigen Zysten auch die MyHC-Proteine und die Gesamtparasitenpopulation markiert. Wie Abbildung 3-35 zeigt, waren Gewebezysten in Kontrolltransfektanten (H, I), WT-Myotuben (K, L) und – Myoblasten (N, O) während der 96-stündigen Infektion nachweisbar. Die *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL)-markierten Zysten wurden auch in beiden Tspyl2-shRNA-Transfektanten nachgewiesen (Abbildung 3-35; B, E), wobei ihr Nachweis auch im weiteren Infektionsverlauf (96 Stunden) gelang (Abbildung 3-35; C, F).

Eine Quantifizierung der fluoreszierend-markierten Zysten zeigte jedoch, dass vor allem 48 Stunden nach Infektion DBL-positve Zysten von *T. gondii* in Tspyl2-shRNA-Transfektanten zwei- bis dreimal weniger häufig vorkamen als in C2C12-WT-Myotuben oder C2C12-Kontrolltransfektanten (Abbildung 3-36). Die Zystenanzahl in WT-Myoblasten war 48 Stunden post infectionem, wie erwartet, ebenfalls deutlich niedriger als in WT-Myotuben und Kontrolltransfektanten. Festzustellen war dabei vor allem in den Tspyl2-shRNA-Transfektanten eine starke Abweichung bezüglich ihrer Anzahl zwischen drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Dagegen wiesen die Kontrolltransfektanten und Wildtypzellen eine jeweils relativ gleichbleibend große Menge der DBL-positiven Zysten auf. Mit zunehmender Infektionsdauer nahm die mittlere Zystenmenge in allen Zellen je Sichtfeld ab.

Darauf aufbauend wurde die Expression des bradyzoitenspezifischen Antigens 1 (*BAG1*) mittels reverse Transkriptase-qPCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigten 96 Stunden nach Infektion eine verminderte Expression von BAG1 in Tspyl2-shRNA-Transfektanten 1 und 2 im Vergleich zu Wildtyp-Myotuben und Kontrolltransfektanten (Abbildung 3-37). Auch aktiv replizierenden Wildtyp-Myoblasten wiesen eine reduzierte *BAG1*-Transkription im Vergleich zu Myotuben und Kontrolltransfektanten auf (Abbildung 3-37). Aufgrund der Varianz von Versuch zu Versuch wurde jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt, so dass lediglich eine Tendenz einer verstärkten BAG1-Expression in C2C12-Myotuben und Kontrolltransfektanten nachweisbar war.

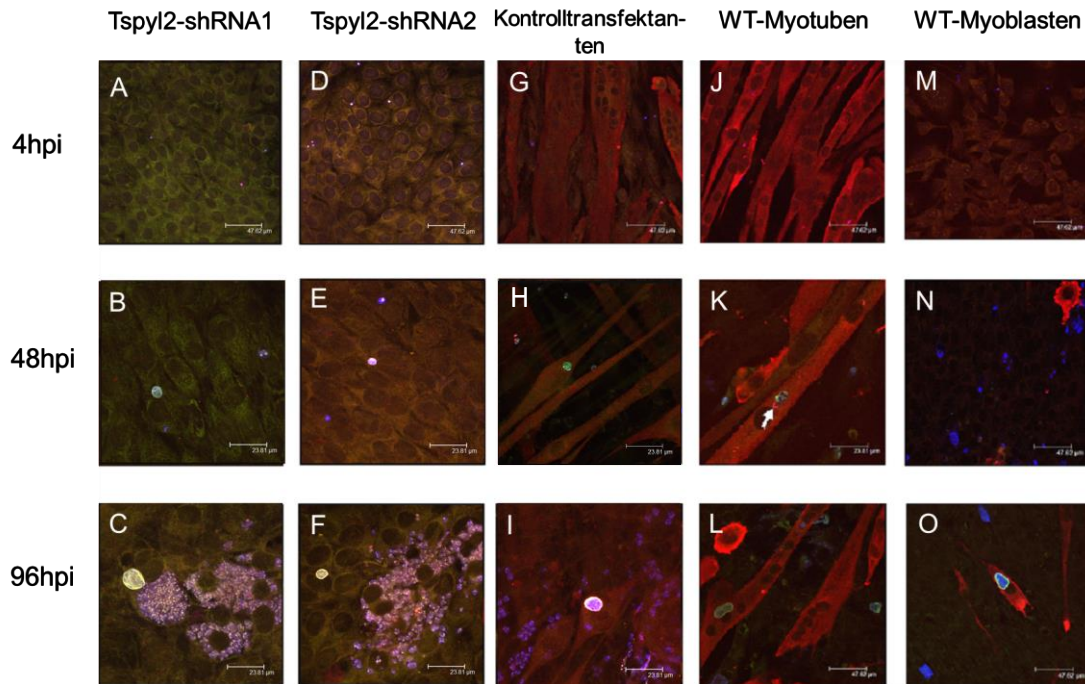


Abbildung 3-35: Detektion von *T. gondii* bradyzoitenhaltigen Zysten in Tspyl2-knock down C2C12-Zellen (shRNA 1 und 2 Transfektanten, A-C, D-F), Kontrolltransfektanten (G-I), C2C12-Wildtyp-Myotuben (J-L) und -Myoblasten (M-O) mittels Dreifachimmunfluoreszenzfärbung.

Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten sowie Kontrolltransfektanten (10×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und für 168 Stunden inkubiert. C2C12-WT-SkMZ wiederum wurden im Wachstumsmedium (2×10^4) ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (= 0 Stunden) und weitere 144 Stunden inkubiert. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden Wildtyp-Myoblasten (8×10^4) ausgesät. Nach 3:1 Infektion mit *T. gondii* (Parasit:Wirtszell-Verhältnis) wurden die Zellen nach 4, 48 und 96 Stunden fixiert. Die Gesamtparasitenpopulation wurde mit *Toxoplasma*-spezifischen Antiserum und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern blau markiert, bradyzoitenhaltige *Toxoplasma*-Gewebezysten wurden mittels FITC-konjugiertem *Dolichos biflorans*-Lektin grün markiert und MyHC als Markerprotein differenzierter Myotuben wurde mittels spezifischer Primärantikörper und Cy3-konjugierter Sekundärantikörper rot gefärbt. Die hier dargestellten Bilder repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab: 47,62 μm und 23,81 μm .

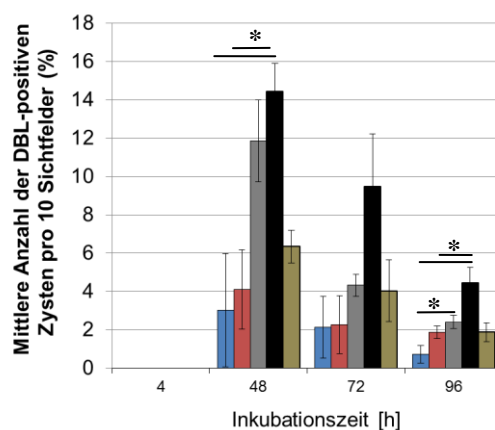


Abbildung 3-36: Quantifizierung von *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL)-positiven *T. gondii* Gewebezysten in Tspyl2-,Knock-down-C2C12-Zellen (shRNA 1-Transfektante blau, shRNA 2 Transfektante rot), Kontrolltransfektante (grau), C2C12-Wildtyp-Myotuben (schwarz) und C2C12-WT-Myoblasten (braun) während der Infektion.

Der Versuchsablauf wurde in Abbildung 3-35 beschrieben. Die Daten stellen das prozentuale Verhältnis der FITC-markierten Zysten zur gesamten Cy5-gefärbten Parasitenzahl in jeweils 10 Sichtfeldern dar. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Signifikanz: * für $p < 0,05$.

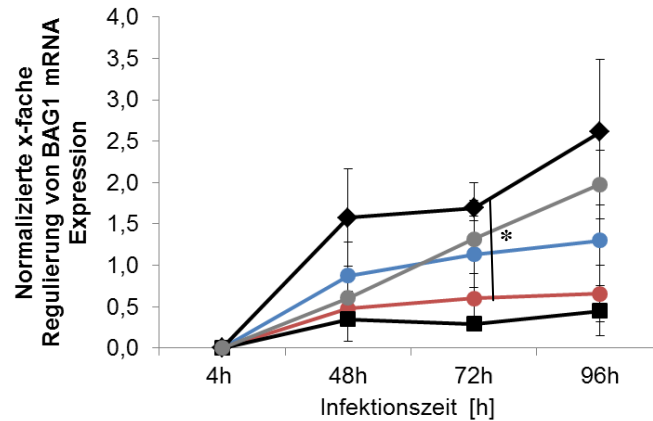


Abbildung 3-37: Bestimmung der Expression von *T. gondii* bradyzoitespezifischem Antigen 1 (BAG1) in Tspyl2-shRNA C2C12-Transfektanten (●, blau (shRNA 1), rot (shRNA 2)), Kontrolltransfektanten (●, grau), C2C12-Myotuben (◆) und -Myoblasten (■) mittels RT-qPCR.

Die Tspyl2-shRNA 1- und 2-Transfektanten sowie Kontrolltransfektanten (70×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät und für 168 Stunden inkubiert. C2C12-WT-SkMZ wurden in Wachstumsmedium (10×10^4) ausgesät und nach 24 Stunden in Differenzierungsmedium überführt (= 0 Stunden) und weitere 144 Stunden inkubiert. Einen Tag vor der geplanten Infektion wurden Wildtyp-Myoblasten ausgesät (70×10^4). Anschließend wurden C2C12-Myotuben, -Myoblasten und alle Transfektanten im Verhältnis 3:1 (Parasiten:Wirtszellzahl) mit *T. gondii* (Stamm NTE) infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge an *BAG1*- und Tubulin (*Tub*)-cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Die *BAG1*-Expressionswerte wurden auf das *Toxoplasma*-Tubulingen normalisiert. Daten stellen die Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Signifikanz: * für $p < 0,05$.

3.6.4 Zusammenfassung

Ein gezieltes ‚Knock-down‘ von Tspyl2-mRNA mittels shRNA hatte eine unterdrückte C2C12-Myoblastendifferenzierung zur Folge (Abbildung 3-30; Abbildung 3-29). Dies wies auf eine essentielle Funktion des *Tspyl2*-Gens in der terminalen Muskeldifferenzierung hin. Untersuchungen mit zwei ausgesuchten Tspyl2-shRNA-C2C12-Transfektanten zeigten, dass eine Hemmung der Tspyl2-Expression gleichzeitig zu einer verstärkten *Toxoplasma*-Replikation im Vergleich zu Kontrolltransfektanten und WT-Myotuben führte (Abbildung 3-33; Abbildung 3-34). Außerdem wurde die *Toxoplasma*-Differenzierung vom replikativen zum potentiell persistierenden Bradyzoiten und die Gewebssystembildung auf Grund einer unterdrückten Tspyl2-mRNA-Menge negativ beeinflusst. Somit konnte ein wichtiger muskeldifferenzierungsspezifischer Faktor ermittelt werden, der die *Toxoplasma*-Entwicklung in diesem zellulären Kompartiment reguliert.

3.7 Zelltyp-spezifische Aktivierung von MAP-Kinase- und Akt/PKB-Signalwegen während Infektion von SkMZ und Fibroblasten mit *Toxoplasma gondii*

Da MAP-Kinase- und Akt/PKB-Signaltransduktionswege wichtige Funktionen bei der terminalen Muskeldifferenzierung vermitteln und die Myotubenbildung regulieren können, wurde ein möglicher Zelltyp-spezifischer Zusammenhang zwischen der *Toxoplasma*-Infektion und diesen Signaltransduktionswegen der Wirtszelle untersucht. Dazu wurde mittels Immunoblot und spezifischer Antikörper gegen phosphorylierte und Gesamtmoleküle die Expression und Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinasen p38, Erk1/2 (p44/42), JNK/SAP sowie von Akt/ProteinkinaseB (PKB) charakterisiert.

3.7.1 Voruntersuchung zur Zelltyp-spezifischen Regulation der Proteinphosphorylierung während *Toxoplasma*-Infektion

Zunächst wurden terminal differenzierte C2C12-Myotuben, proliferierende C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten für 24 Stunden mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und MAP-Kinasen, Akt/PKB und Aktin der Wirtszellen mittels Immunoblot nachgewiesen. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung von p38, ERK1 und 2 (p44/42) sowie Akt/PKB in Abhängigkeit des Zelltyps und der Zelldifferenzierung. Allgemein waren die Proteine in Myotuben und Fibroblasten deutlich stärker phosphoryliert als in Myoblasten, und zwar unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii* (Abbildung 3-38). Außerdem wies dieser Vorversuch darauf hin, dass eine *Toxoplasma*-Infektion für 24 Stunden zu geringeren Veränderungen der Phosphorylierung der Kinasen führte (Abbildung 3-38). So nahm die Phosphorylierung von p38- und Akt-Proteinen in Myotuben aufgrund der *Toxoplasma*-Infektion zu, während die p38-Phosphorylierung in infizierten Myoblasten niedriger war als in nicht-infizierten Kontrollen. Dagegen wiesen die infizierten Myoblasten eine leicht erhöhte Erk1 und 2 (p44/42)-Aktivierung im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen auf. Phosphoryliertes Akt-Protein konnte innerhalb der proliferierenden C2C12-Zellen nur wenig nachgewiesen werden. Aktivierte SAP-Kinase konnten sowohl in infizierten wie in nicht-infizierten Zelltypen kaum nachgewiesen werden - trotz der deutlich nachweisbaren SAPK-Gesamt mengen (Abbildung 3-38).

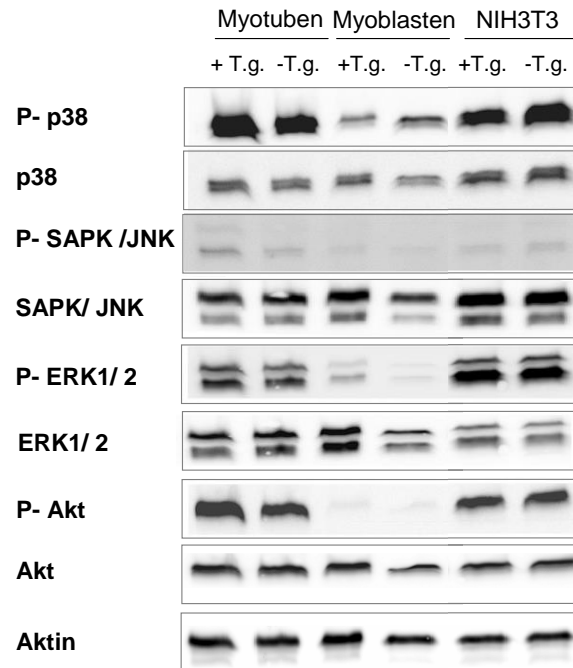


Abbildung 3-38: Nachweis der Phosphorylierung und der Gesamtmengen der Mitogen-aktivierten Kinasen p38, SAP, Erk1/2 sowie von Akt/PKB in *Toxoplasma*-infizierten und nicht-infizierten terminal differenzierten C2C12-Myotuben, C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels Immunoblot.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Wachstumsmedium ausgesät, am nächsten Tag in Pferdeserum-haltiges Medium überführt und 5 Tage lang differenziert. Dagegen wurden 70×10^4 von C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Zellen 24 Stunden vor Infektion ausgesät und zusammen mit den differenzierten Myotuben mit *T. gondii* im Verhältnis 5:1 (Parasit:Wirtszellverhältnis) infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden Gesamtproteinlysate hergestellt. Die Phosphorylierung und die Gesamtmenge der Proteine wurden mittels spezifischer Primärantikörper und HRP-markierter Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde Aktin nachgewiesen. Die Bilder stammen aus einem einzelnen Experiment.

3.7.2 Korrelation zwischen der *Toxoplasma*-Infektion und der Veränderung der Proteinphosphorylierung in SkMZ und Fibroblasten

Da die Voruntersuchung zu vielversprechenden Resultaten zur Zelltyp-abhängigen und zum Teil auch Infektions-abhängigen Aktivierung von MAP-Kinasen und Akt/PKB geführt hatte, wurde anschließend die Phosphorylierung der untersuchten Moleküle 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunde, 6 und 24 Stunden post infektionem mittels Immunoblot genauer untersucht. Die Zielproteine wurden zunächst durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und anschließend mittels Multi Gauge-Software (Fujifilm) quantifiziert. Zusätzlich zum phosphorylierten Zustand eines Proteins wurde jeweils auch die Gesamtmenge nachgewiesen. Die Normalisierung der Proteinphosphorylierung erfolgte anhand des parallel nachgewiesenen Aktins.

Die Ergebnisse konnten die vielversprechenden Unterschiede in der Proteinphosphorylierung zwischen Myotuben und Myoblasten, wie sie der Vorversuch gezeigt hatte (Abbildung 3-38), nicht bestätigen. Weder die Phosphorylierung von p38 (Abbildung 3-39; A) noch die von Akt/PKB (Abbildung 3-39; B) wies deutliche und reproduzierbare Unterschiede zwischen

Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten im Verlauf der *Toxoplasma*-Infektion auf. Ebenso zeigten beide SAP-Kinase-Isoformen zu keinem der Infektionszeitpunkte deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung nach Infektion von Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten (Abbildung 3-39; C, D). Während die leichtere Isoform in allen Zelltypen vergleichsweise deutlich detektiert werden konnte (Abbildung 3-39; D), war die schwere Isoform nur gering exprimiert (Abbildung 3-39; C). Deutlichste Unterschiede in der Proteinphosphorylierung wurden nach der Quantifizierung des Erk1/2-Proteins sichtbar (Abbildung 3-39; E, F). Während die phosphorylierten Proteinisofomeren keine eindeutigen Veränderungen in den infizierten Myotuben und Myoblasten zeigten, waren deren Mengen in infizierten NIH3T3-Zellen deutlich und stiegen im Verlauf der Infektion an (Abbildung 3-39; E, F).

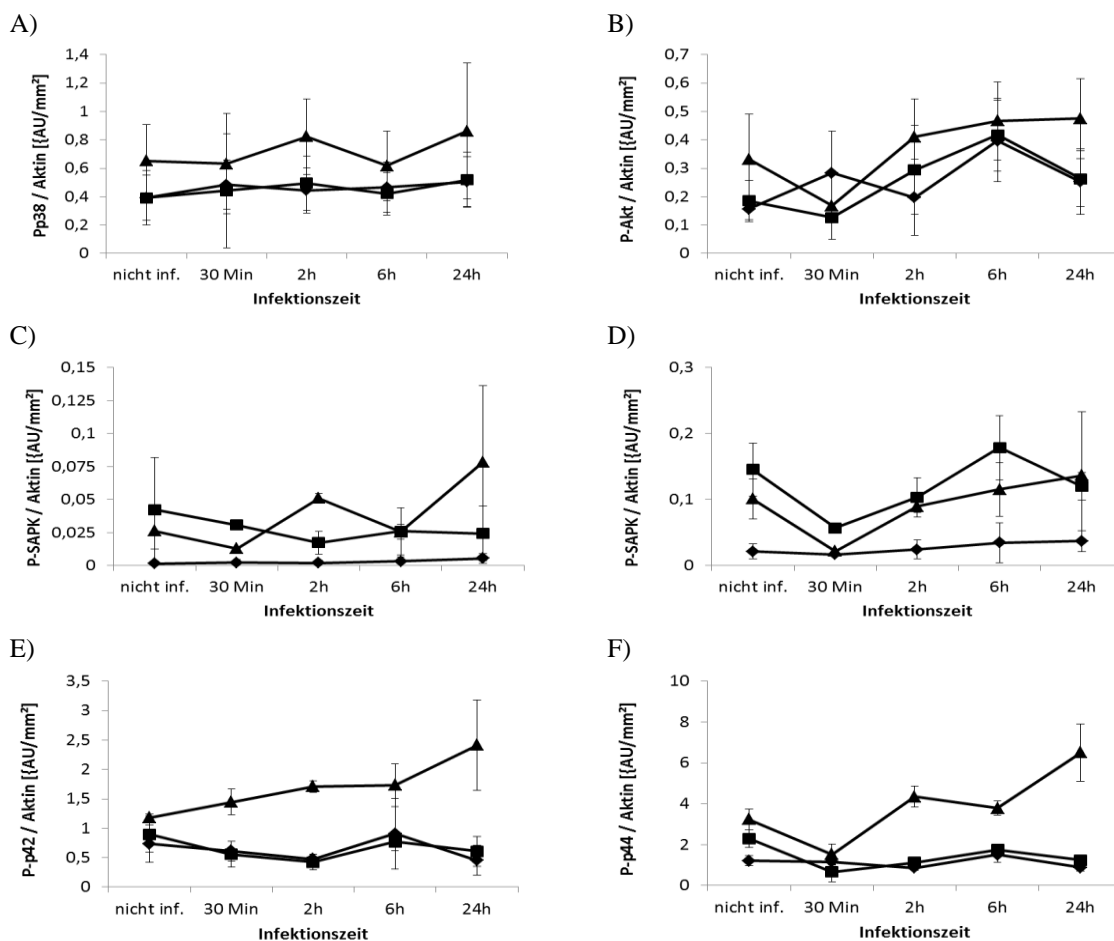


Abbildung 3-39: Quantifizierung der mittels Immunoblot detektierten phosphorylierten Proteinkinasen wie p38 (A), Akt (B), zwei SAPK-Isoformen (C, D) und zwei Erk-Isoformen, Erk2 (p42, E) und Erk1 (p44, F) während der *Toxoplasma*-Infektion innerhalb der C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).

Der Versuchsverlauf wurde zum Teil in der Abbildung 3-38 beschrieben, allerdings wurden Proteinlysate zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion untersucht. Nach Immunfärbung und Chemilumineszenznachweis spezifischer Immunkomplexe. Darauf folgend wurden die Größen der detektierten Proteinbanden via Multi Gauge-Software quantifiziert und ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis zwischen Zielprotein und Aktin wurde in der Einheit Absorptionsstärke pro mm² beschrieben. Alle Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Untersuchungen dar.

Um mögliche Veränderungen in der Aktivierung von MAP-Kinasen und Akt/PKB in der Frühphase der Infektion aufzudecken, wurde darüber hinaus der Verlauf der Proteinphosphorylierung 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden nach Infektion mit *T. gondii* wie oben beschrieben charakterisiert. Der Nachweis von phosphorylierten SAP-Kinasen gelang zu diesen Zeitpunkten der Infektion nicht, weshalb eine Quantifizierung nicht möglich war. Während in Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten nach Infektion mit *T. gondii* keine deutlichen und reproduzierbaren Veränderungen der p38-Phosphorylierung festgestellt werden konnten (Abbildung 3-40; A), war die Menge an phosphoryliertem Akt/PKB in Myotuben deutlich höher als in Myoblasten und Fibroblasten (Abbildung 3-40; B). *Toxoplasma*-infizierte C2C12-Myoblasten wiesen nur geringe Mengen der phosphorylierten Erk1/2-Isoformen auf und dies änderte sich im Verlauf der zwei-stündigen Infektion mit *T. gondii* nicht (Abbildung 3-40; C, D). Im Vergleich dazu wiesen infizierte Myotuben und Fibroblasten insgesamt größere Mengen an phosphoryliertem Erk1 und 2 auf, allerdings waren aufgrund großer Varianzen zwischen einzelnen Experimenten keine deutlichen Unterschiede im Aktivierungsprofil zwischen Myotuben und Fibroblasten nach *Toxoplasma*-Infektion offensichtlich (Abbildung 3-40; C, D).

