

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Phänotypische Charakterisierung
humaner Monozyten von Blutspendern
mit chronischer Toxoplasmose und
nicht-infizierten Kontrollen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hauke Gerhard Ehmen

aus

Aurich

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. Carsten Lüder
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Tobias Legler
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 17.11.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Phänotypische Charakterisierung humaner Monozyten von Blutspendern mit chronischer Toxoplasmose und nicht-infizierten Kontrollen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Ehmen HG, Lüder CGK (2018): Chronic *Toxoplasma gondii* infection leads to phenotypic changes in human monocyte in vivo and in vitro. 28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, 21. – 24.03.2018, Berlin. Abstractband, 142-143

Ehmen HG, Lüder CGK (2019): Long-Term Impact of *Toxoplasma gondii* Infection on Human Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 235

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Der Parasit.....	1
1.1.2 Der Lebenszyklus	2
1.2 Die klinische Relevanz einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	5
1.2.1 Das klinische Erscheinungsbild der akuten bzw. reaktivierten Toxoplasmose.....	5
1.2.2 Diagnostik.....	6
1.2.3 Epidemiologie.....	7
1.2.4 Die aktuelle Therapie.....	8
1.2.5 Prävention.....	8
1.3 Die immunologische Reaktion des Wirtes auf eine Infektion mit <i>T. gondii</i>	10
1.3.1 Die Immunreaktion auf eine Parasitämie mit Toxoplasmen.....	10
1.3.2 Der Einfluss einer chronischen <i>Toxoplasma</i> -Infektion auf das Immunsystem	12
1.3.3 Lebenslange Persistenz des Parasiten durch Immunevasionsmechanismen	13
1.4 Monozyten als Teil der antiparasitären Abwehr.....	14
1.4.1 Entwicklung, allgemeine Aufgaben und die Unterteilung in drei Monozyten-Subtypen mit deren Oberflächenantigenen	14
1.5 Ziele dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Zellkulturmedien und Additive.....	17
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	19
2.1.4 Antikörper	20
2.1.5 Oligonukleotide	21
2.1.6 Reaktionskits und Enzyme	22
2.1.7 Geräte.....	23
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkulturmedienherstellung.....	24
2.2.2 Zellkulturen und -kokulturen	24
2.2.3 <i>In-vitro</i> -Infektion humaner Monozyten mit <i>T. gondii</i>	27
2.2.4 Durchflusszytometrie.....	27
2.2.5 RT-qPCR	30
2.2.6 Datenverarbeitung und -bearbeitung	34