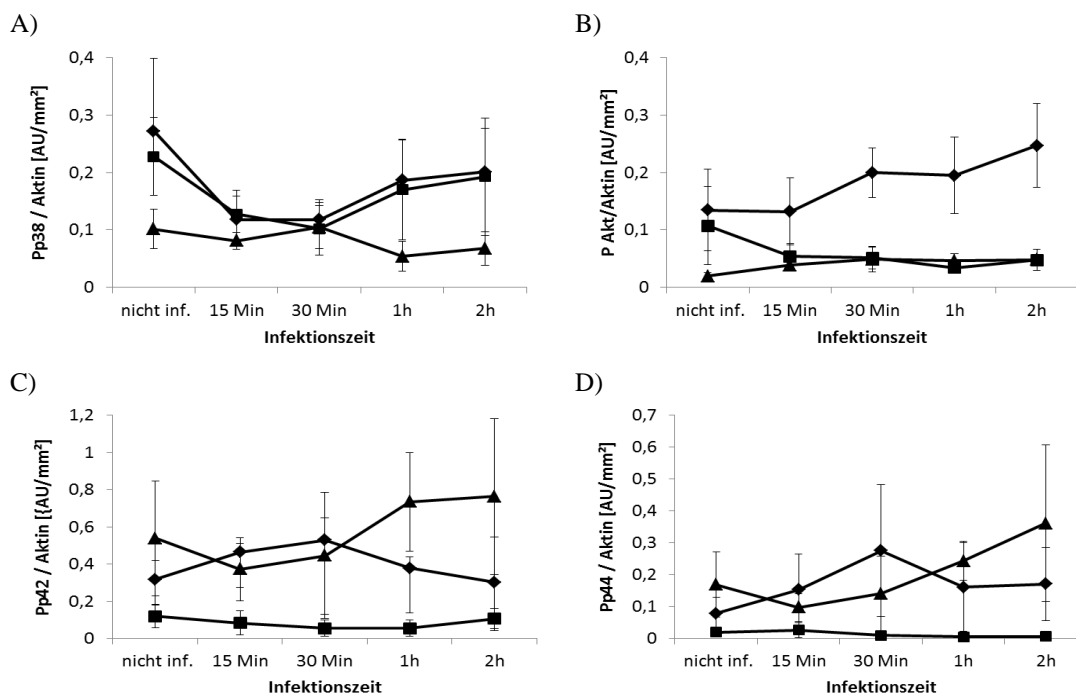


Abbildung 3-40: Quantifizierung der mittels Immunoblot detektierten phosphorylierten MAP-Kinasen p38 (A), Akt (B) und der Erk1/2-Isoformen (C, D) während der *Toxoplasma*-Infektion in C2C12-Myotuben (◆), -Myoblasten (■) und NIH3T3-Fibroblasten (▲).

Der Versuchsverlauf entsprach dem in der Abbildung 3-38 und der Abbildung 3-39 beschriebenen Angaben. Die Mengen der phosphorylierten MAP-Kinasen sowie des Aktinproteins wurden ins Verhältnis gesetzt und in der Einheit Absorptionsstärke pro mm² dargestellt. Alle Werte stellen den Mittelwert und Standardsfehler dreier unabhängiger Untersuchungen dar.

3.7.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe erbrachten keine deutlichen Hinweise auf einen Einfluss der Phosphorylierung von MAP-Kinasen und Akt/PKB auf die unterschiedlichen Infektionsverläufe nach Infektion von Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten mit *T. gondii*. Obwohl die Voruntersuchung interessante Korrelationen zwischen der Wirtszellinfektion des Parasiten und der Phosphorylierung von p38, ERK1/2 und Akt/PKB gezeigt hatte (Abbildung 3-38), konnten die Ergebnisse in den folgenden detaillierten Infektionsuntersuchungen nicht untermauert werden (Abbildung 3-39; A-F; Abbildung 3-40; A-D).

3.8 Zelltyp-spezifische Expression von Zytokinen und Chemokinen in *T. gondii*-infizierten SkMZ und Fibroblasten

Die Immunreaktivität von mit *T. gondii* befallenen SkMZ wurde bislang wenig untersucht. Um mögliche Zelltyp- und Differenzierungsabhängige Unterschiede in der Immunantwort von SkMZ und Fibroblasten auf *T. gondii* aufzudecken, wurde die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine nach Infektion untersucht.

3.8.1 Expression von Chemokinen und Zytokinen während *T. gondii*-Infektion

Zunächst wurden terminal differenzierte C2C12-Myotuben, proliferierende C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten für 48 Stunden mit *T. gondii* infiziert und anschließend die Expressionsprofile der Zytokine IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17D, IL-23, TGF- β und TNF α sowie des Chemokins CCL-2 via RT-qPCR quantifiziert

Die in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium (HS) kultivierten und infizierten C2C12-Myotuben zeigten eine durchschnittlich deutlich erhöhte Expression von IFN- γ . Dagegen wiesen C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten eine verringerte Transkription dieses Gens nach *Toxoplasma*-Infektion auf (Abbildung 3-41; A). Während Transkripte der Gene für IL-17D (Abbildung 3-41; B) und TNF α (Abbildung 3-41; I) 48 Stunden nach Infektion in terminal differenzierten SkMZ im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen deutlich hochreguliert wurden, waren deren Transkriptmengen in infizierten und nicht-infizierten Myoblasten etwa vergleichbar. Fibroblasten hingegen wiesen eine geringe Steigerung in der IL-17D-mRNA Expression 48 Stunden nach Infektion auf. Interessanterweise waren die mRNA-Mengen von CCL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-23 in infizierten Myotuben nach *Toxoplasma*-Infektion deutlich höher als in nicht-infizierten Kontrollmyotuben (Abbildung 3-41; C-G). Ein geringer Anstieg der Expression von IFN- γ (Abbildung 3-41; A), IL-1 α (D), IL-6 (F) und IL-23 (G) wurde auch in *Toxoplasma*-

infizierten Myotuben nachgewiesen. Jedoch war die Expression von IFN- γ , CCL-2, IL-1 α , IL-1, IL-6, IL-23 und TGF- β in infizierten C2C12-Myotuben insgesamt deutlich höher als in proliferierenden C2C12-Myoblasten und Fibroblasten (Abbildung 3-41).

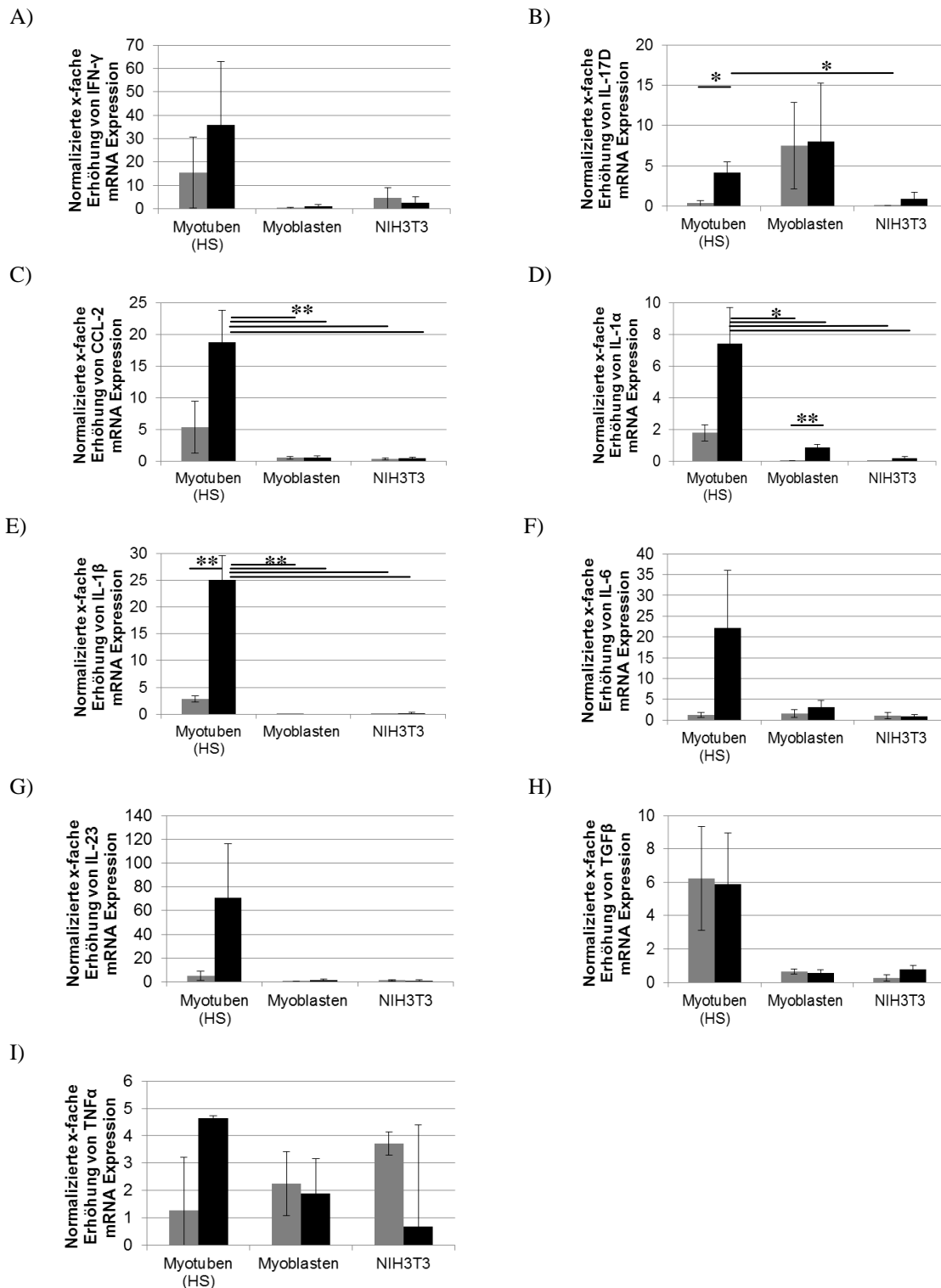


Abbildung 3-41: Bildunterschrift siehe nächste Seite

Abbildung 3-41: Bestimmung der Transkriptmengen von Chemokinen (CCL-2, C) und Zytokinen (IFN- γ (A), IL-17D (B), IL-1 α (D), IL-1 β (E), IL-6 (F), IL-23 (G), TGF- β (H) und TNF α (I)) in *T. gondii*-infizierten (schwarz) und nicht-infizierten (grau) C2C12-Myotuben, C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels RT-qPCR.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium über 168 Stunden zu Myotuben differenziert. C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten (jeweils 70×10^4) wurden 24 Stunden vor der geplanten Infektion ausgesät. Alle Zellen wurden im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 5:1 mit *T. gondii* (Stamm NTE) infiziert. Vier und 48 Stunden nach Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert, mRNA revers transkribiert und die cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR und spezifischer Primerpaare amplifiziert. Die Hochregulation der mRNA zwischen 0 und 48 Stunden wurde berechnet und anhand der Amplifikation der Wirtszell- β -Aktin-cDNA normalisiert. Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Signifikanzen: ** für $p < 0,01$.

In weiteren Versuchen wurde der zeitliche Verlauf der Expression von Chemokinen/ Zytokinen in terminal differenzierten C2C12-Myotuben nach Infektion mit *T. gondii* bestimmt. Dafür wurden C2C12-Myotuben mit *Toxoplasma* für 4, 24, 48 und 72 Stunden infiziert und Transkripte der Chemokine und Zytokine mittels RT-qPCR quantifiziert.

Wie Abbildung 3-42 zu entnehmen ist, stieg in C2C12-Myotuben der mRNA-Level aller untersuchten Moleküle im Verlauf der Infektion zum Teil sehr deutlich an. Während bereits zum Zeitpunkt von 24 Stunden der Infektion eine 4-fach höhere Expression von IFN- γ (A) und CCL-2 (C) detektiert wurde, stieg die Expression von IL-1 α -mRNA 10-fach (D) und von IL-23 (G) sogar 35-fach an. Auch für IL-6-mRNA (F) konnte ein Transkriptionsanstieg bereits nach 24 Stunden nachgewiesen werden (2,2-fach höher als zum Zeitpunkt 0). Die IL-6-mRNA stieg bis 72 Stunden nach Infektion sogar 742,6-fach gegenüber der Menge vor Infektion. Interessanterweise schien die TGF- β -Expression in C2C12-Myotuben nach der Infektion dagegen nur geringfügig und auch erst zum Zeitpunkt 48 und 72 Stunden erhöht zu sein (Abbildung 3-41; H).

3.8.2 Einfluss von Differenzierungsmedium auf die Expression von Chemokinen und Zytokinen durch *T. gondii*-infizierte SkMZ

Da C2C12-Myotuben in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium während der Infektion mit *T. gondii* kultiviert wurden, konnte die erhöhte Zytokin- bzw. Chemokinenexpression im Vergleich zu Myoblasten und Fibroblasten auf das Kulturmedium zurückzuführen sein. Um diesen wichtigen Aspekt näher zu untersuchen, wurden C2C12-Myoblasten für 168 Stunden in Differenzierungsmedium zu Myotuben differenziert. Danach wurde ein Teil der Zellen in Wachstumsmedium mit 10% FCS überführt und anschließend teilweise mit *Toxoplasma* vom Stamm NTE infiziert. Parallel wurden differenzierte Myotuben in Pferdeserum-haltigem Medium während der Infektion belassen. Nach 48 Stunden der Infektion bzw. Inkubation wurde die Expression von Chemokin/ Zytokin-

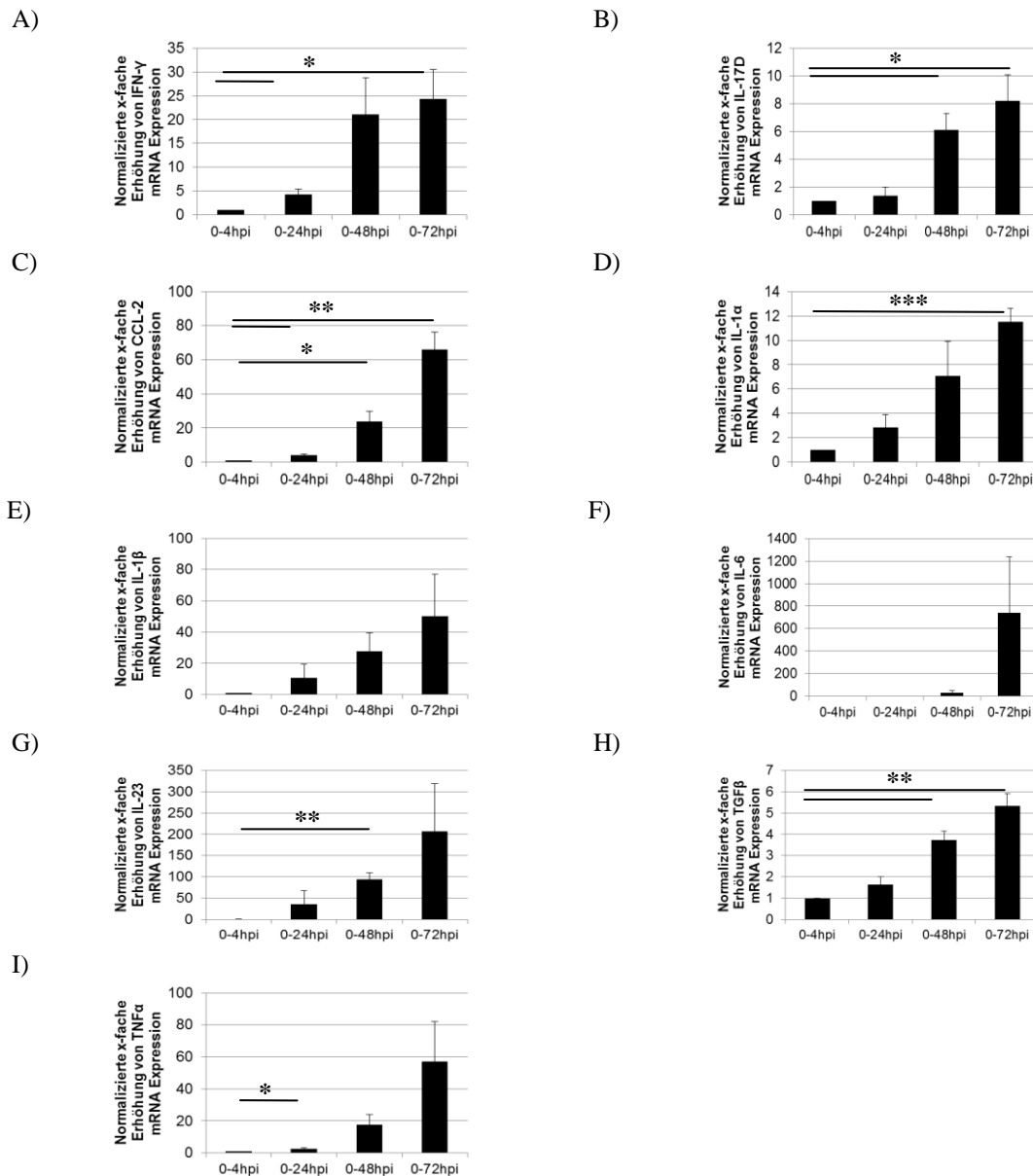


Abbildung 3-42: Bestimmung der Transkriptionstärke variabler Chemokinen (CCL-2 (C)) und Zytokinen (IFN- γ (A), IL-17D (B), IL-1 α (D), IL-1 β (E), IL-6 (F), IL-23 (G), TGF- β (H) und TNF α (I)) in *T. gondii*-infizierten C2C12-Myotuben mittels qRT-PCR.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Pferdeserum-haltigem Differenzierungsmedium über 168 Stunden zu Myotuben differenziert. Sie wurden anschließend im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 5:1 mit *T. gondii* (Stamm NTE) infiziert. Nach 0, 4, 24, 48 und 72 Stunden wurde Gesamt-RNA isoliert, mRNA revers transkribiert und die cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR und spezifischer Primerpaare amplifiziert. Die Hochregulation der mRNA zwischen 4, 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt vor Infektion (0) wurde anhand der Amplifikation der Wirtszell- β -Aktin-cDNA normalisiert. Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$.

Genen untersucht, die in den vorhergehenden Untersuchungen (Abbildung 3-41) die interessantesten Ergebnisse gezeigt hatten. Es wurden daher mRNA-Mengen für die Gene *CCL-2*, *IL-6*, *IL-1 α* , *IL-1 β* und *IL-23* mittels RT-qPCR ermittelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass terminal differenzierte Myotuben 48 Stunden nach Infektion mit *T. gondii* die Expression von *CCL-2*, *IL-6*, *IL-1 α* , *IL-1 β* und *IL-23* zum Teil deutlich hochregulierten und zwar unabhängig davon, ob Myotuben während der Infektion in Pferdeserum-haltigem Differenzierungs- oder FCS-haltigem Wachstumsmedium kultiviert waren (Abbildung 3-43). Die Daten zeigten jedoch auch, dass die Expression der genannten Zytokine/Chemokine in Myotuben, die während der Infektion oder Inkubation in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, generell deutlich höhere Transkriptmengen aufwiesen als Myotuben in FCS-haltigem Wachstumsmedium. Wurde jedoch die Hochregulation der Genexpression beider Myotubenproben vor und nach Infektion näher untersucht, konnte eine Medium-unabhängige mehrfache Expressionsteigerung dieser Gene aufgrund der *T. gondii*-Infektion nachgewiesen werden (Abbildung 3-43). Dies deutet auf eine aktive Beteiligung der Myotuben an der immunologischen Antwort gegen *Toxoplasma* im Skelettmuskel hin

3.8.3 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass differenzierte SkMZ nach *Toxoplasma*-Infektion eine Reihe von immunologisch aktiven Zytokinen/Chemokinen deutlich hochregulierten. Dabei zeigten manche inflammatorische Moleküle wie IFN- γ , IL-17D, IL-6, TGF- β 1, TNF α eine erhöhte Transkription auf Grund des Pferdeserum-haltigen Kultivierungsmedium nach der *Toxoplasma*-Infektion (Abbildung 3-41). Allerdings wiesen andere immunologisch relevante Faktoren wie *CCL-2*, *IL-6*, *IL-23*, *IL-1 α* und *IL-1 β* eine Serum-unabhängige Transkriptionserhöhung in differenzierten C2C12-Myotuben auf, die auf Grund *Toxoplasma*-Infektion auftrat (Abbildung 3-43). Dagegen wurden die Expressionen dieser Gene in den infizierten Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten gar nicht oder nur geringfügig reguliert (Abbildung 3-41). Somit wurden deutliche Unterschiede im Zytokin/Chemokin-Expressionsprofil zwischen Myotuben einerseits und proliferierenden Myoblasten bzw. Fibroblasten andererseits festgestellt.

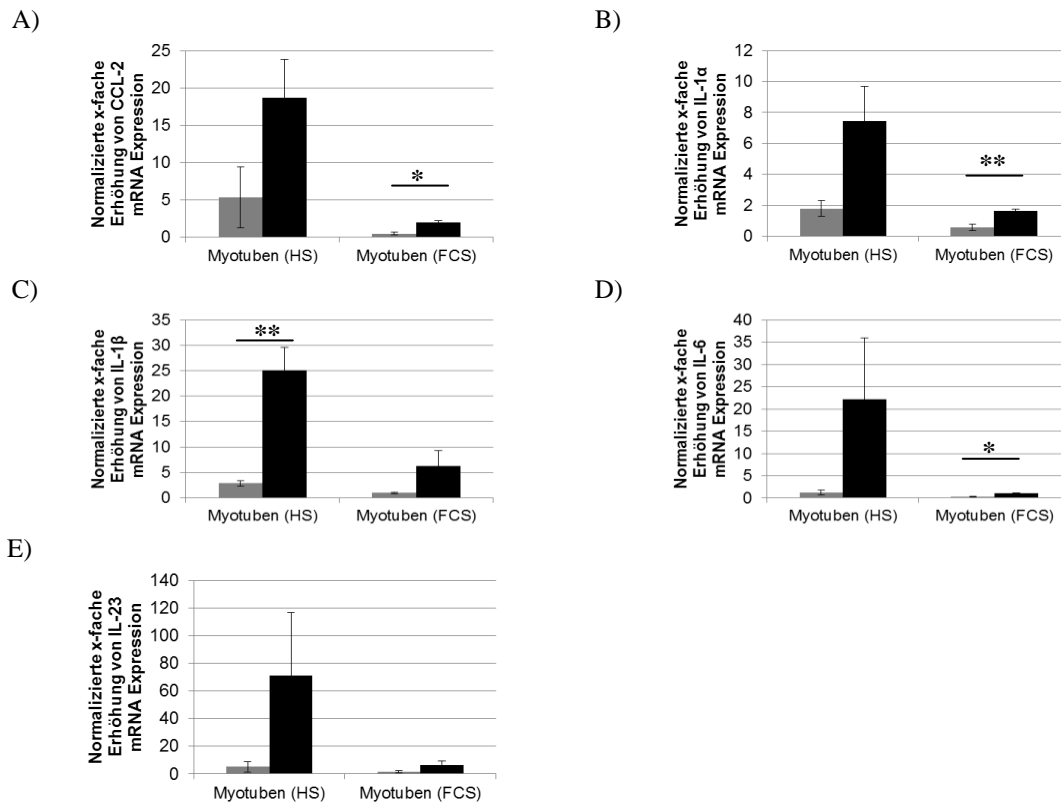


Abbildung 3-43: Einfluss von Pferdeserum (HS)- und Kälberserum (FCS)-haltigem Kulturmedium auf die Expression des Chemokins CCL-2 und der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, und IL-23 in *T. gondii*-infizierten (schwarz) und nicht-infizierten (grau) C2C12-Myotuben.

C2C12-Myoblasten (10×10^4) wurden in Pferdeserum-haltigem Kulturmedium über 168 Stunden zu Myotuben differenziert. Anschließend wurde ein Teil der Myotuben in Kälberserum-haltiges Medium (10% FCS) überführt, während die restlichen Zellen im Differenzierungsmedium (2% HS) kultiviert wurden. Alle Zellen wurden im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 5:1 mit *T. gondii* (Stamm NTE) infiziert. Null und 48 Stunden nach Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert, mRNA revers transkribiert und die cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR und spezifischer Primerpaare amplifiziert. Die Hochregulation der mRNA zwischen 0 und 48 Stunden wurde berechnet und anhand der Amplifikation der Wirtszell- β -Aktin-cDNA normalisiert. Werte stellen Mittelwerte und Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Signifikanzen: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$.

4 Diskussion

4.1 *Toxoplasma gondii* in SkMZ - Analyse einer langlebigen Beziehung

Toxoplasma gondii stellt einen der bestuntersuchten Parasiten des Phylums der Apicomplexa dar, der imstande ist, nahezu jede kernhaltige Zelle des Körpers zu infizieren [Dubey et al., 1998]. Während Makrophagen [Da Gama et al., 2004], Monozyten [Courret et al., 2006] und Dendritische Zellen [Lambert et al., 2006] eine schnelle Ausbreitung des Parasiten innerhalb des Wirts gewährleisten, bieten terminal differenzierte Zelltypen wie Neuronen und Muskelzellen (insbesondere solche von Skelettmuskeln) aus bisher unbekanntem Grund ein hervorragendes Milieu für eine dauerhafte Persistenz im Zwischenwirt [Swierzy et al., 2013; Ferreira da Silva et al., 2009a; 2009b; Lüder et al., 1999].

Während infizierte Kleinnager (z.B. Mäuse) den Endwirten (Katzenartige) leicht zum Opfer fallen und in ihnen persistierende Toxoplasmen die sexuelle Vermehrung einleiten können, stellt die Aufnahme von mit Zysten kontaminiertem Fleisch von chronisch infizierten Zwischenwirten wie Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel und Rind eine potentielle Infektionsgefahr für den Menschen dar. Der Anteil der konnatalen Toxoplasmosefälle aufgrund des Verzehrs von Zysten-haltigem rohem oder ungenügend gegartem oder geräuchertem Fleisch wurde auf 30 bis 63% geschätzt [Cook et al., 2000]. Dies veranschaulicht die Bedeutung der Skelettmuskeln für die Übertragung von *Toxoplasma* auf den Menschen. Zudem differenziert *Toxoplasma gondii* innerhalb differenzierter SkMZ in Abwesenheit externer Stressfaktoren spontan vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten [Ferreira da Silva et al., 2008]. Die Charakterisierung der molekularen, Skelettmuskel-spezifischen Faktoren, die die *Toxoplasma*-Entwicklung und -Persistenz in diesem zellulären Kompartiment regulieren, ist daher von großer Bedeutung.

Da Untersuchungen der für die *Toxoplasma*-Übertragung auf den Menschen relevanten Nutztiere *in vivo* zeitlich und finanziell sehr anspruchsvoll sind, wurden Muskel-spezifische Faktoren der Parasitenentwicklung in der murinen C2C12-Zelllinie *in vitro* durchgeführt.

4.2 Das C2C12-SkMZ – Modell zur Analyse der *T. gondii* - Infektion *in vitro*

Die C2C12-Zelllinie ist als ein hervorragendes Modell für Analysen der terminalen Myogenese in vielen Experimenten zum Einsatz gekommen [Rajan et al., 2012; Casadei et al., 2009; Kislinger et al., 2005; Tannu et al., 2004; Burattini et al., 2004].

Es wurde erst kürzlich gezeigt, dass C2C12-Zellen die transkriptionellen und morphologischen Änderungen, die bei terminaler Skelettmuskel-Differenzierung *in vivo* ablaufen, sehr gut nachahmen [Rajan et al., 2012].

C2C12-Myoblasten können auf unterschiedliche Weise zur terminalen Differenzierung stimuliert werden. Zum einen können sie mit einem serumreduzierten Kulturmedium (2% Pferdeserum) inkubiert werden. Ebenfalls möglich ist die Induktion der Myotubenbildung mittels einer erhöhten Zelldichte (mind. 80% Konfluenz) [Rajan et al., 2012]. Beide Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

Die terminale Muskeldifferenzierung ist ein äußerst komplexer Prozess, der mit Veränderungen in der Expression von über 1500 Genen einhergeht, wobei circa 40% dieser Gene eine unbekannte Funktion besitzen [Delgado et al., 2003]. Die Muskeldifferenzierung wird weitestgehend auf transkriptioneller Ebene reguliert [Rajan et al., 2012].

Takács et al. [2012] hatten bereits die Differenzierungseffizienz der C2C12-Myoblasten verifiziert. Es wurde gezeigt, dass die Expression von essentiellen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren wie MyoD während der myogenen Differenzierung stiegen, obwohl auf Proteinebene ein leichtes Absinken im Laufe der Myotubenformation beobachtet wurde. Ebenso konnte eine Steigerung von Myogenin auf Transkript- und Translationsebene ermittelt werden, das wichtige Funktionen vor allem im Laufe der Myotubenformation ausübt. Trotz geringer Unterschiede in der Kinetik, konnten diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Das Plateau der Transkription der Gene *MyoD* und *Myogenin* wurde zum Zeitpunkt von 96 Stunden der Differenzierung erreicht. Während die MyoD-Menge auf Protein-Ebene bereits nach 48 Stunden abnahm, stieg Myogenin stabil binnen der darauf folgenden 192 Stunden an. Bemerkenswert ist die Zunahme der MyHC-Expression (inklusive der Translation) während der myogenen Zytoplasmafusion. Erste MyHC- (und Desmin-) positive-C2C12-Zellen waren bereits 48 Stunden nach Differenzierungsstart in Pferdeserumhaltigem Medium festzustellen und die MyHC-Expression stieg danach stetig und deutlich weiter an.

Zusätzlich zu den Arbeiten von Takács et al. [2012] konnte in dieser Arbeit eine effiziente Differenzierung der C2C12-Myoblasten aufgrund erhöhter Zelldichte mittels MyHC-Fluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 3-31). Ein enger Zell-Zell-Kontakt stimulierte die C2C12-Myoblasten bereits nach 48 Stunden der Proliferation zu starker MyHC-Expression.

Obwohl Yoshida et al. [1998] berichteten, dass 50% der C2C12-Myoblasten zu Myotuben differenzieren, wurde die prozentuale Häufigkeit der Myoblastenumwandlung in den vorliegenden Versuchen nicht bestimmt. Es konnte jedoch auch in dieser Arbeit wie in vorherigen Arbeiten keine 100%ige Differenzierungsrate der C2C12-Zelllinie erreicht werden [Rajan et al., 2012; Casadei et al., 2009; Kislinger et al., 2005; Tannu et al., 2004]. Zum einen proliferieren viele Myoblasten bei paralleler terminaler Differenzierung in Anwesenheit von Pferdeserum weiter, zum anderen sind C2C12-SkMZ als heterogene Zellpopulation charakterisiert [Burattini et al., 2004; Yoshida et al., 1998]. Während differenzierte Synzytien meist eine ausgeprägte dreidimensionale Struktur annehmen, bleiben undifferenzierte, womöglich im Ruhezustand verbliebene C2C12-Myoblasten meist auf dem Boden des Zellkulturgefäßes adhäriert [Burattini et al., 2004]. Eine wichtige Frage ist, ob diese undifferenzierten C2C12-Zellen tatsächlich Zellzyklus-arretiert sind oder weiter proliferieren.

Die mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) markierten Zellkerne (Abschnitt 3.1.4) in differenzierten C2C12-Zellproben zeigten, dass die meist unterhalb der BrdU-negativen Myotuben liegenden Myoblasten keinen postmitotischen Zustand wie die klassischen MyHC-/ Desmin-positiven C2C12-Myotuben aufwiesen. Stattdessen wurde der BrdU-Marker deutlich in neu synthetisierte DNA dieser undifferenzierten Zellen eingebaut (Abschnitt 3.1.4). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Yoshida et al. [1998]. Darüber hinaus berichteten Rajan et al. [2012] von einer Abnahme der BrdU-Einbaurrate von 55 auf 3% innerhalb der ersten 48 Stunden der terminalen Differenzierung. Eine solch große Abnahme wurde allerdings nur bei der Kombination zweier Stimulatoren, nämlich Pferdeserumhaltigem Differenzierungsmedium und hoher Zelldichte, erreicht.

C2C12-SkMZ stellen eine dynamische Zelllinie dar. Sie differenzieren *in vitro* zwar nicht vollständig zu Myotuben (Synzytien), bilden jedoch, wenn die Myoblasten nur wenigen *in vitro*-Passagen ausgesetzt werden, polynukleäre Synzytien, die der Vorstufe von Myofibrillen *in vivo* ideal entsprechen. Die Expressionsprofile der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin sowie des Myosin Heavy Chain-Markers

wiesen auf gut ausdifferenzierte Myotuben in unseren Untersuchungen hin. C2C12-Myotuben sind daher ein geeignetes Model zum Beispiel für *Toxoplasma*-Infektionsversuche *in vitro*.

4.3 Zelltyp- und Muskeldifferenzierungs-bedingte Unterschiede in der *T. gondii*- Stadienkonversion bzw. Replikation

4.3.1 Stadiendifferenzierung von *T. gondii* in SkMZ

Dass Skelettmuskelgewebe *in vivo* von *Toxoplasma gondii* zur Persistenz aus bisher unbekanntem Grund bevorzugt wird (Gewebetropismus), wurde bereits in den späten 50er und 60er Jahren beobachtet [Jacobs, 1967; Katsube et al., 1967; Siim & Nissen, 1958]. Eine erste Untersuchung zur Klärung der *Toxoplasma*-Entwicklung in diesem zellulären Kompartiment stammt aus dem Jahr 1977 [Dvorak & Howe, 1977]. Dagegen wurden genauere molekulare Analysen erst im Jahr 1999 durchgeführt [Andrade et al., 1999]. Da die orale Aufnahme von ungenügend gegartem und mit Zysten kontaminiertem Fleisch durch den Menschen für bis zu 63% der Toxoplasmosefälle verantwortlich ist [Cook et al., 2000], muss dringend geklärt werden, aus welchen Gründen die fleischbedingte Übertragung der Toxoplasmose so effizient ist.

Dass *Toxoplasma* eine Zelltyp- (Muskel-) bedingte Bradyzoitenentwicklung aufweist, wurde bereits gezeigt [Takács et al., 2012; Ferreira da Silva et al., 2009b]. In dieser Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal nachgewiesen, dass der Differenzierungsgrad von SkMZ den zentralen Regulator für Unterschiede in der Bradyzoitenentwicklung zwischen unterschiedlichen Zelltypen darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Toxoplasmen in ausdifferenzierten C2C12-Synzytien im Vergleich zu Myoblasten eine erhöhte Bradyzoitenbildung über 96 Stunden der Infektion aufwiesen. Dies konnte zum einen mittels der mRNA-Mengen von bradyzoitenspezifischen Antigen-1 (BAG1) und Enolase 1 (ENO1) quantifiziert werden (Abschnitt 3.2.1.1). Es zeigte sich, dass die BAG1- im Vergleich zur ENO1-Expression im Verlauf der Infektion stärker anstieg. Dies könnte zum einen mit den BAG1-Primern zusammen hängen, die an die komplementäre Sequenz der cDNA gebunden haben. Zum anderen wird BAG1 bereits in der Frühphase der Bradyzoitendifferenzierung exprimiert und stellt somit einen Marker des frühen Tachyzoiten-Bradyzoiten-Stadiumwechsels unter Stresskonditionen *in vitro* dar [Weiss & Kim, 2000]. Da in der vorliegenden Arbeit eine permanente SkMZ-Linie (C2C12) angewendet wurde, können exogene Stressfaktoren wie sie möglicherweise im Fall primärer embryonaler SkMZ aufgrund der Kulturbedingungen auftreten können, weitgehend ausgeschlossen werden. Somit konnte erstmalig eine

zunehmende spontane Bradyzoitenbildung in C2C12-Myotuben *in vitro* aufgrund des Differenzierungsstatus der Myotuben bewiesen werden.

T. gondii zeigte auch in undifferenzierten Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten eine Expression der Gene *BAG1* und *ENO1*. Die Expression war im Vergleich zu den infizierten C2C12-Myotuben jedoch auf die Hälfte reduziert. Außerdem zeigte dies, dass der in dieser Arbeit verwendete *Toxoplasma gondii*-Stamm NTE - trotz zahlreicher Passagen - die Fähigkeit zur Differenzierung zu Bradyzoiten nicht verloren hatte [Weiss & Kim, 2000].

Nicht veröffentlichte Analysen unserer Arbeitsgruppe (B.Sc. Anja Abelmann) zeigten interessante Ergebnisse zur Differenzierung von anderen *Toxoplasma*-Stämmen in SkMZ. So wiesen auch die kanonischen (RH (Genotyp I), ME49 (II), NED (III)) und nicht-kanonischen *T. gondii*-Stämmen (B136/1 B6H6, B136/2 C12, K119/2-2C10, K119/2 A7) [Herrmann et al., 2012] in C2C12-SkMZ zum Zeitpunkt 96 Stunden post infectionem meist eine höhere *ENO1*-Expression in Myotuben im Vergleich zu Myoblasten auf. Lediglich der Stamm RH und K119/2-2C10 zeigten eine leicht erhöhte (RH) bzw. vergleichbare (K119/2-2C10) *ENO-1*-Transkription in Myoblasten im Vergleich zu Myotuben [Abelmann, 2013].

Die spontane und von externen Stressfaktoren unabhängige Bradyzoitenbildung von Parasiten des schnell replizierenden RH-Stammes in C2C12-Myotuben bewies, dass sogar mausvirulente *Toxoplasma*-Stämme auf Myotuben-spezifische Faktoren mit Stadiendifferenzierung reagieren. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von Ferreira da Silva et al. [2009a] in primären differenzierten SkMZ beobachtet.

Die Bradyzoitenbildung wird von der Bildung einer Zystenmatrix begleitet. Die Zystenwand und die Matrix verhindern eine Ruptur der Wirtszelle und schützen den Parasiten vor Umgebungsveränderungen und möglicherweise Reaktionen des Immunsystems [Weiss & Kim, 2000]. Zur Verifizierung der höheren *BAG1*- und *ENO1*-Expression in infizierten C2C12-Myotuben wurden daher auch *Toxoplasma*-Gewebezysten mittels *Dolichos biflorans*-Lektin (DBL) markiert. Das Lektin weist eine spezifische Affinität zu Polysacchariden auf, die in dem 116 kD Glykoprotein CST1 von *T. gondii* vorkommen [Zhang et al., 2001]. Zwar wurden *Toxoplasma*-Zysten in Myotuben, Myoblasten und Fibroblasten bereits 48 Stunden nach Infektion nachgewiesen, jedoch wurde eine deutlich größere Menge an Zysten in infizierten C2C12-Myotuben detektiert.

Parallel zum Zystennachweis wurde die gesamte *Toxoplasma*-Population mit polyklonalem Antiserum fluoreszenzmarkiert. Das Serum erkannte dabei sowohl Tachyzoiten- als auch Bradyzoiten-spezifische Proteine. Da die ersten Lektin-positiven Zysten bereits 48 Stunden

post infectionem besonders in infizierten C2C12-Myotuben detektiert wurden (Abschnitt 3.2.1.2), und die darin enthaltenen Parasiten mit dem Antiserum reagierten, beherbergten sie vermutlich heterogene Zwischenstadien der *Toxoplasma*-Differenzierung. Dafür spricht die von uns ermittelte 5-fache Steigerung der BAG1-Expression zu diesem Zeitpunkt der Infektion (Abschnitt 3.2.1.1) sowie die Tatsache, dass Parasiten vom Stamm NTE eine asynchrone Differenzierung aufweisen [Bohne et al., 1993a].

Ein entwicklungsbiologisch heterogener *T. gondii*-Zysteninhalt wurde innerhalb ausdifferenzierter C2C12-Synzytien bereits von Takács et al. [2012] anhand der Färbung mit CC2-(Bradyzoiten) und polyklonalem Serum (Tachyzoiten/Bradyzoiten)-Färbung nachgewiesen. Dieselbe Markierung zum Nachweis der *Toxoplasma*-Differenzierung wurde sogar zu einem früheren Zeitpunkt (24 Stunden nach Infektion) in L6.C10-SkMZ der Ratte [Ferreira da Silva et al., 2008] und in primären SkMZ der Maus [Ferreira da Silva et al., 2009b] *in vitro* erfolgreich gezeigt. Unsere genomweite Transkriptomanalyse hat ebenfalls eine BAG1-Expression von *Toxoplasma* 24 Stunden post infectionem in terminal differenzierten C2C12-Myotuben und Neuronen im Vergleich zu Astrozyten und NIH3T3-Fibroblasten nachgewiesen. Dagegen wurden die parasitären ENO1-Transkripte zu diesem Zeitpunkt ausschließlich in infizierten Neuronen detektiert.

Der Nachweis von ENO1-mRNA mittels Reverse Transkriptase-qPCR wurde dagegen erst nach 48 Stunden der *Toxoplasma*-Zugabe durchgeführt und erwies sich sehr wohl in den infizierten C2C12-Myotuben als positiv (Abschnitt 3.2.1.1).

Generell verläuft die Zystenbildung unter *in vitro*-Bedingungen im Vergleich zu *in vivo*-Untersuchungen schneller [Dubey et al., 1998]. Während bis zur Zystendetektion *in vivo* in der Regel mehrere Wochen vergehen, wurde im Rahmen dieser Versuche eine schnelle (48 Stunden) und in Abwesenheit externer Stressfaktoren stattfindende *Toxoplasma*-Tachyzoitentransition zu jungen Bradyzoiten innerhalb infizierter Myotuben detektiert. Dieser Effekt konnte auch von Guimarães et al. [2008; 2009] nach Infektion von SkMZ mit *T. gondii* vom Stamm ME49 beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein positiver Einfluss der Skelettmuskeldifferenzierung auf die Bradyzoiten- und folglich die Zystenentwicklung nachgewiesen werden konnte. Dies könnte erklären, warum *T. gondii* Gewebezysten vornehmlich in Skelettmuskelzellen und Neuronen *in vivo* nachgewiesen werden. Da beide Zelltypen einen postmitotischen, zellzyklus-arretierten Charakter aufweisen, könnten hier variable, die terminale Differenzierung regulierende Faktoren eine Hauptrolle spielen.

4.3.2 Replikation von *T. gondii* in SkMZ

Bohne et al. [1994] zeigten, dass eine reduzierte *Toxoplasma*-Replikation (Stamm NTE) in IFN- γ -stimulierten murinen Knochenmarksmakrophagen von einer erhöhten Bradyzoitenbildung begleitet wird. Dieser Effekt wurde dagegen in peritonealen Makrophagen nicht beobachtet [Bohne et al., 1993b]. Interessanterweise wiesen IFN- γ -stimulierte ausdifferenzierte C2C12-Myotuben ebenfalls keine erhöhte Bradyzoitenbildung im Vergleich zu nicht-aktivierten C2C12-Myotuben auf [Takács et al., 2012].

Aufgrund der verstärkten Zystenbildung in *Toxoplasma*-infizierten differenzierten C2C12-Synzytien wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Replikationsrate des Parasiten mit dem Differenzierungsstatus der SkMZ korrelierte.

Zu diesem Zweck wurde die Infektionsintensität in C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mittels qPCR und Immunfluoreszenz analysiert (Abschnitt 3.2.2). Interessanterweise konnte zum ersten Mal eine reduzierte *Toxoplasma*-Replikation in C2C12-Myotuben im Vergleich zu Myoblasten und Fibroblasten festgestellt werden. Dabei wurde ein parasitäres repetitives DNA-Element (529bp) quantifiziert, welches etwa 200 bis 300 Mal im *T. gondii*-Genom vorkommt [Homan et al., 2000]. Da die genaue Anzahl an Kopien dieses Elementes in unterschiedlichen *Toxoplasma*-Stämmen und Entwicklungsstadien variieren könnte, sind Unterschiede zwischen den Stämmen in der Parasitenquantifizierung nicht auszuschließen [Homan et al., 2000]. Dies wurde beispielweise in unserer Arbeitsgruppe bei Untersuchungen zur Parasitenreplikation unterschiedlicher *Toxoplasma*-Stämme in SkMZ beobachtet: verschiedene kanonische und nicht-kanonische *Toxoplasma*-Stämme wiesen während einer 72-stündigen Infektion unterschiedliche und muskeldifferenzierungs-unabhängige Replikationsintensitäten in C2C12-Myotuben und Myoblasten auf [Abelmann, 2013].

Obwohl die größten, hier mittels qPCR ermittelten Unterschiede in der *Toxoplasma*-Replikation erst 72 Stunden post infectionem beobachtet wurden, konnte die parasitäre Entwicklung in Myotuben zu einem früheren Infektionszeitpunkt mit Hilfe mikroskopischer Analysen genauer nachverfolgt werden. Dabei hemmten Myotuben bereits innerhalb von 48 Stunden der Infektion die *Toxoplasma* NTE-Replikation im Vergleich zu Myoblasten. C2C12-Myotuben stellen, wie bereits erwähnt, eine heterogene Population dar [Burattini et al., 2004; Yoshida et al., 1998]. Zwischen den zahlreichen, polykernigen Synzytien lagen daher auch einkernige, undifferenzierte C2C12-Zellen, die in der Regel größere PV beherbergten, sodass in einer Probe Muskeldifferenzierungs- und zugleich Zelltyp-bedingte

Unterschiede im *Toxoplasma*-Wachstum verfolgt werden konnten. Der Einfluß auf die Parasitenreplikation wurde auch anhand der Größe von PV in den C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten sichtbar (Abschnitt 3.2.2.2). Bislang zeigten nur Gomes et al. [2011] eine stärkere und Muskeldifferenzierungsbedingte Replikation von RH-Tachyzoiten (Genotyp I) in primären undifferenzierten im Vergleich zu differenzierten SkMZ. Interessante Beobachtungen zur Zelltyp-bedingten *Toxoplasma*-Replikation stammen von Dvorak & Howe [1977]. Sie haben bereits 1977 die Invasion von bovinen embryonalen SkMZ (BESM) durch *Toxoplasma* (Stamm RH) untersucht. Interessanterweise beeinflusste das Alter der BESM-Zellen direkt die Invasionsfähigkeit der Parasiten. Ältere BESM-Zellen waren refraktärer gegenüber der Invasion als jüngere Zellen. Darüber hinaus betrug die mittlere Verdopplungszeit der RH-Tachyzoiten in BSME-Zellen 10,9 Stunden, während sie in HFF-Zellen (humane Fibroblasten) nur 8,3 Stunden betrug [Dvorak & Howe, 1979].

Takács et al. [2012] wiesen auf Zelltyp-bedingte *Toxoplasma*-Wachstumsunterschiede zwischen differenzierten primären SkMZ, differenzierten permanenten C2C12-Myotuben und NIH3T3-Fibroblasten hin. Der größte Unterschied im Parasitenwachstum wurde dabei zwischen primären SkMZ und NIH3T3-Zellen ermittelt. Dies lässt darauf schließen, dass primäre SkMZ, die das *in vivo*-System besser imitieren dürften, zum einen die Bradyzoitenbildung positiv und zum anderen die parasitäre Replikation negativ beeinflussen. Dagegen wiesen die C2C12-Myotuben lediglich eine Tendenz, jedoch keinen signifikanten Rückgang bezüglich der *Toxoplasma*-Replikation im Vergleich zu NIH3T3-Fibroblasten auf [Takács et al., 2012]. Dass primäre und permanente SkMZ unterschiedliche Befunde ergeben können, wurde von Barbosa [1999] anhand von *T. cruzi*-Infektionsversuchen gezeigt.

Einen potentiellen inhibierenden Einfluss des Pferdeserums auf das *Toxoplasma*-Wachstum in den differenzierten C2C12-Myotuben konnte anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.3), da die Ergebnisse der verminderten Parasitenreplikation in differenzierten SKMZ in FCS-haltigem Medium bestätigt wurden.

Zum ersten Mal überhaupt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad von SkMZ und *Toxoplasma*-Infektion genauer beschrieben. Der terminal differenzierte Status von C2C12-Zellen *in vitro* und von primären SkMZ *ex vivo* übt eine deutliche positive Wirkung auf die parasitäre Differenzierung aus. Allerdings könnten primäre SkMZ einen stärker reduzierenden Effekt auf die *T. gondii*-Replikation aufweisen als C2C12-Myotuben. Da die *Toxoplasma*-Infektion von Menschen häufig von mit Zysten

kontaminierten differenzierten SkMZ ausgeht, könnten demnach Myotuben-spezifische Faktoren die *Toxoplasma*-Entwicklung in diesen zellulären Kompartimenten regulieren.

4.4 Analyse Zelltyp-spezifischer *T. gondii*-Wirtszell-Interaktionen mittels genomweiter Transkriptomanalysen

Zwischen Neuronen bzw. Muskelzellen (Skelettmuskel, Herzmyozyten, Augenmuskel) und *Toxoplasma gondii* herrscht *in vivo* eine besondere Beziehung [Dubey et al., 1998]. Obwohl beide Zelltypen einen postmitotischen Charakter aufweisen, der mit einem irreversiblen Zellzyklusaustritt einhergeht [Campisi & Fagagna, 2007] und beide die Persistenz von *T. gondii* besonders unterstützen, wurde bisher nicht nach molekularen Korrelaten mithilfe von genomweiten Analysen gesucht. Bisher wurden HFF-Zellen [Molestina et al., 2008; Nelson et al., 2008; Kim et al., 2007; Gail et al., 2001; Blader et al., 2001], HeLa-Zellen [Moser et al., 2013], humane Dendritische Zellen und Makrophagen [Chaussabel et al., 2003], Müllersche Zellen [Knight et al., 2006], humane neuroepitheliale Zellen [Xiao et al., 2011], murine Makrophagen [Lang et al., 2012] und murine vaskuläre Endothelialzellen der Retina [Knight et al., 2005] hinsichtlich ihrer umfangreichen Veränderungen in Proteom und/oder Transkriptom nach Infektion mit *Toxoplasma in vitro* analysiert. Zusätzlich wurde kürzlich RH- und ME49-infiziertes murines Gehirngewebe und periphere Lymphozyten mittels genomweiter Microarray-Analysen *in vivo* untersucht [Jia et al., 2013].

Zum ersten Mal überhaupt wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genomweite Transkriptomanalyse von Zelltyp-spezifischen Faktoren, die sich auf mRNA-Ebene nach *Toxoplasma*-Infektion in primären terminal differenzierten Neuronen und permanenten terminal differenzierten SkMZ zugleich signifikant verändern, angewandt. Als Kontrollzellen wurden permanente murine NIH3T3-Fibroblasten und fetale murine Astrozyten in die Untersuchungen einbezogen, die zwar differenziert sind, aber weiterhin aktiv proliferieren.

Bei den Analysen wurden drei Aspekte genauer untersucht. Zum Ersten wurde nach Ähnlichkeiten/ Unterschieden im Transkriptom der vier Zelltypen vor *Toxoplasma*-Infektion gesucht. Zum Zweiten sollten potentielle Übereinstimmungen bzw. Änderungen nach *Toxoplasma*-Infektion zwischen den Zelltypen ermittelt und zum Dritten zugleich die Genexpression des Parasiten verfolgt werden.

4.4.1 Zelltyp-bedingte Expression von Zellzyklusregulatoren nicht-infizierter Zellen

Trotz zahlreicher, statistisch signifikant unterschiedlich exprimierter Gene zwischen den vier Zelltypen wurden nur drei größere Gencluster identifiziert, deren Gene in nicht-infizierten SkMZ und Neuronen ein anderes Expressionsmuster aufwiesen als in Astrozyten und Fibroblasten (Abbildung 3-19). Interessanterweise gehörten dem Cluster 1 unterschiedliche Zellzyklusregulatoren an, die den proliferativen und metabolisch aktiven Charakter von Astrozyten und Fibroblasten charakterisierten [Campisi & Fagagna, 2007]. Dass NIH3T3-Fibroblasten sich aktiv teilen und dementsprechend DNA replizieren, wurde in dieser Arbeit zusätzlich mittels BrdU-Einbau nachgewiesen (Abschnitt 3.1.4). Der Zellzyklus von primären Astrozyten wird wie der von Fibroblasten durch verschiedene Proteine wie Cycline, Cdk's oder cyclinabhängige-Kinaseinhibitoren reguliert [Pedram et al., 1998], die interessanterweise in keinem der Genclustern nachgewiesen wurden. Wurden jedoch die Expressionswerte der oben erwähnten Cycline, Cdk's, cyclinabhängigen-Kinaseinhibitoren und anderer willkürlich ausgesuchter Zellzyklusregulatoren überprüft (Tabelle 20), wiesen sie eine geringere Transkription in den postmitotischen Zellen (SkMZ, Neuronen) auf. Dazu gehörten beispielweise viele Cycline und fast alle Mini-Chromosome-Maintenance (Mcm)-Transkripte. Degegen wiesen die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und Cdk-Inhibitoren eine zwar Zelltyp- und Ursprung-spezifische, jedoch differenzierungsunabhängige Expression auf. Obwohl viele Zellzyklusregulatoren auf der mRNA-Ebene moduliert werden, werden andere Regulatoren auf Proteinebene durch posttranslationale Modifikationen moduliert. Dies könnte erklären, dass die mRNA-Mengen der Cdk's und Cdk-Inhibitoren sich nicht in Abhängigkeit der Zelldifferenzierung zwischen Neuronen und SkMZ einerseits bzw. Astrozyten und Fibroblasten andererseits unterscheiden.

Zum anderen sind auch Unterschiede im Expressionmuster von Zellzyklusregulatoren zwischen Neuronen und SkMZ wahrscheinlich. Beispielsweise wies der p21-Zellzyklusinhibitor (Kip/Cip-Proteinfamilie) in SkMZ einen RPKM-Wert von 702 und in Neuronen einen RPKM-Wert von 29,44 auf. Trotz dieser Unterschiede weisen beide Zelltypen einen irreversiblen Zellzyklusarrest auf. Der p21-Inhibitor fungiert als einer der wichtigsten Vermittler der terminalen Differenzierung überhaupt. Womöglich ist für die Myoblastenfusion eine höhere Menge an p21 erforderlich als dies für die Neuronendifferenzierung der Fall ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Zellzyklusinhibitor p27 in kortikalen Vorläuferzellen und Neuronen eine dominante Rolle gegenüber dem p21-Inhibitor spielt [Nguyen et al., 2006]. Der p27-Inhibitor vermittelt dabei

auch eine Mikrotubulipolymerisation, die für die Migration der Neuronen von großer Bedeutung ist [Godin et al., 2012].

Zusammenfassend konnten nicht nur zelltyp-spezifische Unterschiede in der Transkription vieler Gene zwischen SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten festgestellt werden, sondern es konnten auch Gemeinsamkeiten zwischen Neuronen und SkMZ erfasst werden, die u. a. den postmitotischen Charakter dieser im Vergleich zu Astrozyten und Fibroblasten widerspiegelte.

4.4.2 Zelltyp-bedingte Regulation von Zellzyklusregulatoren nach *T. gondii* - Infektion

Wurden die Transkriptome aller infizierten und nicht-infizierten Zellen in Form von Heat-Maps und eines Dendrogramms verglichen (Abschnitt 3.4.2.5), zeigte sich, dass Fibroblasten und SkMZ einerseits bzw. Astrozyten und Neuronen andererseits jeweils ein ähnlicheres Expressionsprofil aufwiesen und zwar unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii*. Somit übte die Zelltyp- und Ursprung-spezifische Genexpression einen größeren Einfluss auf das Gesamttranskriptom aus als eine Infektion mit *T. gondii*. Infolgedessen konnten nur wenige Gemeinsamkeiten im Transkriptom dem Differenzierungsstatus der SkMZ und Neuronen zugeordnet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Stadienkonversion von *Toxoplasma* in SkMZ und Neuronen weniger vom globalen Genexpressionsprofil beeinflusst wird als ursprünglich angenommen. Stattdessen könnten spezifische Transkripte oder andere physiologische Eigenschaften, wie z.B. das Metabolom oder freigesetzte Zytokine/Chemokine, die Stadienkonversion von *T. gondii* in diesen Zellen regulieren.

Eine Gruppierung der nach Infektion differentiell exprimierten Gene in funktionelle biologische Gruppen mittels DAVID-Analysesoftware zeigte allerdings eine auffällige Häufung von Genen/Transkripten, die ausschließlich in infizierten C2C12-Myotuben und Neuronen hochreguliert waren und die für Zellzyklus-regulierende Proteine kodierten (Tabelle 23). Dieser Befund könnte bedeuten, dass entweder eine Inhibierung der Zellzyklusprogression in SkMZ und Neuronen von besonderer Bedeutung für die Parasitenentwicklung ist oder dass *Toxoplasma* zur De-Differenzierung von SkMZ und Neuronen führt und dadurch die weitere Parasitenentwicklung fördert.

Während in SkMZ 88 Zellzyklusregulatoren nach Infektion differentiell exprimiert wurden, belief sich ihre Anzahl in infizierten Neuronen auf lediglich 9. Trotz dieser geringeren Anzahl in Neuronen war die Übereinstimmung in der Regulation einzelner Zellzyklusregulatoren in infizierten Neuronen und SkMZ deutlich. Außerdem waren in infizierten Neuronen viele der

in SkMZ mehr als zweifach hochregulierten Gene in infizierten Neuronen ebenfalls statistisch signifikant erhöht. Da deren Transkriptionszunahme nach Infektion jedoch nur zwischen 1,33-fach und 1,99-fach betrug, waren sie aufgrund zuvor festgelegter Kriterien (mindestens 2-fache Regulation) von der DAVID-Analyse ausgeschlossen. Es zeigte sich also, dass *Toxoplasma* eine, wenn auch leichte, Transkriptionsteigerung einer Vielzahl von Zellzyklusregulatoren auch in Neuronen bewirkte. In den Untersuchungen von Jia et al. [2013] führte eine Infektion mit *T. gondii* (Stamm ME49) ebenfalls zu einer starken Hochregulation von Zellzyklusregulatoren in Gehirngewebe von BALB/c-Mäusen *in vivo*.

Interessanterweise kodierten Zweidrittel der in SkMZ nach Infektion hochregulierten Gene die M-Phase-Regulatoren, die den Kinetochoraufbau, die Chromosomenverteilung und auch die Organellenverteilung auf die Schwesterzellen vermitteln (Tabelle 24). Die restlichen Gene kodierten für solche Proteine, die besonders in der S-Phase aktiv sind oder die andere Phasen des Zellzyklus direkt oder indirekt regulieren.

Bislang lagen keine Untersuchungen zur Wirkung von *T. gondii* auf Zellzyklusregulatoren in Myoblasten versus Myotuben vor. Es ist jedoch aus anderen Zellsystemen bekannt, dass *Toxoplasma* die Transkription, die Translation oder die posttranslationale Modifikation von Genen/Proteinen moduliert [Nelson et al., 2008; Molestina et al., 2008; Molestina & Sinai, 2005; Blader et al., 2001]. Zum Teil umfassten diese Gene auch Signalwege, die an Zellproliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen beteiligt sind [Blader et al., 2001]. Zur Wirkung anderer Parasiten auf die terminale Differenzierung von SkMZ liegen ebenfalls Erkenntnisse vor, sodass beide Aspekte im nachfolgenden Abschnitt näher ausgeführt werden.

4.4.2.1 Zellzyklusregulation in anderen Zelltypen durch *T. gondii*

Brunet et al. [2008] haben sich mit dem Effekt von *T. gondii* auf die Wirtszellproliferation auseinandergesetzt. Interessanterweise induzierte der RH-Stamm von *T. gondii* den G1/S-Phasenübergang in Anwesenheit des Transkriptionsregulators Uhrf1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) in humanen Trophoblasten und dermalen Fibroblasten. Dadurch wurde nach Infektion die G1-Phase des Wirtszellzyklus verkürzt und die S-Phase vorangetrieben. Wie wichtig die Uhrf1-vermittelte G1/S-Progression für die *Toxoplasma*-Replikation ist, zeigten Brunet et al. [2008] an Uhrf1-, Knock-out'-Klonen, in denen die parasitäre Replikation deutlich vermindert war. Im Anschluss an die Aktivierung der G1/S-Transition vermittelte *Toxoplasma* bemerkenswerterweise durch Inhibierung von CyclinB1 einen Arrest beim G2-Mitose-Übergang [Brunet et al., 2008].

Der G2/M-Arrest wurde auch nach Infektion von G0/G1-synchronisierten HFF-Zellen nachgewiesen, mit einem zusätzlich oszillierenden Aktivierungsmuster der ERK1/2-Phosphorylierung [Molestina et al., 2008]. Demzufolge wurde angenommen, dass die mit *Toxoplasma*-infizierten Zellen nicht in die Mitose eintreten.

Überraschenderweise wurden in einer anderen Studie etwa 10 Proteine (u. a. Dynaktin 2, Lamin B2, Prohibitin) in *Toxoplasma* RH-infizierten konfluenten HFF-Zellen detektiert, die wichtige Funktionen während Mitose und Zellproliferation erfüllen [Nelson et al., 2007]. Darüber hinaus rekrutierten PV des RH-Stammes Zentrosomen und Komponenten des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) [Walker et al., 2008]. Dies könnte auf eine Aktivierung bestimmter Regulatoren und eine anschließende Initiation und Progression der Mitose hindeuten. Dabei würde es sich also um eine Mitoseprogression handeln, die, wie oben erwähnt, in infizierten Zellen bisher nicht direkt nachgewiesen wurde [Walker et al., 2008; Nelson et al., 2008]. Bisherige Versuche wurden allerdings ausschließlich mit proliferierenden oder „temporär“ ruhenden Zellen durchgeführt. Nicht auszuschließen sind daher mögliche Wirtszelltyp- und *Toxoplasma*-Stamm-spezifische Unterschiede, die jeweils einen anderen Einfluss auf die Mitose-Phase-Progression bzw. Arrest aufweisen könnten.

4.4.2.2 Zellzyklusregulation von Skelettmuskelzellen durch andere Parasiten

Ausdifferenzierte Synzytien bilden ein schützendes Milieu, nicht nur für persistierende *T. gondii*. Die Larven von *Trichinella spiralis* (Stamm Nematoda) kapseln sich innerhalb von Myofibrillen ab und bilden diese mit Hilfe von Wirtzellproteinen zu „Ammenzellen“ (engl. nurse cell) um [Despommier, 1998]. Die Bildung der „Ammenzellen“ umfasst eine De-Differenzierung mit einem Wiedereintritt der SkMZ in den Zellzyklus und ihrem Wiederaustritt in der G2/M-Phase bei paralleler Kollagenablagerung [Jasmer, 1993]. Darüber hinaus werden Muskel-Satellitenzellen zur Teilung und anschließend zur nicht-klassischen Differenzierung (engl. misdifferentiation) stimuliert.

Interessant ist die Fähigkeit der terminal differenzierten Myofibrillen zur De-Differenzierung nach Infektion mit *T. spiralis*. Sie umfasst u. a. eine verminderte Expression von Transkriptionsregulatoren wie MyoD, Myogenin, MRF5 als auch des Differenzierungsmarkers MyHC (Myosin Heavy Chain) *in vivo* [Jasmer, 1993; 1994]. Darüber hinaus werden während der *Trichinella*-Abkapselung Apoptosegene bzw. Zellzyklusregulatoren wie MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) und das in Muskelzellen unabhängig von p53 transkribierte p21 *in vivo* exprimiert, das allerdings zu

späteren Infektionszeitpunkten wieder abnimmt [Wu et al., 2008; Boonmars et al., 2005]. Die De-Differenzierung von Muskelzellen kann sogar von nicht völlig intakten *T. spirali*-Larven stimuliert werden [Jasmer & Neary, 1994]. Die Struktur eines Muskels nach der Infektion ist dadurch irreversibel verändert. In Einzelfällen kann auch der Herzmuskel befallen werden und die Erkrankung kann dann für den Infizierten tödlich enden [Wu et al., 2001].

Die Infektion von Herzmyozyten mit *T. cruzi* endet ebenfalls mit Kardiomyopathien [Brennessel et al., 1985]. Die Parasiteninvasion stimuliert eine Proliferation der endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen [Meirelles et al., 1986; Hassan et al., 1983]. Dabei werden ERK1/2, AP-1 (Activating Protein-1), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), NF- κ B und CyclinD1 hochreguliert, was zur Zellteilung führt [Bouzahzah et al., 2008; Mukherjee et al., 2004; Huang et al., 2003]. Begleitend sinkt die *p21*-Transkription. Brasilianische und kolumbianische *T. cruzi*-Stämme weisen darüber hinaus einen Myotropismus in Mäusen auf [Araújo et al., 1986]. Der brasilianische Stamm zeigt zusätzlich eine inhibierende Wirkung auf die Muskeldifferenzierung von L6E9 Zellen *in vitro* [Rowin et al., 1983]. Interessanterweise scheint diese Inhibierung temperaturabhängig und darum reversibel zu sein [Tanowitz et al., 1984].

4.4.2.3 Modulation von Zellzyklusregulatoren in SkMZ durch *T. gondii* laut genomweiter Transkriptomanalysen

Mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal überhaupt eine durch *Toxoplasma*-Infektion veränderte Genregulation in zwei terminal differenzierten Zelltypen (SkMZ, Neuronen) untersucht. Interessanterweise wiesen ausschließlich die postmitotischen Zellen eine Expressionssteigerung von Zellzyklusregulatoren auf (siehe oben). Dabei ist schwer vorauszusehen, ob deren Steigerung Wirtszell- oder Parasit-induziert ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde damit auch das erste Mal eine modulierende Wirkung von *T. gondii* auf Zellzyklusregulatoren von C2C12-Myotuben *in vitro* nachgewiesen.

Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren regulieren Zellen solche Transkriptionsfaktoren hoch, die die Zellüberlebensdauer und das Zellwachstum modulieren [Leaner et al., 2003; Gashler & Sukhatme, 1995]. Eine schnelle Hochregulation dieser Genexpressionen erfolgt über die Serum Response-Elemente (SRE) und findet interessanterweise auch in der frühen Phase der *Toxoplasma*-Infektion statt. Wiley et al. [2011] zeigten, dass alle *Toxoplasma gondii*- Genotypen die SRE über MAP Kinase-Signalwege aktivieren. Zu den via SRE

regulierten Transkriptionsfaktoren gehören beispielweise die Early growth response Gene (*Egr1* und *Egr2*), *c-jun*, *junB*, *c-myc*, *Fos*, *FosB*, *Fosl1*, die alle außer *c-jun* auch in *Toxoplasma*-infizierten SkMZ besonders stark exprimiert wurden. *Egr1* aktiviert u. a. die Expression von Wachstumsfaktoren, welche die mitogene Stimulation weiter verstärken [Molestina et al., 2008] und fördert somit die Mitose [Liao et al., 2004]. Zum anderen schlagen Blader & Saeij [2009] vor, dass eine *Egr2*-Expression den direkten Kontakt zwischen Wirtszelle und Parasit und die Sekretion von Rhoptrien benötigt. Da die oben aufgeführten Gene die Zellproliferation positiv regulieren und deren Expression auch in terminal differenzierten SkMZ nach Infektion hochreguliert war, könnte *Toxoplasma* auch den Zellzyklus von C2C12-Myotuben modulieren.

Neben Aktivatoren des Zellzyklus wurden nach *Toxoplasma*-Infektion aber auch einige Inhibitoren verstärkt exprimiert (Tabelle 24). Dies erschwert es, aufgrund der Transkriptomanalysen, eine Aussage über die funktionelle Bedeutung der Infektion auf den Zellzyklus in C2C12-Myotuben zu treffen. Allerdings ist die Hochregulation der Transkriptionen von Cyclinen B1, B2, A2 und von Cdk1 (*Cdc2a*) interessant, da sie den Mitose-Eintritt fördern. Die Transkription von *CyclinB1* wurde dabei sogar über den gesamten Zeitraum der 72-stündigen Infektion hochreguliert (Abbildung 3-27; D). Außerdem wurden viele Gene des Anaphase-fördernden Komplexes (APC/C) und seine Substrate nach Infektion von Myotuben hochreguliert (Tabelle 24). Sie stellen den Hauptregulator für den zeitlichen Ablauf der Mitose dar. Darüber hinaus stehen manche Proteine des APC/C in Verbindung mit *Egr1* [Liao et al., 2004]. Es stellte sich daher die Frage, ob *Toxoplasma* dadurch den erneuten Eintritt von terminal differenzierten C2C12-Myotuben in den Zellzyklus fördert und möglicherweise zur De-Differenzierung von SkMZ führen kann.

Dass Myofibrillen *in vivo* sowie C2C12-Myotuben *in vitro* prinzipiell imstande sind, zu proliferierenden, einkernigen Myoblasten zu de-differenzieren (Zellularisierung), wurde in der Literatur bereits beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen ist das nach heutigem Kenntnisstand aber nicht möglich. So bedarf eine solche De-Differenzierung einer Behandlung der Zellen mit „newt regeneration extract“ [McGann et al., 2001] oder der Zugabe synthetischer Moleküle wie Reversinen oder Myoseverinen [Duckmanton et al., 2005; Chen et al., 2004]. Des Weiteren kann durch Überexpression von Transkriptionsrepressoren wie dem Muskel Segment Homeobox 1 (*Msx-1*), das die *CyclinD1*- und *Cdk4*-Expression hochreguliert [Hu et al., 2001], die Zellteilung von Myotuben angeregt werden [Odelberg et al., 2000]. Als vielversprechend erwies sich auch der spezifische

Wachstumsfaktor Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) [Chen et al., 2005]. Viele Studien legen auch eine potentielle Rolle des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β 1 in der De-Differenzierung nahe [Mu & Li, 2011], indem in C2C12-Zellen der Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) hochreguliert wird [Vial et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit stieg die *Ctgf*-Transkription interessanterweise ausschließlich in *Toxoplasma*-infizierten C2C12-Zellen um das 2,5-fache ($p = 6.37 \times 10^{-12}$). Dies könnte jedoch, wie Gerrard & Robinson [1989] vermuten, am Serum des Kulturmediums liegen [Vial et al., 2008; Gerrard & Robinson, 1989].

Die *Msx-1*-Transkription zeigte in dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen *Toxoplasma*-infizierten und nicht-infizierten C2C12-Myotuben. Darüber hinaus wies auch der BrdU-Einbau in den infizierten C2C12-Myotuben auf keine Zunahme an BrdU-positiven Zellkernen nach Infektion und damit auf keine Aufhebung des Zellzyklusarrestes hin (Abschnitt 3.5.3). Eine Zunahme der DNA-Synthese konnte somit nach Infektion von C2C12-Myotuben nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigt dies, dass *T. gondii* zwar durchaus die Transkription Zellzyklus-aktivierender Gene in terminal differenzierten Myotuben fördert, dies aber nicht ausreicht, um einen Wiedereintritt in einen vollständigen Zellzyklus zu vermitteln. Da für *T. gondii* eine dauerhafte Persistenz in einem langlebigen Zelltyp wichtig ist, um zumindest teilweise vor Immunreaktionen geschützt zu sein, wäre eine De-Differenzierung von Muskelzellen und damit einhergehend die Zerstörung der muskulären Struktur *in vivo* für den Parasiten evolutionär von Nachteil.

4.4.3 Tspyl2 – Vermittler der terminalen SkMZ-Differenzierung und *Toxoplasma*-Differenzierung

Die Infektion mit *T. gondii* veränderte die Transkriptome von SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten bereits 24 Stunden nach Parasitenzugabe. Interessanterweise regulierten viele der in terminal differenzierten SkMZ hochregulierten Gene den Wirtszellzyklus. Dies weist auf eine besondere Bedeutung der für Zellzyklustransition bzw. -arrest verantwortlichen Faktoren für die *Toxoplasma*-Persistenz hin.

Die Tatsache, dass Änderungen in der Expression von Regulatoren der Zellzyklus-Maschinerie die *Toxoplasma*-Entwicklung beeinflussen können, wurde bereits von Radke et al. [2006] gezeigt. Sie wiesen nach, dass ein trisubstituiertes Pyrrol - Compound 1 genannt - die Replikation von *T. gondii* inhibiert und die Bradyzoiten- bzw. Zystenbildung in HFF-Zellen *in vitro* fördert. Interessanterweise waren die virulenten *Toxoplasma*-Stämme RH und GT-1 (Genotyp I) gegenüber Compound 1 resistent.

Compound 1 (4-[2-(4-fluorophenyl)-5-(1-methylpiperidine-4-yl)-1H-pyrrol-3-yl]-pyridine) ist während der Suche nach neuen potentiellen Therapeutika für die Toxoplasmose und die *Eimeria tenella*-Infektion in den Vordergrund getreten [Donald et al., 2002]. Compound 1 ist ein effektiver ATP-Bindungsstellen-Inhibitor von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) von *E. tenella* und *T. gondii* [Gurnett et al., 2002] und wirkt auf Säuger- und Vögel-PKG weniger effektiv [Gurnett et al., 2002]. Allerdings zeigten die mit Compound 1 behandelten HFF-Zellen eine verminderte Wachstumsregulation [Radke et al., 2006]. Der Grund hierfür liegt womöglich in der Inhibierung der p38 MAPK [de Laszlo et al., 1999] und der Hochregulation der Cell Division Autoantigen 1 (CDA-1)-Transkription [Radke et al., 2006].

CDA-1 gehört zu einer Superfamilie, die Proteine wie Se20-4 (cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen) [Eichmüller et al., 2001], DENTT [Ozbun et al., 2001; 2003], Tspyl2, TSPX [Delbridge et al., 2004] und NP79 [Sun et al., 2002] umfasst. Das Mausortholog von *CDA-1* ist *Tspyl2* (alternativer Name *CINAP* (CASK-interacting nucleosome assembly)) und wird besonders in neuronalen Geweben exprimiert [Tao et al., 2011; Wang et al., 2004]. Unsere Transkriptomanalysen zeigten ebenfalls eine verstärkte Expression von *Tspyl2* in nicht-infizierten Neuronen (RPKM-Wert 64,54), im Vergleich zu C2C12-Myotuben (10,95), Astrozyten (11,45) und Fibroblasten (12,38).

Obwohl *Tspyl2* ein Nucleosome Assembly Protein (NAP) darstellt, und NAP-Proteine zur SET/TSPY/NAP-Proteinfamilie gehören, besitzt *Tspyl2* interessanterweise andere Aufgaben als die übrigen Mitglieder dieser Proteinfamilie [Tao et al., 2011]. Zwar besitzt es eine NAP-Domäne, aber im Gegensatz zu NAP-Proteinen inhibiert *Tspyl2* über seinen sauren C-Terminus die Aktivität vom CyclinB/Cdk1-Komplex [Tao et al., 2011]. *Tspyl2* kann von CyclinD1/Cdk4, CyclinA/Cdk2 und CyclinB/Cdk1 *in vitro* phosphoryliert werden. Während SET die G2/M-Phase inhibiert und DENTT über TGF- β 1 den Übergang von G1 zur S-Phase unterdrückt [Ozbun et al., 2003, 2001], kann *Tspyl2* die G1-, S- und M-Phasen des Zellzyklus negativ beeinflussen [Chai et al., 2001]. Werden die beiden Cdk-abhängigen Phosphorylierungsstellen mutiert, kann seine negative Wirkung auf das Zellwachstum *in vitro* aufgehoben werden [Chai et al., 2001].

Obwohl *Tspyl2* *in vitro* als negativer Zellzyklusregulator und Tumorsuppressor fungiert, zeigen *Tspyl2*-„Knock-out“-Mäuse eine normale Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen, keine beeinträchtigte Fruchtbarkeit oder eine erhöhte Tumorraten [Tao et al., 2011; Martinez et al., 2002]. Diese widersprüchlichen Daten erschweren die Bestimmung der Funktion vom *Tspyl2*-Gen [Tao et al., 2011].

Radke et al. [2006] konnten die erhöhte BAG1-Expression in *Toxoplasma*-infizierten, mit Compound 1-behandelten humanen HFF-Zellen und murinen Astrozyten *in vitro* einer Überexpression von CDA-1 zuschreiben. Damit wurde erstmals ein Wirtszellen identifiziert, das unter artifiziellen Bedingungen (Compound 1-Behandlung) die *Toxoplasma*-Entwicklung reguliert und von dem die Parasitenpersistenz abhängen kann.

Bislang lagen keine Analysen zum *CDA-1/Tsply2*-Gen in SkMZ und dessen Wirkung auf die *Toxoplasma*-Persistenz in diesem zellulären Kompartiment vor. Da die Myotubenbildung von negativen Zellzyklusregulatoren abhängt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Transkripte von Tsply2 mittels RNA-Interferenz gezielt gespalten und damit erstmalig die Wirkung des Tsply2-,Knock-downs‘ auf die terminale Differenzierung von SkMZ und die *Toxoplasma*-Entwicklung untersucht.

4.4.3.1 Regulation von Tsply2 und anderer Zellzyklusregulatoren während terminaler C2C12-Differenzierung

Zunächst wurde eine von Compound 1 unabhängige, physiologische Steigerung der Tsply2-Expression um das etwa 3,5-fache während einer 168-stündigen C2C12-Differenzierung nachgewiesen. Dass eine steigende Tsply2-Expression generell mit der Inhibierung der Zellteilung korreliert, wurde auch in wachstums-inhibierten Jurkat T-Zellen [Tu et al., 2007; Ito et al., 2004], HFF- [Radke et al., 2006] und HeLa-Zellen ermittelt [Chai et al., 2001]. Wie die von uns durchgeführten Tsply2-,Knock-down‘-Experimente deutlich zeigten, verhinderte eine Inaktivierung von Tsply2 die Fusion von Myoblasten und damit die Myotubenbildung (Abbildung 3-29; Abbildung 3-30). Tsply2 könnte mehrere, bisher unbekannte Signalwege regulieren, die zur Hemmung der Zellzyklusprogression führen. Dadurch proliferierten die Tsply2-,Knock-down‘-Zellen aktiv und unterschieden sich phänotypisch nicht von mitotisch aktiven Wildtyp-C2C12-Myoblasten.

Tsply2 inhibiert die Zellteilung, in dem es die Transkription vom *p53*-Tumorsuppressor fördert (Abbildung 4-1) [Toh et al., 2010, Tu et al., 2007]. Außerdem bewirkt es die Phosphorylierung von ERK1/2 MAP-Kinasen. Beide Signaltransduktionswege üben eine positive Wirkung auf die Expression des p21 (Cdkn1a)-Zellzyklusinhibitors aus. P21 ist eines der wichtigsten Proteine der Waf1/Cip1-Inhibitorfamilie und inaktiviert die CyclinD/Cdk4- und CyclinB1/Cdk2-Komplexe [Gillis et al., 2009]. Darüber hinaus bindet p21 direkt an PCNA (Einheit der DNA-Polymerase). Somit übt Tsply2 einen negativen Einfluss auf die G1, S- und M-Phasen des Zellzyklus aus [Shen et al., 2003].

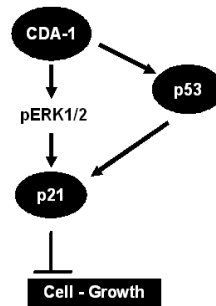


Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung der inhibierenden Wirkung von Tspyl2 auf die Zellteilung. Tspyl2 beeinflusst positiv die *p53*-Transkription. Parallel kann die Phosphorylierung von ERK1/2-MAPK eingeleitet werden. Beide Proteine binden an entsprechende „Response Elemente“ des p21-Promotors. Die Zellproliferation wird direkt von p21 (Cdkn1) via Inhibition von CyclinD/Cdk4-, CyclinB1/Cdk2-Komplexen und PCNA unterbunden. Die leicht veränderte Abbildung wurde aus Toh et al. [2010] entnommen.

P21 wird im Laufe der terminalen C2C12-Differenzierung stark hochreguliert [Shen et al., 2003], was in unseren Untersuchungen bestätigt wurde (Abschnitt 3.5.1). Obwohl Tspyl2 und p21 im Zuge der verminderten C2C12-Myoblastenproliferation verstärkt exprimiert wurden, konnte keine begleitende Zunahme von p53-Transkripten detektiert werden (Abschnitt 3.5.1). Der Nachweis von phosphoryliertem ERK1/2 während der Differenzierung erbrachte dagegen keine eindeutigen Ergebnisse. Möglicherweise erfolgt die Differenzierung und der damit verbundene Zellzyklusarrest in C2C12-Zellen über c-Jun N-terminale Kinasen oder p38 MAP-Kinasen [Yu et al., 2002]. Auch konnte bereits festgestellt werden, dass MyoD auf p53-unabhängige Weise die p21- [Guo et al., 1995] und sogar die Retinoblastoma (Rb)-Expression induzieren kann [Martelli et al., 1994].

Ein Vergleich der RPKM-Werte von Tspyl2 (10,95) und p21 (702,0) in nicht-infizierten C2C12-Myotuben zeigt große Unterschiede zwischen beiden Werten. Dagegen waren die Expressionslevel beider Gene in Fibroblasten (Tspyl2: 12,38; p21: 80,36) deutlich ähnlicher. Dies könnte auf einen Tspyl2-unabhängigen Signalweg der p21-Regulation in SkMZ hindeuten. Andererseits könnte Tspyl2 durch einen bisher unbekanntem Verstärkungsmechanismus die ‚downstream‘ liegenden Inhibitoren wie p21 in ihrer Expression spezifisch in SkMZ fördern.

Parallel zur verstärkten Expression der negativen Zellzyklusinhibitoren Tspyl2 und p21 sank während der C2C12-Differenzierung die Expression von proliferationsfördernden Regulatoren wie Uhrf1 und Ccnb1 (Abschnitt 3.5.1). Uhrf1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) fördert die G1/S Transition indem es die DNA-Methylierung, den „epigenetischen Marker“ auf DNA, aufrechterhält [Bianchi & Zangi, 2013]. Das CyclinB1 (Ccnb1) bildet zusammen mit der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (Cdk1/Cdc2a) einen

Maturation/Mitosis-promoting Factor-Komplex (MPF), der die Mitose-Phase fördert und die Zellkern- sowie Organellenteilung vorantreibt. Eine Herunterregulierung beider positiver Zellzyklusregulatoren im Laufe der C2C12-Differenzierung war daher erwartet und konnte entsprechend bestätigt werden (Abschnitt 3.5.1).

Die RPKM-Werte von Uhrf1- und CyclinB1 (Ccnb1)-Transkripten in nicht-infizierten C2C12-Myotuben im Vergleich zu NIH3T3-Fibroblasten zeigten einen 10-fachen (Uhrf1) und über 30-fachen (Ccnb1)-Expressionsunterschied dieser Gene zwischen Myotuben und Fibroblasten und bestätigten damit die starken Unterschiede in der Zellzyklusregulation zwischen beiden Zelltypen.

Somit wurde gezeigt, dass die terminale Differenzierung von C2C12-SkMZ einen komplexen Prozess darstellt, der dem strikten Einfluss von einer Reihe von Zellzyklusregulatoren ausgesetzt ist. Während negative Zellzyklusregulatoren im Laufe der Myotubenformation an Bedeutung gewinnen, werden Zellzyklusaktivatoren erfolgreich unterdrückt.

4.4.3.2 Regulation von Tspyl2 und anderen Zellzyklusregulatoren während der *T. gondii*-Infektion

Wurden differenzierte C2C12-Myotuben, -Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten mit *T. gondii* für 72 Stunden infiziert, konnte spezifisch in differenzierten SkMZ eine deutliche *Tspyl2*-Transkriptionsteigerung beobachtet werden (Abbildung 3-27; A). Da die *Tspyl2*-Proteindetektion nicht gelang, ist dessen Regulation auf Proteinebene unbekannt. Studien zeigen jedoch, dass dieser Regulator auf RNA-Ebene reguliert wird [Tu et al., 2007].

Obwohl die *Tspyl2*-Expression nach Infektion von C2C12-Myotuben mit *Toxoplasma* deutlich anstieg (Abbildung 3-27; A) und *Tspyl2*- die *p21*-Expression induziert (Abbildung 4-1), wurde erstaunlicherweise keine Zunahme der *p21*-Transkription in infizierten C2C12-Myotuben festgestellt (Abbildung 3-27; B). Dies könnte auf einen *Tspyl2*-unabhängigen Regulationsmechanismus der *p21*-Expression hindeuten, der unabhängig von *Toxoplasma* moduliert wird. Ein möglicher Kandidat stellt TGF- β dar (Transforming Growth Factor), das die *p21*-Transkription unabhängig von p53 aktivieren kann [Datto et al., 1995]. Die konstitutive TGF- β 1-Expression war in nicht-infizierten C2C12-Myotuben höher als in Myoblasten und NIH3T3-Zellen, allerdings konnte keine signifikante Transkriptionsveränderung von TGF- β 1 aufgrund einer 48-stündiger *Toxoplasma*-Infektion in infizierten Myotuben ermittelt werden (Abbildung 4-1). Somit bleibt unklar was die fehlende *p21*-Regulation trotz *Tspyl2*-Hochregulation nach Infektion von C2C12-Myotuben bewirkt.

Eine Infektion mit *T. gondii* korrelierte auch mit einer Zunahme der Expression von Uhrf1 und Ccnb1 in differenzierten C2C12-Myotuben. Die RNASeq-Daten wiesen ebenfalls auf eine signifikante Hochregulation der Transkripten von Uhrf1 und Ccnb1 in Myotuben, nicht aber in Fibroblasten 24 Stunden post infectionem hin.

Der Tspyl2-Zellzyklusregulator war essentiell für C2C12-Differenzierung und Myotubenbildung wie die shRNA-Experimente zeigten. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal überhaupt gezeigt, dass Tspyl2-„Knock-down“ in murinen C2C12-Myoblasten die terminale Differenzierung von SkMZ effektiv unterbindet. Tspyl2 könnte dabei mehrere, bisher unbekannte Signalwege hemmen, die zur Inhibierung von Differenzierung und Zellzyklus führen. Interessanterweise ging die Hemmung der C2C12-Differenzierung in Tspyl2-„Knock-down“-Zellen mit einer starken Replikation von *Toxoplasma* im Vergleich zu C2C12-Kontrolltransfektanten einher (Abschnitt 3.6.2). Gleichzeitig war die Anzahl an Bradyzoiten und Bradyzoiten-haltigen Zysten nach Tspyl2-„Knock down“ deutlich vermindert (Abschnitt 3.6.3). Somit wurde hier erstmalig gezeigt, dass in dem natürlichen System „Skelettmuskelzelle“ Zellzyklusregulatoren eine zentrale Rolle in der *Toxoplasma*-Entwicklung ausüben. Der terminal differenzierte, postmitotische Charakter von SkMZ scheint dabei die entscheidenden Signale zu vermitteln, um *T. gondii* zur Stadiendifferenzierung anzuregen und das dauerhafte Überleben der Parasiten zu sichern. Eine zukünftig zu klärende Frage bleibt allerdings, wieso nach *Toxoplasma*-Infektion gleichzeitig Zellzyklusaktivatoren, die S-Phase- (Uhrf1) und G2/M-Phase-(Ccnb1) fördern, in ruhenden, postmitotischen Myotuben hochreguliert wurden.

Eine mögliche Erklärung könnte ein unterschiedlicher Effekt von Tachyzoiten und Bradyzoiten auf die erhöhte Tspyl2- einerseits und gleichzeitig erhöhte Uhrf1/Ccnb1-Transkriptionen andererseits und damit auf den Zellzyklus sein. Obwohl für Infektionsversuche stets vitale, frisch extrazelluläre *Toxoplasma*-Parasiten verwendet wurden, können Bradyzoiten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass in Myotuben *T. gondii* schnell zu Bradyzoiten differenziert. Tatsächlich wurden BAG1- und ENO1-Transkripte mittels RNA-Sequenzierung bzw. RT-qPCR in C2C12-Myotuben bereits 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion nachgewiesen. Möglich wäre, dass junge Bradyzoiten die Tspyl2-Expression positiv beeinflussen, während Tachyzoiten zur verstärkten Expression von Uhrf1 bzw. CyclinB1 führen.

Eine dauerhafte *Toxoplasma*-Persistenz ist vor allem in langlebigen Zelltypen wie terminal differenzierte SkMZ oder Neuronen möglich, dies könnte durch eine Hochregulation von

Tspx12-Expression und den damit verbundenen Erhalt des Zellzyklusarrestes weiter unterstützt werden.

4.4.4 Regulation der *T. gondii*-Stadiendifferenzierung in Zellzyklus-arretierten SkMZ

Zellzyklusregulatoren spielen offensichtlich in der *Toxoplasma*-Differenzierung eine wichtige Rolle. Wurde der postmitotische Charakter der SkMZ via Tspx12-, Knock-down‘ beeinträchtigt, hatte dies gravierende Auswirkungen auf die intrazelluläre Entwicklung von *T. gondii* (siehe oben). Zellzyklusregulatoren stehen in enger Wechselwirkung mit verschiedensten Signaltransduktionswegen, die Funktionen der Zelle über den Zellzyklus hinaus regulieren. Diese könnten daher ebenfalls zur erhöhten *Toxoplasma*-Differenzierung in Myotuben beitragen. Dazu können beispielsweise unterschiedliche Rezeptoren auf der Myotuben- bzw. Myoblastenoberfläche, unterschiedliche metabolische Aktivitäten sowie Unterschiede in der Expression von Immunfaktoren gehören.

4.4.4.1 Oberflächenrezeptoren - Invasion von differenzierten SkMZ durch *T. gondii*

Die Invasion von synchronisierten HeLa- [Dvorak & Crane, 1981], CHO- (Chinese hamster ovary) und MDBK- (Adult bovine kidney)-Zellen [Grimwood et al., 1996] oder von HFF-Zellen [Lavine & Arrizabalaga, 1996] durch *T. gondii* (RH-Stamm) steigt mit Zellzyklusprogression von der G1- in Richtung S-Phase. Die stärkste Invasion wurde in Wirtszellen der mittleren S-Phase beobachtet und sie sank in der G2/M-Phase wieder ab. Dass die *Toxoplasma*-Wirtszellinvasion von der Zellzyklusphase abhängt, wurde ebenso von Youn et al. [1991] gezeigt.

Neben *T. gondii* zeigte auch *Trypanosoma cruzi* eine verstärkte HeLa-Zellinvasion während der S-Phase [Dvorak & Crane, 1981]. S-Phase-abhängige Bindungsfaktoren können zwar für beide Parasiten unterschiedlich sein, können aber offensichtlich für beide Parasiten die Wirtszellinvasion regulieren. Für *T. cruzi* wurde auch gezeigt, dass konfluente Zellen weniger invadiert werden als nicht-konfluente Zellen [Henriquez et al., 1981].

Seit langem wird vermutet, dass die verstärkte S-Phase-abhängige *T. gondii*-Invasion durch Rezeptoren reguliert wird, die eine zellzyklusabhängige Expression aufweisen [Youn et al., 1991; Dvorak & Crane, 1981]. Dass Myoblasten stärker als Myofibrillen infiziert werden, könnte demnach an Rezeptoren liegen, die während der aktiven DNA-Replikation vermehrt auf der Myoblastenoberfläche vorkommen.

Janot et al. [2009] und Fulco et al [2008] wiesen auf eine erhöhte Präsenz von Zuckerrezeptoren auf der Oberfläche junger Myotuben 72 Stunden nach Differenzierungsstart *in vitro* hin. Allerdings sind Oberflächenrezeptoren von differenzierten SkMZ, die die Wirtszellinvasion von *Toxoplasma* in diesem Zelltyp regulieren könnten, bisher unbekannt.

Kürzlich wurde eine verminderte Expression von M-Cadherinen in *Toxoplasma*-infizierten Myoblasten nachgewiesen, wodurch die terminale Differenzierung von murinen primären Skelettmuskelzellen gehemmt wurde [Gomes et al., 2011]. Cadherine und andere IgCAMs wie ICAM könnten eine prominente Rolle in den *Toxoplasma*-Muskelfaser-Interaktionen spielen, da das Protein MIC2 den Ligand für den ICAM-Rezeptor darstellt [Charron & Sibley, 2004]. Darüber hinaus weisen andere Cadherine, V-CAMs und N-CAMs, eine höhere Expression in Myoblasten als in Myotuben und Muskelfasern *in vivo* auf [Gomes et al., 2011; Curci et al., 2008], sodass die terminale SkMZ-Differenzierung offensichtlich auch zu einem veränderten Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen führt.

Ferreira da Silva et al. [2009] zeigten, dass eine aktive Penetration von Tachyzoiten des virulenten RH-Stammes in primären SkMZ *in vitro* bereits in den ersten 30 Minuten nach Parasitenzugabe erfolgt. Interessanterweise wurden Bradyzoiten des ME49-Stammes sogar schon nach 15 Minuten in primären Skelettmuskelzellen *in vitro* nachgewiesen. Sie sind mit ihrem apikalen Ende (Lokalisation des Konoids), bei Annahme der posterioren Lage, in die SkMZ aktiv eingedrungen [Guimarães et al., 2008]. Zusätzlich wurde in beiden Publikationen eine *Toxoplasma*-Aufnahme auch durch Endozytose (Phagozytose) mittels Filopodien angenommen. Die Penetrationsart gleicht somit den Wegen, die bereits in anderen Zelltypen nachgewiesen wurden [Ferreira da Silva et al., 2009a; MacLaren et al., 2004].

Die kurze Invasionszeit von primären SkMZ und auch die vergleichbare, in dieser Arbeit mittels qPCR nachgewiesene Parasitenmenge in C2C12-Myotuben und –Myoblasten 24 Stunden post infectionem deuten allerdings nicht darauf hin, dass *T. gondii* in Myotuben schlechter eindringen kann als in Myoblasten. Daher scheint eine Zellzyklus-abhängige Regulation der verminderten Parasitenteilung bei gleichzeitig erhöhter Bradyzoitenbildung aufgrund unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren von Myotuben und Myoblasten eher unwahrscheinlich.

4.4.4.2 Metabolische Eigenschaften der differenzierten SkMZ

Die metabolischen Aktivitäten einer Zelle stehen in enger Korrelation mit dem Zellzyklus [Krylov et al., 1999]. Beide, SkMZ und Neuronen, weisen aufgrund des Zellzyklusarrests einen postmitotischen Charakter auf. Darüber hinaus weisen sie eine hohe Glykolyseaktivität und eine starke Laktatproduktion auf [Howarth et al., 2012; McCullagh et al., 1996; McDermott & Bonen, 1993]. Unter diesem Aspekt könnte auch der Wirtszellmetabolismus zur erhöhten Stadienkonversion und Persistenz von *Toxoplasma gondii* in Muskelzellen und Neuronen beitragen.

Für NIH3T3- und 239T-Zellen wurde gezeigt, dass sie unter Stresskonditionen (CO₂-Mangel) nur wenige intrazelluläre *Toxoplasma*-Prü (Genotyp II)-Bradyzoiten aufwiesen, während Vero- und HFF-Zellen unter denselben Bedingungen die Bradyzoiten-Bildung unterstützten. Der Überstand von NIH3T3 und 239T enthielt große Mengen an Laktat und wurde dieser Überstand auf HFF oder Vero-Kulturen übertragen, wurden diese gegenüber der Zystenbildung resistenter [Weilhammer et al., 2012]. Wenn die Glykolyse in HFF- und Vero-Zellen via Glukosezugabe bzw. Akt-Kinasen-Überexpression hochreguliert wurde, veränderte sich der Phänotyp dahingehend, dass die stressbedingte Bradyzoitenbildung stark unterdrückt und die *Toxoplasma*-Replikation *in vitro* gefördert wurde [Weilhammer et al., 2012]. Dies waren völlig unerwartete Beobachtungen, die vermutlich nicht auf die differenzierten SkMZ und Neuronen übertragen werden können, da beide Zelltypen zum einen eine hohe Glykolyseaktivität und Laktatproduktion und zum anderen eine erhöhte *Toxoplasma*-Zystenpräsenz während chronischer Toxoplasmose aufweisen.

Die größte Proteingruppe, die aufgrund einer Infektion mit *Toxoplasma* (Stamm RH) in HFF-Zellen moduliert wurde, war an metabolischen Prozessen (inkl. Glykolyse) beteiligt [Nelson et al., 2008]. Auf RNA-Ebene wurden ebenfalls viele an der Glykolyse beteiligte Transkripte (darunter Laktat Dehydrogenase A und B (Muskel/Herzisoform)) von Blader et al. [2001] als differentiell nach Infektion exprimiert nachgewiesen. Welche Wirkung sie auf die *Toxoplasma*-Entwicklung ausüben ist jedoch bisher unbekannt. Jia et al. [2013] zeigten, dass die Wirtsexpression der an Glykolyse/Glukoneogenese beteiligten Gene in *T. gondii*-infizierten Mäusen *in vivo* zwar herunterreguliert wurde, aber keine signifikanten Änderungen im Mausmetabolismus ermittelt werden konnten.

Interessanterweise wies in dieser Arbeit der Vergleich von Transkriptomen nicht-infizierter SkMZ, Neuronen, Astrozyten und Fibroblasten viele Transkripte von Metabolismus-assoziierten Genen ausschließlich in Astrozyten und Fibroblasten nach. So wurden z.B. 19

Gene vor allem in Astrozyten und Fibroblasten als exprimiert detektiert, die an der Verstoffwechslung von Monosacchariden oder an Monosaccharid-umfassenden Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Dagegen bewirkte die *Toxoplasma*-Infektion mit NTE-Tachyzoiten keine bemerkenswerten Veränderungen der Transkription dieser Gengruppe in allen vier Zelltypen.

Laktat verbindet den glykolytischen mit dem oxidativen Metabolismus [Brooks, 2007]. In aktiven Muskelfasern wird Laktat aus Pyruvat via Milchsäuregärung generiert. Der damit einhergehende hohe O₂-Verbrauch kann zwar zum starken Sauerstoffverbrauch, aber keiner Hypoxie, führen. Jedoch induziert eine *Toxoplasma*-RH-Infektion unter Hypoxie (3% O₂) die Expression von HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) in konfluenten HFF-Zellen *in vitro* [Wiley et al., 2010; Spear et al., 2006]. Der HIF-1-Transkriptionsfaktor reguliert darauf folgend die Transkription der mit Hypoxie assoziierten Gene. HIF-1 hat zwar keinen Einfluss auf die *Toxoplasma*-Invasion, ist aber für die erfolgreiche Zellteilung und Organellenreplikation essentiell [Spear et al., 2006]. Allerdings haben weder HIF-1-Genexpression noch HIF-1-,Knock-out'-HFF-Zellen einen Einfluss auf die Bradyzoitenformation [Spear et al., 2006].

Weilhammer et al. [2012] hatten die HFF-Glykolyserate durch Hochregulation von Akt/PKB-Expression gesteigert. In differenzierenden SkMZ wird Glukose und deren Verstoffwechslung für eine erfolgreiche Myoblastendifferenzierung benötigt [Fulco et al., 2008]. Es könnte somit auf eine verstärkte Expression und Aktivität von Akt/PKB während der Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben hindeuten. Es ist bekannt, dass das u. a. anti-apoptotisch wirkende Akt/PKB in HFF-Zellen durch *Toxoplasma*-Infektion induziert wird [Kim & Denkers, 2006]. Unsere Versuche haben allerdings keine eindeutige Zunahme von phosphoryliertem Akt/PKB nach Infektion von C2C12-SkMZ oder Fibroblasten mit *Toxoplasma* im Laufe von 24 Stunden gezeigt. Weder differenzierte C2C12-Myotuben noch Myoblasten zeigten statistisch signifikante Regulationen von Kinasen (p38, Erk1/2, JNK, Akt) nach parasitärer Infektion. Dass die p38-, Erk1/2-, JNK- und Akt-Signaltransduktionswege eine bedeutsame Rolle während der terminalen Differenzierung von SkMZ spielen, wurde dagegen schon früher belegt [Lluís et al., 2005; Wu et al., 2000; Bennett & Tonks, 1997]. Diese Signaltransduktionswege wurden in THP1-Zellen zwischen 10 und 60 Minuten nach Infektion mit *Toxoplasma* (Stamm RH) stark aktiviert [Valère et al., 2003]. Ob die Unterschiede in der Aktivierung von Kinasen zwischen dieser und früheren

Studien auf die unterschiedlichen Parasitenstämme (RH versus NTE) oder die unterschiedlichen Wirtszellen zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Trotz keiner eindeutigen Ergebnisse ist jedoch nicht auszuschließen, dass MAP Kinasen, die die terminale Differenzierung regulieren und in Verbindung mit der metabolischen Aktivität von Myotuben stehen [Kim et al., 2006], auch einen essentiellen Einfluss auf die *Toxoplasma*-Stadienkonversion haben bzw. von den Parasiten moduliert werden können.

4.4.4.3 Immunologische Kompetenz von differenzierten SkMZ

Die Muskeldifferenzierung kann von proinflammatorischen Molekülen wie beispielweise TNF- α [Chen et al., 2007] und IL-6 [Hoene et al., 2013; Al-Khalili, et al., 2006] reguliert werden. Der Differenzierungsgrad von SkMZ und die aktive Freisetzung der proinflammatorischen Moleküle können daher für die *T. gondii*-SkMZ-Interaktion von Bedeutung sein.

Dass SkMZ imstande sind, *Toxoplasma* effektiv zu bekämpfen, wurde von Takács et al. [2012] gezeigt. Allerdings führte erst eine Aktivierung von infizierten Myotuben mit IFN- γ zu einer deutlichen Begrenzung der Parasitenreplikation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die potentiellen Änderungen in der Zytokin- bzw. Chemokinexpression aufgrund der terminalen Differenzierung infizierter SkMZ untersucht. Unterschiede wurde zum einen mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung (Tabelle 26), zum anderen anhand RT-qPCR überprüft (Abschnitt 3.8).

Die genomweiten Transkriptomanalysen offenbarten die Hochregulation von Genen in *Toxoplasma*-infizierten postmitotischen C2C12-Synzytien und Neuronen, die eine Immunreaktion vermitteln (Tabelle 26; Tabelle 27). Es konnte gezeigt werden, dass bereits 24 Stunden post infectionem Chemokine wie CCL9, CXCL1, CXCL9, CXCL10 in beiden Zelltypen statistisch signifikant hochreguliert wurden. Daneben wurde das Zytokin IL-6- in SkMZ und das *NF κ B*-Gen (*p49/p100*) in Neuronen nach Infektion hochreguliert. Die Expression von proinflammatorischen Moleküle nach *Toxoplasma*-Infektion wurden bereits in neuronalen [Schlüter et al., 2001; Suzuki et al., 2011], retinalen [Kikumura et al., 2012], und epithelialen Zellen [Denney et al., 1999] untersucht. Auch konnten Regulatoren von NF- κ B wie MCP-1 (CCL2), die an der *Toxoplasma*-Abwehr beteiligt sind, in infizierten SkMZ und Neuronen, nachgewiesen werden. IL-8, ein weiteres wichtiges NF- κ B-Target, wurde in diesen Zellen allerdings nach Infektion nicht deutlich hochreguliert.

Zugabe von IL-1 α aktiviert die *NF- κ B*-Transkription in HeLa-Zellen, die möglicherweise als zentraler Regulator der chemokinvermittelten Antwort auf eine *T. gondii*-Infektion fungiert [Kim et al., 2001]. Wir haben gezeigt, dass eine Infektion mit *T. gondii* vom Stamm NTE zur Hochregulation von CCL2 (MCP-1)- und IL-1 α -mRNA in differenzierten C2C12-Myotuben, nicht aber in infizierten Myoblasten führt. Ebenso wiesen die infizierten differenzierten C2C12-Myotuben einen Anstieg in der Transkription der *IL-1 β* und *IL-23*-Gene im Vergleich zu Myoblasten auf (Abschnitt 3.8.1). Dass die Expression und Freisetzung dieser Faktoren während *Toxoplasma*-Infektion in anderen Zelltypen induziert werden kann, wurde bereits untersucht [Muñoz et al., 2009; Nagenini et al., 2000; Gazzinelli et al., 1996; Hunter et al., 1995, Chang et al., 1990]. Dagegen deuteten die Analysen von NIH3T3-Zellen auf keine erhebliche Expressionsinduktion dieser Moleküle nach der Infektion hin.

Interessanterweise wurde das *IFN- γ* -Gen während der Infektion von SkMZ, Neuronen, Astrozyten und NIH3T3-Zellen wenig oder gar nicht exprimiert, wie RNA-Sequenzierungsanalysen zeigten. In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Reverse Transkriptase-qPCR-Analysen wiesen allerdings auf einen starken *IFN- γ* -Expressionsanstieg innerhalb von 48 Stunden in differenzierten C2C12-Zellen hin. Dieser Expressionsanstieg könnte womöglich vom Pferdeserum-haltigen Differenzierungsmedium abhängig sein (Abschnitt 3.8.1). Allerdings wiesen neben infizierten und differenzierten SkMZ auch Neuronen die Hochregulation eines Proteasome Subunit Beta Type 8 (*PSMB8*)-Transkripts auf, dass durch *IFN- γ* induziert werden kann [Kitamura et al., 2011].

Während die Produktion von proinflammatorischen Molekülen im Laufe der *Toxoplasma*-Infektion bereits in anderen Studien beschrieben wurde, wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass viele inflammatorisch aktive Faktoren auch zur lokalen Immunantwort der differenzierten SkMZ gehören. Dennoch ist bisher unklar, in wieweit ihre Expression und Freisetzung die *Toxoplasma*-Stadienkonversion in SkMZ beeinflusst.

4.5 Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine essentielle Rolle von Regulatoren terminal differenzierter Myotuben *in vitro* (Muskelfaser *in vivo*) für die Vermehrung und Stadiendifferenzierung von *T. gondii* gezeigt. Obwohl das C2C12-Zellmodell *in vitro* sehr gut charakterisiert ist und ein gutes Modell der Myogenese *in vivo* darstellt, könnten primäre embryonale SkMZ zusätzliche Erkenntnisse bzgl. der *Toxoplasma*-Replikationsintensität und Stadienkonversion in SkMZ aufzeigen. Weitere Untersuchungen unter Anwendung von primären embryonalen SkMZ wären aus diesem Grund von Vorteil. Von Interesse wären außerdem detaillierte

Untersuchungen zur Interaktion von *T. gondii* mit Skelettmuskelzellen *in vivo*. Erschwert werden solche Analysen jedoch durch die relativ geringe Anzahl von Gewebezysten während der natürlichen Infektion.

Zellzyklusregulatoren von SkMZ scheinen unter einem großen Einfluss von *T. gondii* zu stehen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die modulierten Zyklusregulatorexpressionen Wirtszell- oder *Toxoplasma*-induziert sind und welche Funktion diese Interaktionen für das Infektionsgeschehen besitzen. Entsprechende Untersuchungen könnten beispielweise mittels hitze-inaktivierten Parasiten bzw. -,'Knock-out'-*Toxoplasma*-Stämmen durchgeführt werden. Ebenso ungewiss ist dabei die Rolle der *Toxoplasma*-Bradyzoiten. Zukünftige Versuche *in vitro* mit isolierten Bradyzoiten wären somit von Vorteil. Andererseits sind Untersuchungen der Tspyl2-Expressionssteigerung nach *Toxoplasma*-Infektion aufgrund der vermutlichen Bradyzoitenpräsenz *in vitro* von großem Interesse. Da Tspyl2-'Knock-out'-Mäuse beschrieben wurden, könnten auch sie wichtige neue Erkenntnisse zur Modulation der Tspyl2-Expression und deren Funktion für die Parasitenpersistenz *in vivo* liefern.

Eine zentrale Frage für zukünftige Arbeiten wird sein, wie Tspyl2/CDA-1 die Bradyzoitenbildung in differenzierten SkMZ und möglicherweise anderen irreversibel ruhenden Zelllinien *in vitro* fördert. Dabei könnte Tspyl2 einerseits direkt die Bradyzoitenbildung fördern, andererseits könnten aber auch viele indirekte Mechanismen, die nach Tspyl2-'Knock-down' in SkMZ verändert sind, dafür verantwortlich sein. Einige wie z.B. Zellzyklusregulatoren, Oberflächenadhäsine, unterschiedliche Metabolome oder auch unterschiedlich exprimierte Immunfaktoren wurden in dieser Arbeit bereits angesprochen. Von Interesse ist auch, wie die beteiligten Wirtszellsignale vom Parasiten erkannt werden und zur Induktion der Stadienkonversion führen. Die an diesen Prozessen beteiligten Gene/Proteine von Wirt und Parasit könnten schrittweise durch den Einsatz entsprechender -,'Knock-out'-Mutanten *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde eine Schlüsselrolle des negativen Zellzyklusregulators Tspyl2 auf die *Toxoplasma*-Entwicklung und die Stadienkonversion nachgewiesen, wodurch ein Beitrag zur Klärung der faszinierenden SkMZ/*Toxoplasma*-Beziehung geleistet wurde. Allerdings ist nach wie vor ungeklärt, ob die Parasiten einen gerichteten Myotropismus *in vivo* aufweisen. Auch müssen zukünftige Arbeiten noch klären, ob *T. gondii* nach der Invasion von SkMZ auf Grund intrazellulärer Störfaktoren bzw. des Fehlens von essentiellen Wachstumsfaktoren ins Bradyzoitenstadium übergehen oder ob sich diese Faktoren erst im Laufe der Infektion bilden.

Da die *Toxoplasma*-SkMZ-Interaktion ein äußerst komplexes Zusammenspiel darstellt, müssen die metabolischen und immunologischen Aspekte ebenfalls berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist einer der häufigsten intrazellulären Protozoen weltweit und ein wichtiger Krankheitserreger des Menschen. Er kommt in drei Lebensstadien vor: Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten. Während Sporozoiten nach sexueller Vermehrung im Endwirt (Katzenartige) und Freisetzung in die Umwelt gebildet werden, entstehen Tachyzoiten und Bradyzoiten asexuell durch Endodyogenie in Zwischenwirten wie Vögeln, Säugetieren und dem Menschen. Tachyzoiten sind schnell replizierende Parasiten, die nahezu jede nukleäre Zelle des Körpers infizieren können. Dagegen bilden die nach Differenzierung von Tachyzoiten entstehenden, weitgehend ruhenden Bradyzoiten Gewebssysteme und persistieren bevorzugt in neuronalen oder muskulären Geweben der Zwischenwirte. Der Verzehr von Bradyzoiten-haltigem, rohem oder ungegartem Fleisch von *T. gondii*-infizierten Nutztieren ist einer der Hauptübertragungswege des Parasiten auf den Menschen und kann zum Ausbruch der Toxoplasmose-Krankheit führen. Die Toxoplasmose ist vor allem bei immunsupprimierten Patienten und erstmalig infizierten Schwangeren nach Übertragung auf den Fötus klinisch gefährlich und kann sogar tödlich enden. Da Fleischverzehr infizierter Nutztiere einen der Hauptinfektionswege darstellt, weisen Skelettmuskelzellen (SkMZ) eine enorme Bedeutung für die Übertragung von *Toxoplasma* auf den Menschen auf.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zelltyp-spezifische Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren, die die *Toxoplasma*-Entwicklung und Bradyzoitenbildung in SkMZ regulieren.

Die Untersuchungen wurden mithilfe der murinen C2C12-SkMZ-Linie *in vitro* durchgeführt, die von proliferierenden Myoblasten in Pferdeserum-haltigem Medium oder aufgrund erhöhter Zelldichte effektiv zu polykernigen Myotuben differenzierten. Die Effektivität der terminalen Differenzierung von C2C12-SkMZ wurde durch den Nachweis muskelspezifischer Marker wie MyoD, Myogenin und Myosin Heavy Chain (MyHC) mittels Reverse Transkriptase-qPCR (RT-qPCR), Immunfluoreszenz sowie Nachweis des Zellzyklusarrests mittels BrdU-Markierung validiert.

Die Infektion von terminal differenzierten C2C12-Myotuben, proliferierenden C2C12-Myoblasten und murinen NIH3T3-Kontrollfibroblasten mit *T. gondii* zeigte, dass der Parasit in Myotuben deutlich mehr bradyzoitenspezifische ENO1- bzw. BAG1-Transkripte exprimiert als in Myoblasten und Fibroblasten. Außerdem war die Gewebssystembildung bei gleichzeitig reduzierter Parasitenreplikation in terminal differenzierten C2C12-Myotuben

deutlich erhöht. Demgegenüber förderten proliferierende C2C12-Myoblasten und NIH3T3-Fibroblasten die Replikation von *Toxoplasma* bei gleichzeitig geringer Bradyzoitenbildung. Diese Daten weisen erstmalig auf die Bedeutung des Zelltyps und dessen Differenzierung für die Parasitenentwicklung und die Stadienkonversion in SkMZ hin.

Für genauere Untersuchungen von Zelltyp-spezifischen Interaktionen mit *T. gondii* wurden die Transkriptome von terminal differenzierten C2C12-Myotuben und Neuronen sowie von proliferierenden NIH3T3-Fibroblasten und Astrozyten vor und nach Infektion mit *T. gondii* für 24 Stunden mittels High-Throughput RNA-Sequenzierung ermittelt. Die Analysen zeigten einen deutlich größeren Einfluss der zelltyp-spezifische Genexpression auf das Gesamttranskriptom der vier Zelltypen als die Expressionsveränderungen aufgrund der *Toxoplasma*-Infektion. Allerdings wurden auch Gengruppen identifiziert, die in den terminal differenzierten SkMZ und Neuronen im Vergleich zu Fibroblasten und Astrozyten differentiell exprimiert waren. Des Weiteren bewirkte die *T. gondii*-Infektion eine signifikante Expressionssteigerung u. a. von Zellzyklus-regulierenden Transkripten spezifisch in terminal differenzierten SkMZ und Neuronen, was auf ihre mögliche Beteiligung an der *Toxoplasma*-Stadienkonversion hindeutete. Daher wurden anschließend die Expressionsprofile ausgesuchter Zellzyklusregulatoren im Laufe der terminalen C2C12-SkMZ-Differenzierung und der *Toxoplasma*-Infektion mittels RT-qPCR- und Western Blot-Analysen untersucht. Während die Transkription der negativen Zellzyklus-Modulatoren *Tspsyl2* und dem ‚down stream‘-liegenden Targetgen *p21* im Laufe der terminalen Differenzierung von C2C12-Myoblasten zunahm, sank begleitend die Transkription der *Uhrf1*- und *Ccnb1*- (CyclinB1) Aktivatoren. Nach Infektion wurde spezifisch in Myotuben, nicht aber in Myoblasten oder Fibroblasten, eine weitere Steigerung der *Tspsyl2*-Transkripte durch RT-qPCR-Analysen nachgewiesen. Gleichzeitig reagierten C2C12-Myotuben auch mit Hochregulation der *Uhrf1*- und *Ccnb1*-Transkription auf *Toxoplasma*-Infektion. Allerdings wurde durch BrdU-Markierung nachgewiesen, dass die spezifische Modulation von Zellzyklusregulatoren nach Infektion von Myotuben den Zellzyklusarrest nicht aufhob und C2C12-Myotuben nicht zur Zellteilung anregte.

Da Überexpression von CDA-1 (humanes *Tspsyl2*-Ortholog) in humanen Fibroblasten die Stadienkonversion von *T. gondii* fördert, wurde die Funktion des *Tspsyl2*-Zellzyklusregulators in SkMZ analysiert. ‚Knock-down‘ von *Tspsyl2* mittels shRNA unterdrückte effektiv die terminale C2C12-Myoblastendifferenzierung. Bemerkenswerterweise führte dies nach *T. gondii*-Infektion zweier ausgesuchter *Tspsyl2*-shRNA-C2C12-Transfektanten zu einer verstärkten *Toxoplasma*-Replikation im Vergleich zu Kontrolltransfektanten und

WT-Myotuben. Gleichzeitig war in Tspyl2-, Knock-down'-Mutanten die Parasitendifferenzierung zum Bradyzoitenstadium sowie die Gewebezystenbildung vermindert. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass in SkMZ die spontane Differenzierung von *T. gondii* zum Bradyzoiten wesentlich von dem Zellzyklusregulator Tspyl2 und der terminalen Myotubendifferenzierung abhängt.

Differenzierung von SkMZ führte u.a. auch zu veränderten Expressionsprofilen von Zytokinen und Chemokinen in C2C12-Myotuben, -Myoblasten und Kontrollfibroblasten. So wurden mehrere pro-inflammatorischen Zytokine in Myotuben deutlich stärker als in Myoblasten oder Fibroblasten exprimiert. Nach Infektion von C2C12-Myotuben stiegen die Transkriptmengen von IL-23, IL-1 α und IL-1 β an. Diese Ergebnisse könnten neben Zellzyklusregulatoren auch auf den Einfluss von Immunfaktoren bei der Zelltyp-spezifischen Stadienkonversion in differenzierten SkMZ hindeuten

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der Differenzierungsstatus der SkMZ die Stadienkonversion und die Gewebezystenbildung eindeutig beeinflusst. Da die terminale SkMZ-Differenzierung von Zellzyklusregulatoren eingeleitet wird und ihre Expressionen offensichtlich unter dem Einfluss der *T. gondii*-Infektion stehen, könnten sie einen Einfluss auf die Induktion der Stadiendifferenzierung von schnell replizierenden Tachyzoiten zu persistierenden Bradyzoiten ausüben, was am Beispiel des negativen Zellzyklusregulators Tspyl2 in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Myotuben mit der Produktion von proinflammatorischen Molekülen aktiv auf die *Toxoplasma*-Infektion reagieren und ihre Expression zur lokalen Immunantwort der SkMZ beitragen dürften.

5.2 Summary

Toxoplasma gondii is one of the most common intracellular protozoan parasites worldwide and an important human pathogen. Its life cycle includes three stages: sporozoites, tachyzoites and bradyzoites. While sporozoites are formed during sexual reproduction in the definitive host (Feloidea) and released into the environment, tachyzoites and bradyzoites reproduce asexually by endodyogeny in intermediate hosts such as birds and mammals including humans and livestock animals. Tachyzoites represent an actively replicating stage infecting virtually any nucleated cell type. During infection, they differentiate to dormant bradyzoites, which form tissue cysts and which persist preferentially in neuronal or muscle (especially skeletal muscle, SkM) tissues of intermediate hosts. Reactivation of dormant bradyzoites in immunocompromized patients or primary infection of pregnant women and subsequent transmission to the fetus can lead to life-threatening reactivated and congenital toxoplasmosis,

respectively. The ingestion of raw or undercooked meat from chronically infected animals containing tissue cysts represents one of the main infection routes of *T. gondii*. Therefore, skeletal muscle cells (SkMCs) are considered crucial for the food-borne transmission of toxoplasmosis to humans. The aim of this study was therefore the identification and characterisation of cell type-specific factors, which might regulate the *Toxoplasma* development and bradyzoite formation within SkMC.

The cell type-specific interactions were investigated using permanent mouse-derived SkMCs (C2C12 myoblasts) *in vitro*. Importantly, C2C12 myoblasts differentiate terminally to polynucleated, contractile myotubes in horse serum-containing culture medium or due to cultivation at increased cell density. Immunoblotting and quantitative RT-PCR validated the differentiation of C2C12 cells to myotubes by detection of the myogenic transcription factors MyoD, myogenin and the muscle differentiation marker Myosin Heavy Chain (MyHC). In addition, withdrawal from the cell cycle leading to a post-mitotic state of C2C12 myotubes was confirmed by the absence of BrdU labeling of myotubes but not myoblasts.

Infection of terminally differentiated C2C12 myotubes, proliferating C2C12 myoblasts and NIH3T3 control fibroblasts with *T. gondii* revealed higher expression of the bradyzoite specific genes *BAG1* and *ENO1* and increased cyst formation in differentiated myotubes as compared to myoblasts and fibroblasts. Additionally, parasite replication was clearly lower in myotubes than in C2C12 myoblasts or NIH3T3 fibroblasts. These data for the first time highlight the importance of the cell type and the state of terminal differentiation of SkMC myotubes for the *T. gondii* development and for the formation of potentially persisting bradyzoites.

In order to identify cell type-specific interactions of *T. gondii* with its host cell, we used high-throughput RNA sequencing to analyse the parasite and host cell transcriptomes before and after 24 hours of infection of terminally differentiated SkMCs and neurons as well as actively proliferating fibroblasts and astrocytes. The analyses showed a significantly higher impact of the host cell type-specific gene expression on the transcriptome of the four cell types than the changes in gene expression due to a *Toxoplasma* infection. However, the results also identified some distinctive gene clusters that were similarly expressed in terminally differentiated neurons and SkMCs but differently expressed in fibroblasts and astrocytes. Remarkably, after infection of SkMCs and neurons but not astrocytes or fibroblasts with *T. gondii*, the parasite-triggered host cell transcriptomes were particularly enriched for genes encoding cell cycle regulators, indicating their potential involvement in the *Toxoplasma* stage

conversion. Therefore, the expression profiles of selected host cell cycle regulators were determined by RT-qPCR and immunoblotting in the course of C2C12 SkMC terminal differentiation and *Toxoplasma* infection. The expression of both the negative cell cycle regulators Tspyl2 and its downstream target gene p21 increased during myogenic differentiation. This was accompanied by a decrease in expression of the cell cycle activators CyclinB1 and Uhrf1. After parasite infection, Tspyl2 but not p21 expression further increased in infected myotubes as compared to myoblasts and fibroblasts. Remarkably, CyclinB1 and Uhrf1 also increased specifically in differentiated SkMCs, but not myoblasts or fibroblasts after infection suggesting partial activation of the SkMCs cell cycle. However, BrdU labeling clearly demonstrated that the cell cycle arrest of terminally differentiated myotubes was nevertheless not abrogated by *T. gondii* infection.

Since overexpression of the negative cell cycle regulator CDA1 (the human *Tspyl2* ortholog) favours bradyzoite formation in human fibroblasts, we investigated the functional importance of Tspyl2 for SkMC differentiation and *Toxoplasma* development in SkMCs by RNA interference. Knock-down of Tspyl2 inhibited C2C12 myoblast differentiation towards polynucleated myotubes. Interestingly, this was accompanied by increased parasite replication and repression of bradyzoite formation as well as tissue cyst formation after infection of two selected Tspyl2-shRNA-C2C12 transfectants as compared to wild type myotubes and control transfectants. Together, these data indicate a crucial impact of expression of Tspyl2 and the state of terminal differentiation of SkMCs for triggering stage conversion of *T. gondii*.

Differentiation of SkMC to polynucleated myotubes caused altered expression profiles of cytokines and chemokines in C2C12 myotubes as compared to myoblasts and control fibroblasts. Furthermore, several pro-inflammatory cytokines (IL-23, IL-1 α and IL-1 β) and the chemokine CCL2 were expressed at significantly higher levels in myotubes than in myoblasts or fibroblasts after infection. Together, this indicated the potential importance of pro-inflammatory immune factors, besides cell cycle regulators, in the cell type-specific *Toxoplasma* stage conversion in differentiated SkMC.

In this study, it was shown for the first time that the negative cell cycle regulator Tspyl2 and the differentiation state of syncytial SkMC myotubes clearly influences *Toxoplasma* stage conversion and cysts formation. Since myogenic terminal differentiation is initiated by cell cycle regulators (like Tspyl2) and their expressions are obviously influenced by *T. gondii* infection, parasite-induced up-regulation of cell cycle regulators as shown herein might facilitate spontaneous stage differentiation of fast-replicating tachyzoites to persisting

bradyzoites in SkMCs. Furthermore, myotubes respond to *Toxoplasma* infection with the increased expression of proinflammatory molecules, thereby presumably contributing to the local immune response to the parasite.

6 Literatur

- Abelmann, A.** (2013). „Genotyp-spezifische Interaktionen von *Toxoplasma gondii* mit Skelettmuskelzellen der Maus in vitro“. Bachelorarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Georg-August Universität, Göttingen.
- Aigner, C.P., Silva, A.V., Sandrini, F., Osório, P.S., Poiares, L., Largura, A.** (2010). “Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Nov;105(7):935-937.
- Al-Khalili, L., Bouzakri, K., Glund, S., Lönnqvist, F., Koistinen, H.A., Krook, A.** (2006). “Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle”. *Mol Endocrinol*. Dec;20(12):3364-3375.
- Andrade, E.F., Carvalho, L., Barbosa, H.S.** (1999). “Association of lipids during *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction”. *Acta Microscopy* 8:423–424.
- Araújo Jorge, T.C., Barbosa, H.S., Moreira, A.L., De Souza, W., Meirelles, M.N.Z.** (1986). “The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle”. *Parasitenkd.* 72(5):577-584.
- 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. I:153-154.
- Barsoum, R.S.** (2006). “Parasitic infections in transplant recipients”. *Nat Clin Pract Nephrol*. Sep;2(9):490-503.
- Bennett, A.M. & Tonks, N.K.** (1997) “Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases”. *Science*. Nov 14;278(5341):1288-1291.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Rudnicki, M.A.** (2012). „Building muscle: molecular regulation of myogenesis“. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Feb 1;4(2)
- Bianchi, C. & Zangi, R.** (2013). “UHRF1 discriminates against binding to fully-methylated CpG-Sites by steric repulsion”. *Biophys Chem*. Jan;171:38-45.
- Blader, I.J., Manger, I.D., Boothroyd, J.C.** (2001). “Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells”. *J Biol Chem*. Jun 29;276(26)
- Blader, I.J., Saeij, J.P.** (2009). “Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence.” *APMIS* 117(5-6): 458-476.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U.** (1993a). “Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody”. *Parasitol Res.* 79, 485-487.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U.** (1993b). “Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages”. *Infect Immun* Mar; 61,1141-1145.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U.** (1994). „Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion”. *Infect Immun*. May; 62(5):1761-1767.
- Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y.** (2005). “What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis*? A comparable study between knockout mice and wild type mice”. *Parasitology*. Nov; 131(Pt 5):705-712.
- Bouzahzah, B., Yurchenko, V., Nagajyothi, F., Hulit, J., Sadofsky, M., Braunstein, V.L., Mukherjee, S., Weiss, H., Machado, F.S., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., Tanowitz, H.B. and C. Albanese** (2008). “Regulation of host cell cyclin D1 by *Trypanosoma cruzi* in myoblasts”. *Cell Cycle*. Feb 15;7(4):500-503.
- Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., Rando, T.A.** (2008). “A temporal switch from Notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis”. *Cell Stem Cell* Jan 10; 2: 50–59.
- Brennessel, D.J., Wittner, M., Braunstein, V., Tanowitz, H.B.** (1985). “Acetylcholinesterase Levels in Skeletal Muscle of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*”. *Am J Trop Med Hyg.* May 34:460-464.

- Brooks, G.A.** (2007). "Lactate: link between glycolytic and oxidative metabolism". *Sports Med.* 37(4-5):341-343.
- Brunet, J., Pfaff, A.W., Abidi, A., Unoki, M., Nakamura, Y., Guinard, M., Klein, J.P., Candolfi, E., Mousli, M.** (2008). "Toxoplasma gondii exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation". *Cell Microbiol.* Apr;10(4):908-920.
- Brunetti, A. & Golfine, I. D.** (1990). "Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor". *J. Biol. Chem.* Apr 15; 265, 5960-5963.
- Burattini, S., Ferri, P., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., Falcieri, E.** (2004). "C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization". *Eur J Histochem.* Jul-Sep;48(3):223-233.
- Carruthers, V.B.** (2002). "Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*". *Acta Tropica.* Feb; 81 (2): 111–122.
- Casadei, L., Vallorani, L., Gioacchini, A.M., Guescini, M., Burattini, S., D'Emilio, A., Biagiotti, L., Falcieri, E., Stocchi, V.** (2009). "Proteomics-based investigation in C2C12 myoblast differentiation". *Eur J Histochem.* Dec 1;53(4):261-268.
- Chai, Z., Sarcevic, B., Mawson, A., Toh, B.H.** (2001). "SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth". *J Biol Chem Sept 7;* 276: 33665–33674.
- Chang, H.R., Grau, G.E., Pechère, J.C.** (1990). "Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*". *Immunology.* Jan; 69(1):33-37.
- Chargé, S.B., Rudnicki, M.A.** (2004). „Cellular and molecular regulation of muscle regeneration“. *Physiol Rev.* Jan;84(1):209-238.
- Conejo, R., Valverde, A.M., Benito, M., Lorenzo, M.** (2001). „Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities“. *J Cell Physiol.* Jan;186(1):82-94.
- Charron, A.J., Sibley, L.D.** (2004). "Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*". *Traffic.* Nov;5(11):855-867.
- Chaussabel, D., Semnani, R.T., McDowell, M.A., Sacks, D., Sher, A., Nutman, T.B.** (2003). "Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites". *Blood.* Jul 15;102(2):672-681.
- Chen, S., Zhang, Q., Wu, X., Schultz, P.G., Ding, S.** (2004). "Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule". *J. Am. Chem. Soc.* Jan 21; 126, 410–411.
- Chen, S.E., Jin, B., Li, Y.P.** (2007). "TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK". *Am J Physiol Cell Physiol.* May;292(5):C1660-1671.
- Chen, X., Mao, Z., Liu, S., Liu, H., Wang, X., Wu, H., Wu, Y., Zhao, T., Fan, W., Li, Y., Yew, D.T., Kindler, P.M., Li, L., He, Q., Qian, L., Wang, X., Fan, M.** (2005). "Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro". *Mol Biol Cell.* Jul 16 (7):3140–3151.
- Clemente, C.F., Corat, M.A., Saad, S.T., Franchini, K.G.** (2005). "Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signalling". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Sep;289(3):862-870.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F., Sher, A., Taylor, G.A.** (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.* Jul 16;194:181–188.
- Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T.** (2000). "Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicentre case-control study". *BMJ.* Jul 15;321(7254):142-147.
- Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gâtel, D., Tardieux, I.** (2006). "CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain". *Blood.* Jan 1;107(1):309-316.
- Curci, R., Battistelli, M., Burattini, S., D'Emilio, A., Ferri, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Falcieri, E.** (2008). "Surface and inner cell behaviour along skeletal

- muscle cell in vitro differentiation". *Micron*. Oct;39(7):843-851.
- Da Gama, L.M., Ribeiro-Gomes, F.L., Guimara, U. Jr, Arnholdt, A.C.V. (2004).** "Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *T. gondii*". *Microbes Infect.* Nov 6:1287–1296.
- Dardé, M.L. (2008).** "Toxoplasma gondii, "new" genotypes and virulence". *Parasite*. Sep;15(3):366-371.
- Datto, M.B, Li, Y., Panus, J.F., Howe,D.J., Xiong, Y., Wang. X.Y. (1995).** "Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism". *Proc Natl Acad Sci U S A*. June 6; 92(12): 5545–5549.
- De Champs, C., Imbert-Bernard, C., Belmeguenai, A., Ricard, J., Pelloux, H., Brambilla, E., Ambroise-Thomas, P. (1997).** "Toxoplasma gondii: in vivo and in vitro cystogenesis of the virulent RH strain". *J Parasitol.* Feb;83(1):152-155.
- de Laszlo, S.E., Hacker, C., Li, B., Kim, D., MacCoss, M., Mantlo, N., Pivnichny, J.V., Colwell, L., Koch, G.E., Cascieri, M.A., Haggmann, W.K. (1999).** "Potent, orally absorbed glucagon receptor antagonists". *Bioorg Med Chem Lett.* Mar 9;5: 641–646.
- De Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., Da Costa, J.M., Dardé, M.L., Thulliez, P. & Dubey, J.P. (2006).** "Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal". *Veterinary Parasitology.* Jan 30;135, 133-136.
- Delbridge, M.L., Longepied, G., Depetris, D., Mattei, M.G., Disteche, C.M., Marshall Graves, J.A., Mitchell, M.J. (2004).** "TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X - implications for Y chromosome evolution". *Chromosome Res.* 12(4):345-356.
- Deldicque, L., Theisen, D., Bertrand, L., Hespel, P., Hue, L., Francaux, M. (2007).** „Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways“. *Am J Physiol Cell Physiol.* Oct;293(4):C1263-1271.
- Delgado, I., Huang, X., Jones, S., Zhang, L., Hatcher, R., Gao, B., Zhang, P. (2003).** "Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro". *Genomics.* Aug;82(2):109-121.
- Denney, C.F., Eckmann, L., Reed, S.L. (1999).** "Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection". *Infect Immun.* Apr;67(4):1547-52.
- Derouin, F. & Pelloux, H. (2008).** "Prevention of toxoplasmosis in transplant patients". *Clin Microbiol Infect.* Dec;14(12):1089-1101.
- Despommier, D.D. (1998).** "How does *Trichinella spiralis* make itself at home?". *Parasitol Today.* Aug 14(8):318–323.
- Donald, R.G., Allocco, J., Singh, S.B., Nare, B., Salowe, S.P., Wiltsie, J., Liberator, P.A. (2002).** "Toxoplasma gondii cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase". *Eukaryot Cell.* Jun;1(3):317-328.
- Dubey, J.P. & Beattie, C.P. (1988).** "Toxoplasmosis of Animals and Man". *J Med Microbiol.* (30),302
- Dubey, J.P. (2010).** "Toxoplasma gondii Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance". *Zoonoses and Public Health.* Feb 57(1):60–73.
- Dubey, J.P., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Vianna, M.C., Marcet, P.L., Lehmann, T. (2006).** "Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil". *J Parasitol.* Feb;92(1):36-40
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Jones, J.L. (2005).** "Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers". *J Parasitol.* Oct; 91:1082–1093.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A. (1998).** "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts". *Clin Microbiol Rev.* Apr 11(2):267-299.
- Dubey, J.P., Patitucci, A.N., Su, C., Sundar, N., Kwok, O.C., Shen, S.K. (2006).** "Characterization

- of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America". Vet Parasitol. Aug 31;140(1-2):76-82.
- Duckmanton, A., Kumar, A., Chang, Y.T., Brockes, J.P.** (2005). "A single-cell analysis of myogenic dedifferentiation induced by small molecules". Chem Biol. Oct;12(10):1117-1126.
- Dvorak, J.A., Crane, M.S.** (1981). „Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites“. Science. Nov 27;214(4524):1034-1036.
- Dvorak, J.A., Howe, C.L.** (1977). "Toxoplasma gondii-Vertebrate Cell Interactions. I. The Influence of Bicarbonate Ion, CO₂, pH and Host Cell Culture Age on the Invasion of Vertebrate Cells In Vitro". J Protoz. Aug; 24 (3): 416–419.
- Dvorak, J.A., Howe, C.L.** (1979). "Toxoplasma gondii-Vertebrate Cell Interactions. II. The Intracellular Reproductive Phase". J Protoz. Feb; 26 (1): 114–116.
- Dzierszinski, F., Nishi, M., Ouko, L., Roos, D.S.** (2004). "Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation". Eukaryot Cell. Aug;3(4):992-1003.
- Eichmüller, S, Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., Schadendorf, D.** (2001). „Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens“. PNAS. Jan 16, 98(2): 629-634.
- Ewton DZ, Spizz G, Olson EN, Florini JR.** (1988). "Decrease in transforming growth factor-beta binding and action during differentiation in muscle cells". J Biol Chem. Mar 15;263(8):4029-4032.
- 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. Mar 9;34(3):347-360.
- Ferreira da Silva, M.F., Mendonça Rodrigues, R., Ferreira de Andrade, E., de Carvalho, L., Gross, U., Lüder, C.G.K., Barbosa, H.S.** (2009a). "Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Mar 104(2).
- Ferreira da Silva, M.F., Takács, A.C., Barbosa, H.S., Gross, U., Lüder, C.G.** (2009b). "Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts". Int J Med Microbiol. Jun;299(5):381-388.
- Ferreira da Silva, Mda F., Barbosa, H.S., Gross, U., Lüder, C.G.** (2008). "Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*". Mol Biosyst. Aug;4(8):824-834.
- Fox, B.A., Gigley, J.P., Bzik, D.J.** (2004). "Toxoplasma gondii lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation". Int J Parasitol. Mar 9;34(3):323-331.
- Fuentes, I., Rubio, J.M., Ramírez, C., Alvar, J.** (2001). „Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples“. J Clin Microbiol. April; 39(4): 1566–1570.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A., Sartorelli, V.** (2008). "Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt". Dev Cell. May;14(5):661-673.
- Gail M, Gross U, Bohne W.** (2001). "Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization". Mol Genet Genomics. Jul;265(5):905-912.
- Gaji, R.Y., Behnke, M.S., Lehmann, M.M., White, M.W., Carruthers, V.B.** (2011). "Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression". Mol Microbiol. Jan;79(1):192-204.
- Gashler, A., Sukhatme, V.P.** (1995). "Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors". Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 50: 191–224.
- Gazzinelli, R.T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J.M., Sher, A.** (1996). "Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*". Curr Top Microbiol Immunol. 219:127-139.
- Gerrard, J.M. & Robinson, P.** (1989). "Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin". Biochim Biophys Acta. Feb 20;1001(3):282-285.

- Gillis LD, Leidal AM, Hill R, Lee PW. (2009). "p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage". *Cell Cycle*. Jan 15;8(2):253-256.
- Godin, J.D., Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., Purnelle, A., Raineteau, O., Campbell, K., Fero, M., Moonen, G., Malgrange, B., Chariot, A., Metin, C., Besson, A., Nguyen, L. (2012). "p27 (Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration". *Dev Cell*. Oct 16;23(4):729-744.
- Gomes, A.F., Guimarães, E.V., Carvalho, L., Correa, J.R., Mendonça-Lima, L., Barbosa, H.S. (2011). "Toxoplasma gondii down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis". *BMC Microbiol*. May 18;11:110.
- Grimwood, J., Mineo, J.R., Kasper, L.H. (1996). "Attachment of Toxoplasma gondii to host cells is host cell cycle dependent". *Infect Immun*. Oct;64(10):4099-4104.
- Gross, U. (2004). "Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 47(7):692-697.
- Gross, U., Bohne, W., Soëte, M., Dubremetz, J.F. (1996). "Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of Toxoplasma gondii". *Parasitol Today*. Jan;12(1):30-33.
- Guimarães, E.V., Carvalho, L.D., Barbosa, H.S. (2009). "Interaction and cystogenesis of Toxoplasma gondii within skeletal muscle cells in vitro". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Mar;104(2):170-174.
- Guimarães, E.V., de Carvalho, L., Barbosa, H.S. (2008). "Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of Toxoplasma gondii cystogenesis". *J Parasitol*. Feb;94(1):72-83.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C., Walsh, K. (1995). "MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation". *Mol Cell Biol* July 15(7):3823-3829.
- Gurnett A.M., Liberator, P.A., Dulski, P.M., Salowe, S.P., Donald, R.G., Anderson, J.W., Wiltsie, J., Diaz, C.A., Harris, G., Chang, B., Darkin-Rattray, S.J., Nare, B., Crumley, T., Blum, P.S., Misura, A.S., Tamas, T., Sardana, M.K., Yuan, J., Biftu, T., Schmatz, D.M. (2002). "Purification and molecular characterization of cGMP-dependent protein kinase from Apicomplexan parasites. A novel chemotherapeutic target". *J Biol Chem*. May 3;277(18):15913-15922.
- Hassan, G.S., Mukherjee, S., Nagajyothi, F., Weiss, L.M., Petkova, S.B., de Almeida, C.J., Huang, H., Desruisseaux, M.S., Bouzahzah, B., Pestell, R.G., Albanese, C., Christ, G.J., Lisanti, M.P., Tanowitz, H.B. (2006). "Trypanosoma cruzi infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells". *Infect Immun*. Jan;74(1):152-159.
- Henriquez, D., Piras, R., Piras, M.M. (1981). "The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes". *Mol Biochem Parasitol*. Apr;2(5-6):359-366.
- Herrmann, D.C., Bärwald, A., Maksimov, A., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Conraths, F.J., Schares, G. (2012). "Toxoplasma gondii sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III". *Vet Res*. Apr 30;43:39.
- Hoene, M., Runge, H., Häring, H.U., Schleicher, E.D., Weigert, C. (2012). "Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway". *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan 15;304(2):C128-136.
- Holm, S. (1979). "A simple sequentially rejective multiple test procedure". *Scandinavian Journal of Statistics*. 6(2): 65-70.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H. (2000). "Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR". *Int J Parasitol*. Jan;30(1):69-75.
- Howarth, C., Gleeson, P., Attwell, D. (2012). "Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum". *J Cereb Blood Flow Metab*. Jul;32(7):1222-1232.
- Howe, D.K. & Sibley, L.D. (1995). "Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease". *J Infect Dis*. Dec 172(6):1561-1566.

- Hu, G., Lee, H., Price, S.M., Shen, M.M., Abate-Shen, C.** (2001). "Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclonD1". Development. Jun;128, 2373-2384.
- Huang, H., Petkova, S.B., Cohen, A.W., Bouzahzah, B., Chan, J., Zhou, J.N., Factor, S.M., Weiss, L.M., Krishnamachary, M., Mukherjee, S., Wittner, M., Kitsis, R.N., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., Albanese, C., Tanowitz, H.B.** (2003). "Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis". Infect. Immun. May; 71 (5): 2859–2867.
- Hunter, C.A., Chizzonite, R., Remington, J.S.** (1995). "IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens". J Immunol. Nov 1;155(9):4347-4354.
- Ito, T., Tsukumo, S., Suzuki, N., Motohashi, H., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., Lin, T.M., Peterson, R.E., Tohyama, C., Nohara, K.** (2004). "A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest". J Biol Chem. Jun 11;279(24):25204-25210.
- Jacobs, L.** (1967). "Toxoplasma and toxoplasmosis". Adv Parasitol. 5:1–45.
- Janot, M., Audfray, A., Loriol, C., Germot, A., Maftah, A., Dupuy, F.** (2009). "Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates". BMC Genomics. Oct 20;10:483.
- Jasmer, D.P.** (1993). "Trichinella spiralis infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression". J Cell Biol. May 2;121:785–793.
- Jasmer, D.P., Neary, S.M.** (1994). "Trichinella spiralis: inhibition of muscle larva growth and development is associated with a delay in expression of infected skeletal muscle characteristics". Exp Parasitol. 78:317–325.
- Jia, B., Lu, H., Liu, Q., Yin, J., Jiang, N., Chen, Q.** (2013). "Genome-wide comparative analysis revealed significant transcriptome changes in mice after Toxoplasma gondii infection". Parasit Vectors. Jun 4;6:161.
- Jones, J.L. & Dubey, J.P.** (2012). "Foodborne toxoplasmosis". Clin Infect Dis. Sep;55(6):845-851.
- Judith Campisi, J. & d'Adda di Fagagna F.** (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells". Nature Reviews Molecular Cell Biology. Sept 8, 729-740.
- Kaever, A., Landesfeind, M., Possienke, M., Feussner, K., Feussner, I., Meinicke, P.** (2012). "MarVis-Filter: Ranking, Filtering, Adduct and Isotope Correction of Mass Spectrometry Data". J Biomed and Biotech.
- Kaever, A., Lingner, T., Feussner, K., Göbel, C., Feussner, I., Meinicke, P.** (2009). "MarVis: a tool for clustering and visualization of metabolic biomarkers". BMC Bioinformatic. 10:92.
- Kaliman P, Viñals F, Testar X, Palacín M, Zorzano A.** (1996). "Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells". J Biol Chem. Aug 9;271(32):19146-19151.
- Kapperud, G., Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A., Eng, J.** (1996). "Risk factors for Toxoplasma gondii infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway". Am J Epidemiol. Aug 15;144: 405-412.
- Katsube, Y., Hagiwara, T., Ueda, K., Miyakawa, H., Imaizumi, K.** (1967). "Studies on toxoplasmosis. I. Isolation of Toxoplasma from muscles of human, dogs, and cats". Jpn J Med Sci Biol. 1967 Oct;20(5):413-419.
- Kikumura, A., Ishikawa, T., Norose, K.** (2012). "Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis". Br J Ophthalmol. Sep;96(9):1259-1267.
- Kim, J.M., Oh, Y.K., Kim, Y.J., Cho, S.J., Ahn, M.H., Cho, Y.J.** (2001). "Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to Toxoplasma gondii infection". Parasitol Res. Sep;87(9):758-763.
- Kim, J.S., Saengsirisuwan, V., Sloniger, J.A., Teachey, M.K., Henriksen, E.** (2006). "Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: roles of insulin signaling and p38 MAPK". J Free Radic Biol Med. Sep 1;41(5):818-824.

- Kim, L., Denkers, E.Y.** (2006). "Toxoplasma gondii triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis". *J Cell Sci.* May 15;119(Pt 10):2119-2126.
- Kim, S.K., Fouts, A.E., Boothroyd, J.C.** (2007). "Toxoplasma gondii dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling". *J Immunol.* Apr 15;178(8):5154-5165
- Kirkman, L.A., Weiss, L.M., Kim, K.** (2001). "Cyclic nucleotide signaling in Toxoplasma gondii bradyzoite differentiation". *Infect Immun.* Jan;69(1):148-153
- Kislinger, T., Gramolini, A.O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D.H., Emili, A.** (2005). "Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation". *Mol Cell Proteomics.* Jul;4(7):887-901.
- Kitamura, A., Maekawa, Y., Uehara, H., Izumi, K., Kawachi, I., Nishizawa, M., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Standley, D.M., Tanaka, K., Hamazaki, J., Murata, S., Obara, K., Toyoshima, I., Yasutomo, K.** (2011). "A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans". *J Clin Invest.* Oct;121(10):4150-4160
- Knight, B.C., Brunton, C.L., Modi, N.C., Wallace, G.R., Stanford, M.R.** (2005). "The effect of Toxoplasma gondii infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells". *J Neuroimmunol.* Mar;160(1-2):41-47
- Knight, B.C., Kissane, S., Falciani, F., Salmon, M., Stanford, M.R., Wallace, G.R.** (2006). "Expression analysis of immune response genes of Müller cells infected with Toxoplasma gondii". *J Neuroimmunol.* Oct;179 (1-2):126-131
- Krylov, S.N., Zhang, Z., Chan, N.W., Arriaga, E., Palcic, M.M., Dovichi, N.J.** (1999). "Correlating cell cycle with metabolism in single cells: combination of image and metabolic cytometry". *Cytometry.* Sep 1;37(1):14-20
- Laliberté, J., Carruthers, V.B.** (2008). "Host cell manipulation by the human pathogen Toxoplasma gondii". *Cell Mol Life Sci.* Jun;65(12):1900-1915
- Lambert, H., Hitzinger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., Barragan, A.** (2006). "Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination". *Cell Microbiol.* Oct 8:1611-1623.
- Lang, C., Hildebrandt, A., Brand, F., Opitz, L., Dihazi, H., Lüder, C.G.** (2012). "Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of Toxoplasma gondii-Infected macrophages to IFN- γ ". *PLoS Pathog.* Jan;8(1).
- Lavine, M.D., Arrizabalaga, G.** (2009). "Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by Toxoplasma gondii enhances parasite invasion". *Mol Biochem Parasitol.* March 164(1): 95-99.
- Lawson, M.A., Purslow, P.P.** (2000). "Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific". *Cells Tissues Organs.* 167(2-3):130-137.
- Leaner, V.D., Kinoshita, I., Birrer, M.J.** (2003). "AP-1 complexes containing cJun and JunB cause cellular transformation of Rat1a fibroblasts and share transcriptional targets". *Oncogene* Aug 28;22(36): 5619-5629.
- Li, Y., Jiang, B., Ensign, W.Y., Vogt, P.K., Han, J.** (2000). "Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase". *Cell Signal.* Dec;12(11-12):751-751.
- Liao, Y., Shikapwashya, O.N., Shteyer, E., Dieckgraefe, B.K., Hruz, P.W., Rudnick, D.A.** (2004). "Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice". *J Biol Chem.* Oct 8;279(41):43107-43116.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., Toivio-Kinnucan, M.** (1991). "Examination of tissue cyst formation by Toxoplasma gondii in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites". *J Parasitol.* Feb;77(1):126-132.
- Lluís, F., Perdiguero, E., Nebreda, A.R., Muñoz-Cánoves, P.** (2005). "Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases". *Trends Cell Biol.* Jan;16(1):36-44.
- Lüder, C.G., Giraldo-Velásquez, M., Sendtner, M., Gross, U.** (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.* Sep;93(1):23-32.

- Ludewig, M., de Buhr, K., Fehlhaber, K.** (2007). „Toxoplasma gondii - Seroprävalenz in Mastschweinebeständen. Ergebnisse aus einer deutschlandweiten Studie“. J. Verbr. Lebensm. 2: 454-456.
- MacLaren, A., Attias, M., de Souza, W.** (2004). “Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils”. Vet Parasitol. Nov 10;125(3-4):301-312.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T.** (1995). “p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage”. Genes Dev. Apr 15;9(8):935-944.
- Martelli, F., Cenciarelli, C., Santarelli, G., Polikar, B., Felsani, A., Caruso, M.** (1994). “MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation”. Oncogene Dec 9:3579–3590.
- Martinez, A., Ozbun, L.L., Angdisen, J., Jakowlew, S.B.** (2002). “Expression of Differentially Expressed Nucleolar Transforming Growth Factor β 1 Target (DENTT) in Adult Mouse Tissues”. Dev Dynamics. June 29(6) 224:186–199.
- McCullagh, K.J.A., Juel, C., O'Brien, M., Bonen, A.** (1996). “Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle”. Mol. Cell. Biochem. Mar 9;156:51–57.
- McDermott, J.C., Bonen, A.** (1993). “Endurance training increases skeletal muscle lactate transport”. Acta Physiol. Scand. Mar 147:323–327.
- McGann, C.J., Odelberg, S.J., Keating, M.T.** (2001). „Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract”. Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 20;98:13699–704.
- Meirelles, M.N., de Araujo-Jorge, T.C., Miranda, C.F., de Souza, W., Barbosa, H.S.** (1986). “Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro”. Eur J Cell Biol. Aug;41(2):198-206.
- Molestina, R.E., El-Guendy, N., Sinai, A.P.** (2008). “Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle”. Cell Microbiol. May;10(5):1153-1165.
- Molestina, R.E., Sinai, A.P.** (2005). “Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection”. J Cell Sci. Dec 15;118(Pt 24):5785-5796.
- Mordue, D.G., Håkansson, S., Niesman, I., Sibley, L.D.** (1999). “*Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways”. Exp Parasitol. Jun;92(2):87-99.
- Moser, L.A., Pollard, A.M., Knoll, L.J.** (2013). “A genome-wide siRNA screen to identify host factors necessary for growth of the parasite *Toxoplasma gondii*”. PLoS One. Jun 28;8(6).
- Mu, X, Li, Y.** (2011). “Conditional TGF- β 1 treatment increases stem cell-like cell population in myoblasts”. J Cell Mol Med. Mar;15(3):679-690.
- Mukherjee, S., Huang, H., Petkova, S.B., Albanese, C., Pestell, R.G., Braunstein, V.L., Christ, G.J., Wittner, M., Lisanti, M.P., Berman J.W., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B.** (2004). “*Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells”. Infect Immun. Sep;72(9):5274-5282.
- Muñoz, M., Heimesaat, M.M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I.R., Wolk, K., Loddenkemper, C., Krell, H.W., Libert, C., Lund, L.R., Frey, O., Hölscher, C., Iwakura, Y., Ghilardi, N., Ouyang, W., Kamradt, T., Sabat, R., Liesenfeld, O.** (2009). “Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17”. J Exp Med. Dec 21;206(13):3047-3059
- Nagineni, C.N., Detrick, B., Hooks, J.J.** (2000). “*Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells”. Infect Immun. Jan;68(1):407-410.
- Nelson, M.M., Jones, A.R., Carmen, J.C., Sinai, A.P., Burchmore, R., Wastling, J.M.** (2008). “Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma*

- gondii". Infect Immun. Feb;76(2):828-844.
- Nguyen, L., Besson, A., Ik-Tsen Heng, J., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M., Guillemot, F.** (2006). "p27 kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex". Genes Dev. June 1; 20(11): 1511–1524.
- Nicolle, C. & Manceaux, L.** (1908). "Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi". Comptes Rendus. (147) 763.
- Nissapatorn, V.** (2009). "Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy". Southeast Asian J Trop Med Public Health. Nov;40(6):1158-1178.
- Odelberg, S.J., Kollhoff, A., Keating, M.T.** (2000). „Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1". Cell. Dec 22;103:1099–1109.
- Ozbun, L.L., Martínez, A., Angdisen, J., Umphress, S., Kang, Y., Wang, M., You, M., Jakowlew, S.B.** (2003). "Differentially expressed nucleolar TGF-beta1 target (DENTT) in mouse development". Dev Dyn. Mar;226(3):491-511.
- Ozbun, L.L., You, L., Kiang, S., Angdisen, J., Martinez, A., Jakowlew, S.B.** (2001). "Identification of differentially expressed nucleolar TGF-beta1 target (DENTT) in human lung cancer cells that is a new member of the TSPY/SET/NAP-1 superfamily". Genomics. Apr 15;73(2): 179–193.
- Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M.E.** (2009). "Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis". Int J Parasitol. Oct;39(12):1385-94.
- Pedram, A., Razandi, M., Hu, R.-M., Levin, E.R.** (1998). "Astrocyte Progression from G1 to S Phase of the Cell Cycle Depends upon Multiple Protein Interaction". J Biol Chem. May 29;273(22):13966-13972.
- Pfefferkorn ER.** (1984). „Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan". Proc Natl Acad Sci U S A. Feb;81(3):908-912.
- Radke, J.R. & White, M.W.** (1998). "A cell cycle model for the tachyzoite of Toxoplasma gondii using the Herpes simplex virus thymidine kinase". Mol Biochem Parasitol. Aug 1;94(2):237-247.
- Radke, J.R., Guerini, M.N., Jerome, M., White, M.W.** (2003). "A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in Toxoplasma gondii". Mol Biochem Parasitol. Oct;131(2):119-127.
- Radke, R.J., Donald, R.G., Eibs, A., Jerome, M.E., Behnke, M.S., Liberator, P., White, M.W.** (2006). "Changes in the Expression of Human Cell Division Autoantigen-1 Influence Toxoplasma gondii Growth and Development". PLoS Pathog. Oct; 2(10)
- Rajan, S., Chu Pham Dang, H., Djambazian, H., Zuzan, H., Fedyshyn, Y., Ketela, T., Moffat, J., Hudson, T.J., Sladek, R.** (2012). "Analysis of early C2C12 myogenesis identifies stably and differentially expressed transcriptional regulators whose knock-down inhibits myoblast differentiation". Physiol Genomics. Feb 1;44(2):183-197.
- Robert, S., Porter, M.D., Kaplan, J.L.** (2011). "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" 19th Edition; Merck Sharp & Dohme Corp., A Subsidiary of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.
- Roghmann, M.C., Faulkner, C.T., Lefkowitz, A., Patton, S., Zimmerman, J., Morris, J.G. Jr.** (1999). "Decreased seroprevalence for Toxoplasma gondii in Seventh Day Adventists in Maryland". Am J Trop Med Hyg. May;60(5):790-792.
- Rowin, K.S., Tanowitz, H.B., Wittner, M., Nguyen, H.T., Nadal-Ginard, B.** (1983). "Inhibition of muscle differentiation by trypanosoma cruzi". Proc Natl Acad Sci U S A. Oct;80(20):6390-6394.
- Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A.** (2000). "The molecular regulation of myogenesis". Clin Genet. Jan;57(1):16-25.
- Schlüter, D., Deckert, M., Hof, H., Frei, K.** (2001). „Toxoplasma gondii infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of T. gondii". Infect Immun. Dec;69(12):7889-7893.

- Schwab, J.C., Beckers, C.J., Joiner, K.A.** (1994). „The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve”. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 18;91(2):509-513.
- Shen, X., Collier, J.M., Hlaing, M., Zhang, L., Delshad, E.H., Bristow, J., Bernstein, H.S.** (2003). „Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation”. Dev Dyn. Jan;226(1):128-138.
- Sibley, L.D. & Ajioka, J.W.** (2008). “Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps”. Annu Rev Microbiol. 62:329-351.
- Sibley, L.D., Weidner, E., Krahenbuhl, J.L.** (1985). „Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*”. Nature. May 30-Jun 5;315(6018):416-419.
- Siim, J.C. & Nissen, N.I.** (1958). “Toxoplasmosis acquisita lymphonodosa in a 62-year-old woman; isolation of *Toxoplasma gondii* from lymph node and muscle biopsies”. Acta Pathol Microbiol Scand. 43(3):298-304.
- Sinai, A.P., Webster, P., Joiner, K.A.** (1997). „Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction”. J Cell Sci. Sep;110 (Pt 17):2117-2128.
- Soète, M. & Dubremetz, J.F.** (1996). “*Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro”. Curr Top Microbiol Immunol. 219:76-80.
- Soète, M., Camus, D., Dubremetz, J.F.** (1994). “Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro”. Exp Parasitol. Jun;78(4):361-370.
- Spear, W., Chan, D., Coppens, I., Johnson, R.S., Giaccia, A., Blader, I.J.** (2006). “The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels”. Cell Microbiol. Feb;8(2):339-352.
- Sun, G., Yuen Chan, S., Yuan, Y., Wang Chan, K., Qiu, G., Sun, K., Ping Leung, M.** (2002). “Isolation of differentially expressed genes in human heart tissues”. Biochim Biophys Acta. Dec 12;1588(3):241-6.
- Suzuki, Y., Sa, Q., Gehman, M., Ochiai, E.** (2011). “Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain”. Expert Rev Mol Med. Oct 4;13.
- Swierzy, I.J., Muhammad, M., Kroll, J., Abelmann, A., Tenter, A.M., Lüder, C.G.** (2013). “*Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission”. Int J Parasitol. Oct 30.
- Takács, A.C., Swierzy, I.J., Lüder, C.G.** (2012). “Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. PLoS One. Sep 12;7(9).
- Tannu, N.S., Rao, V.K., Chaudhary, R.M., Giorgianni, F., Saeed, A.E., Gao, Y., Raghov, R.** (2004). “Comparative proteomes of the proliferating C2C12 myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program”. Molecular & Cellular Proteomics. Nov. 1(3): 1065-1082.
- Tanowitz, H.B., Rowin, K.S., Roistacher, K., Nadal-Ginard, B., Wittner, M.** (1984). “*Trypanosoma cruzi*: reversal of inhibition of host muscle differentiation after exposure to elevated temperatures”. Exp Parasitol. Dec;58(3):307-313.
- Tao, K.P., Fong, S.W., Lu, Z., Ching, Y.P., Chan, K.W., Chan, S.Y.** (2011). “TSPYL2 is important for G1 checkpoint maintenance upon DNA damage”. PLoS One. Jun 6(6).
- Tapscott, S.J.** (2005). “The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription”. Development. Jun;132:2685-2695.
- Tenter, A.M.** (2009) “*Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption”. Mem Inst Oswaldo Cruz. Mar;104(2): 364-369.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M.** (2000). „*Toxoplasma gondii*: from animals to humans”. Int J Parasitol. Nov;30(12-13):1217-1258.

- Toh, B.-H., Tu, Y., Cao, Z., Cooper, M.E., Chai, Z.** (2010). "Role of Cell Division Autoantigen 1 (CDA1) in Cell Proliferation and Fibrosis". Genes. 1(3), 335-348.
- Tomavo, S., Boothroyd, J.C.** (1995). "Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*". Int J Parasitol. Nov;25(11):1293-1299.
- Tu, Y., Wu, W., Wu, T., Cao, Z., Wilkins, R., Toh, B.H., Cooper, M.E., Chai, Z.** (2007). "Antiproliferative autoantigen CDA1 transcriptionally up-regulates p21(Waf1/Cip1) by activating p53 and MEK/ERK1/2 MAPK pathways". J Biol Chem. Apr 20;282(16):11722-11731.
- Tuckwell, D.S., Weston, S.A., Humphries, M.J.** (1993). "Integrins: a review of their structure and mechanisms of ligand binding". Symp. Soc. Exp. Biol., 47, pp. 107-136.
- Valère, A., Garnotel, R., Villena, I., Guenounou, M., Pinon, J.M., Aubert, D.** (2003). "Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion". Parasite. Mar;10(1):59-64.
- Vial, C., Zúñiga, L.M., Cabello-Verrugio, C., Cañón, P., Fadic, R., Brandan, E.** (2008). "Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation". J Cell Physiol. May;215(2):410-421.
- Walker, M.E., Hjort, E.E., Smith, S.S., Tripathi, A., Hornick, J.E., Hinchcliffe, E.H., Archer, W., Hager, K.M.** (2008). "Toxoplasma gondii actively remodels the microtubule network in host cells". Microbes Infect. Nov-Dec;10(14-15):1440-1449.
- Walsh, K. & Perlman, H.** (1997). "Cell cycle exit upon myogenic differentiation". Curr Opin Genet Dev. Oct;7(5):597-602.
- Wang, G.-S., Hong, C.-J., Yen, T.-Y., Huang, H.-Y., Ou, Y., Huang, T.-N., Jung, W.-G., Kuo, T.-Y., Sheng, M., Wang, T.-F., and Hsueh, Y.-P.** (2004). "Transcriptional Modification by a CASK interacting nucleosome assembly protein". Neuron Apr 8;42:113-128.
- Weilhammer, D.R., Iavarone, A.T., Villegas, E.N., Brooks, G.A., Sinai, A.P., Sha, W.C.** (2012). "Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*". Int J Parasitol Sep 42(10):947-959.
- Weiss L.M. & Kim K.** (2000). "The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*". Frontiers in Bioscience Apr 1;5, 391-405.
- Weiss, L.M., Laplace, D., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B., Cali, A., Wittner, M.** (1995). "A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites". J Eukaryot Microbiol. Mar-Apr;42(2):150-157.
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., Kieseier, B.C.** (2005a). "Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment". Trends Immunol. Jul;26(7):373-380.
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., Kieseier, B.C.** (2005b). "Muscle-derived positive and negative regulators of the immune response". Curr Opin Rheumatol. 2005 Nov;17(6):714-719.
- Wiley, M., Sweeney, K.R., Chan, D.A., Brown, K.M., McMurtrey, C., Howard, E.W., Giaccia, A.J., Blader, I.J.** (2010). "Toxoplasma gondii activates hypoxia-inducible factor (HIF) by stabilizing the HIF-1alpha subunit via type I activin-like receptor kinase receptor signalling". J Biol Chem. Aug 27;285(35):26852-26860.
- Wiley, M., Teygong, C., Phelps, E., Radke, J., Blader, I.J.** (2011). "Serum response factor regulates immediate early host gene expression in *Toxoplasma gondii*-infected host cells". PLoS One. Mar 29;6(3).
- Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I., Takahashi, Y.** (2001). "Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection". Parasitology. Jul;123(Pt 1):85-94.
- Wu, Z., Sofronic-Milosavljevic, L.j., Nagano, I., Takahashi, Y.** (2008). "*Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair". Parasit Vectors. Aug 19;1(1):27
- Wu, Z., Woodring, P.J., Bhakta, K.S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J.R., Karin, M., Wang, J.Y., Puri, P.L.** (2000). "p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps". Mol Cell Biol. June 20(11):3951-3964.
- Xiao, J., Jones-Brando, L., Talbot, C.C. Jr, Yolken, R.H.** (2011), "Differential effects of three

- canonical *Toxoplasma* strains on gene expression in human neuroepithelial cells". Infect Immun. 2011 Mar; 79(3):1363-1373.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., Nabeshima, Y.** (1998). "Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'". J Cell Sci. Mar;111 (Pt 6):769-779.
- Youn, J.H., Nam, H.W., Kim, D.J., Park, Y.M., Kim, W.K., Kim, W.S., Choi, W.Y.** (1991). "Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells". Kisaengchunghak Chapchi. Jun;29(2):121-128.
- Yu, L., Hébert, M.C., Zhang, Y.E.** (2002). "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses". EMBO J. Jul 15;21(14):3749-3759.
- Zhang, J.M., Wei, Q., Zhao, X., Paterson, B.M.** (1999a). „Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4". EMBO J. Feb 15;18(4):926-933.
- Zhang, J.M., Zhao, X., Wei, Q., Paterson, B.M.** (1999b). „Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle withdrawal and terminal differentiation". EMBO J. Dec 15;18(24):6983-6993.
- Zhang, Y.W., Halonen, S.K., Ma, Y.F., Wittner, M., Weiss, L.M.** (2001). "Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein". Infect Immun. Jan;69(1):501-507.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Zelltyp-spezifische Interaktionen von *Toxoplasma gondii* und murinen Skelettmuskelzellen
in vitro“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebene Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Izabela Swierzy

Göttingen, 03. Dezember 2013

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Izabela Swierzy
Geburtsdatum	18. 03. 1983
Geburtsort	Groß-Strehlitz
Nationalität	deutsch

Bildungsweg

1998 - 2002	Allgemeinbildende Oberschule in Groß-Strehlitz
09. 2003 – 09. 2010	Biologiestudium an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen mit Abschluss Diplom
Ab Oktober 2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Mikrobiologie (Georg-August Universität Göttingen) Abteilungsleiter: Prof. Dr. rer. nat Carsten Lüder

Stipendien

Stipendium der Georg-August-Universität für die Teilnahme an dem 12ten Internationalen Kongress für Toxoplasmose in Oxford, Großbritannien (22-26 Juni 2013)

Publikationen

Rheinberg A., **Swierzy I.J.**, Nguyen T.D., Horz H.P., Conrads G.

„Cryptic *Streptococcus mutans* 5.6kb plasmids encode a Toxin-Antitoxin system for plasmid stabilization“

Journal of Oral Microbiology 2013, 5: 19729

Takács A.C., **Swierzy I.J.**, Lüder C.G.K.

“Interferon- γ Restricts *Toxoplasma gondii* Development in Murine Skeletal Muscle Cells via Nitric Oxide Production and Immunity-Related GTPases”

PLoS ONE 2012; 7(9)

Swierzy I.J., Muhammad M., Kroll J., Abelmann A., Tenter A.M., Lüder C.G.K.

“*Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission

International Journal for Parasitology 2013; doi: 10.1016/j.ijpara.2013.10.001.

Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden zwischen Oktober 2010 und Januar 2014 in folgenden Publikationen und Kongressbeiträgen präsentiert:

Publikationen

Takács A.C., **Swierzy I.J.**, Lüder C.G.K.

“Interferon- γ Restricts *Toxoplasma gondii* Development in Murine Skeletal Muscle Cells via Nitric Oxide Production and Immunity-Related GTPases”

PLoS ONE 2012; 7(9)

Swierzy I.J., Muhammad M., Kroll J., Abelmann A., Tenter A.M., Lüder C.G.K.

“*Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission

International Journal for Parasitology 2013; doi: 10.1016/j.ijpara.2013.10.001.

Posterpräsentationen

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 09. 2011
Essen | I.J. Swierzy , C.G.K. Lüder
“Development of <i>Toxoplasma gondii</i> in Skeletal Muscle Cells Depends on Differentiation of the Host Cell”
63 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) |
| 10. 2011
Berlin | I.J. Swierzy , C.G.K. Lüder
“Differentiation of the Host Cell impacts <i>Toxoplasma gondii</i> Development in Skeletal Muscle Cells”
Nationales Symposium für Zoonosenforschung (BMBF) |
| 06. 2013
Oxford,
Großbritannien | I.J. Swierzy , U. Händel, A. Kaefer, M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder
“Control of <i>Toxoplasma gondii</i> Development in Skeletal Muscle Cells by Host Cell Cycle Regulators”
12ter Internationaler Kongress für Toxoplasmose |

Vorträge

- | | |
|-----------------------|--|
| 11. 2010
Berlin | I.J. Swierzy , C.G.K. Lüder
„ <i>Toxoplasma gondii</i> Development and Persistence in Skeletal Muscle Cells: Prerequisites for food-borne Transmission“
Toxonet02 - Meeting |
| 02. 2011
Göttingen | I.J. Swierzy , C.G.K. Lüder
„ <i>Toxoplasma gondii</i> Development and Persistence in Skeletal Muscle Cells: Prerequisites for food-borne Transmission“
Toxonet02 – Meeting |

-
02. 2011 **I.J. Swierzy, C.G.K. Lüder**
Berlin “Differentiation of the Host Cell Impacts *Toxoplasma gondii* Development in Skeletal Muscle Cells”
DGHM Statusworkshops der Fachgruppe „Eukaryontische Erreger“
03. 2011 **I.J. Swierzy, C.G.K. Lüder**
Heidelberg “Differentiation of the Host Cell Impacts *Toxoplasma gondii* Development in Skeletal Muscle Cells”
25 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)
10. 2012 **I.J. Swierzy, U. Händel, M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Hamburg „Insights into the Cell Cycle Regulation of Differentiated Skeletal Muscle Cells after Infection with *Toxoplasma gondii* “
64 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
10. 2012 **I.J. Swierzy, U. Händel , M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Berlin “High-throughput Analysis reveals Cell Cycle Regulation of Differentiated Skeletal Muscle Cells after *Toxoplasma gondii* Infection”
Nationales Symposium für Zoonosenforschung (BMBF)
11. 2012 **I.J. Swierzy, U. Händel , M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Leipzig „*Toxoplasma gondii* Development and Persistence in Skeletal Muscle Cells: Prerequisites for food-borne Transmission“
Toxonet02 - Meeting
02. 2013 **I.J. Swierzy, U. Händel , M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Hannover „*Toxoplasma gondii* Development and Persistence in Skeletal Muscle Cells: Prerequisites for food-borne Transmission“
DGHM Statusworkshops der Fachgruppe „Eukaryontische Erreger“
03. 2013 **I.J. Swierzy, U. Händel , A. Kaefer, M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Göttingen „Impact of Host Cell Cycle Regulators on *Toxoplasma gondii* Development in Skeletal Muscle Cells”
IFoTox-2013 Interdisciplinary Forum on Toxoplasmosis
02. 2014 **I.J. Swierzy, U. Händel , A. Kaefer, M. Scharfe, M. Jarek, D. Schlüter, C.G.K. Lüder**
Göttingen „Knock down of Tspyl2 impacts *Toxoplasma gondii* Development in Skeletal Muscle Cells”
DGHM Statusworkshops der Fachgruppe „Eukaryontische Erreger“
-