3	Ergebnisse	35
3.1	Serologische Untersuchung der Blutproben auf <i>T. gondii</i> -spezifische Antikörper.....	35
3.2	Unterschiedliche Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten chronisch-infizierter und gesunder Blutspender <i>ex vivo</i>	38
3.3	Auswirkungen von <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> auf die Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten chronischer Toxoplasmose-Patienten und seronegativer Kontrollpersonen.....	45
3.4	Transkriptmengen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach Infektion von PBMCs mit <i>T. gondii in vitro</i>	53
3.4.1	Hochregulation von IL-12 und Runterregulation von IL-10 auf mRNA-Ebene bei <i>In-vitro</i> -Infektion	53
3.4.2	Die Agarosegel-Elektrophorese bestätigt die korrekte Amplifikation der Genabschnitte von IL-12, IL-10 und TNF- α in der RT-qPCR.....	56
4	Diskussion	58
4.1	Die <i>T. gondii</i> -Seroprävalenz von 24% beruht auf den größtenteils jungen Blutspendern der Universitätsmedizin Göttingen	59
4.2	Eine chronische <i>T. gondii</i> -Infektion führt zu einer hochsignifikanten Expressionsminderung von CD16 ohne damit die Zusammensetzung des Monozyten-Subtypenpools zu ändern.....	60
4.2.1	CD16-abhängige Abwehrmechanismen könnten durch eine chronische Infektion mit <i>T. gondii</i> eingeschränkt werden	61
4.2.2	Verändert die Reduktion von CD16 bei einer chronischen Infektion mit <i>T. gondii</i> das Auftreten von Autoimmunerkrankungen?.....	62
4.3	Eine chronische <i>T. gondii</i> -Infektion reduziert den Anteil CD62L-positiver und erhöht den Anteil CD64-positiver Monozyten	63
4.4	Eine chronische Toxoplasmose führt zu vermehrter IL-12-mRNA	64
4.5	<i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> verändert die Expression von Oberflächenantigenen auf humanen Monozyten drastisch und führt zu veränderten Monozytensubpopulationen	67
4.6	Eine <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> hemmt die Expression von CCR2 auf humanen Monozyten.....	71
4.7	Die Expression von HLA-DR,DP,DQ wird abhängig vom Serostatus der Spender durch <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> hoch- bzw. runterreguliert	72
4.8	Nach <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> produzieren PBMCs mehr pro- und weniger anti-inflammatorische Zytokine	74
4.9	Ausblick.....	76
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Bilder eines <i>T.gondii</i> -Tachyzoiten und des Apikalkomplexes eines Bradyzoiten	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> (vereinfacht).....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.....	29
Abbildung 4: <i>T.gondii</i> -Seroprävalenz im untersuchten Patientenkollektiv.....	36
Abbildung 5: Dot-Plot-Diagramme der Doppelfärbung für CD14 und CD16 mit dazugehörigen Isotypkontrollen.....	39
Abbildung 6: Dot-Plot-Diagramme zur Analyse einer Einzelfärbung für HLA-A,B,C und der zugehörigen Isotypkontrollfärbung	40
Abbildung 7: Expression von CD14, CD16, CD62L und CCR2 auf humanen Monozyten von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten Blutspendern	42
Abbildung 8: Anteil CD14 ⁺ CD16 ⁻ , CD14 ⁺ CD16 ⁺ , CD16 ⁺ CD14 ^{dim} , CD62L-positiver und CD64-positiver Monozyten von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen	44
Abbildung 9: Expression von CD14 und CD16 auf humanen Monozyten von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten Blutspendern <i>ex vivo</i> und nach <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i>	47
Abbildung 10: Expression von HLA-DR,DP,DQ, CD64 und CCR2 auf humanen Monozyten von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten Blutspendern <i>ex vivo</i> und nach <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i>	48
Abbildung 11: Anteil CD14 ⁺ CD16 ⁻ , CD16 ⁺ CD14 ^{dim} und CD14 ⁺ CD16 ⁺ mononukleärer Zellen von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen <i>ex vivo</i> und nach <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i>	51
Abbildung 12: Anteil CCR2 positiver peripherer mononukleärer Zellen von chronisch <i>T.gondii</i> -infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen <i>ex vivo</i> und nach <i>In-vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i>	52
Abbildung 13: IL-12-Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs <i>T.gondii</i> -positiver und –negativer Blutspender nach Infektion mit <i>T. gondii in vitro</i> und in nicht-infizierten Kontrollzellen.....	54
Abbildung 14: IL-10-Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs <i>T.gondii</i> -positiver und –negativer Blutspender nach Infektion mit <i>T. gondii in vitro</i> und in nicht-infizierten Kontrollzellen.....	55
Abbildung 15: TNF- α -Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs <i>T.gondii</i> -positiver und –negativer Blutspender nach Infektion mit <i>T. gondii in vitro</i> und in nicht-infizierten Kontrollzellen.....	56
Abbildung 16: Agarosegel-Elektrophorese der Amplifikate spezifischer Sequenzabschnitte von IL-12, IL-10, TNF- α und β -Actin zur Bestätigung der korrekten Gen-Amplifikation bei der RT-qPCR	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	17
Tabelle 2: Additive.....	18
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	19
Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	20
Tabelle 5: Primer für die RT-qPCR.....	21
Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits und Enzyme.....	22
Tabelle 7: Verwendete Geräte	23
Tabelle 8: Lösungen für die FACS-Färbung.....	29
Tabelle 9: Mastermix für die reverse Transkription.....	31
Tabelle 10: Probenansatz für die qPCR.....	32
Tabelle 11: Ablaufprotokoll der qPCR	33
Tabelle 12: Serologische Ergebnisse der 21 untersuchten Buffy Coats.....	37

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
AK	Antikörper
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
Bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	Conoid-assoziiertes Protein
CCR	<i>C-C chemokine receptor type</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
Cp	<i>crossing point</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dT	15-25 Desoxythymidin
ELFA	<i>enzyme-linked fluorescent assay</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment, crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>forward scatter</i>
GSH	Glutathion

GRA	Dichte Granula-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HI-Virus	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFAT	indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IFN	Interferon
IgG/M/A	Immunglobulin G/M/A
IL	Interleukin
INOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IRG	<i>immunity-related GTPase</i>
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molekulargewichtsmarker
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MDA	Malondialdehyd
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ni	nicht-infiziert
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

PV	parasitophore Vakuole
RKI	Robert-Koch-Institut
ROP	Rhoprien-Protein-Kinase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkriptase
RT-qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TE	Toxoplasma-Enzephalitis
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TgIST	<i>Toxoplasma-gondii</i> -Inhibitor des STAT1-Signalweges
TNF	Tumornekrosefaktor
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Der Parasit

Das zum Stamm der Apicomplexa gehörende Protozoon *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulär lebender Parasit, der nahezu gleichzeitig, jedoch unabhängig voneinander von den Ärzten Charles Nicolle und Louis Herbert Manceaux in Tunis und in Brasilien von Alfonso Splendore im Jahr 1908 entdeckt und beschrieben wurde. Der Name leitet sich von der bogenförmigen Gestalt (*toxō* = Bogen, *plásma* = Gebilde, beides Altgriechisch) und von dem zuerst entdeckten Wirt, dem Nagetier *Ctenodactylus gundi* ab (Dubey 2014).

Wie auch andere verwandte humanpathogene Parasiten (z. B. *Plasmodium spp.*) zeichnet sich *T. gondii* durch einen komplexen Lebenszyklus (1.1.2) mit verschiedenen Wirten aus. Der dem Stamm namengebende Apikalkomplex (Abbildung 1) besteht aus vorderem Polring, Mikronemen, Konoid und Rhoptrien (Ferguson und Dubremetz 2014), mit dem eine Wirtszelladhäsion bzw. -invasion mit Hilfe des Aktin-Skeletts des Parasiten ermöglicht wird (Dobrowolski und Sibley 1996).

T. gondii ist mit Hilfe dieser Strukturen in der Lage, alle kernhaltigen Zellen einer Vielzahl von warmblütigen Vertebraten zu infizieren (Hill et al. 2005). Diese geringe Zell- und Wirtsspezifität erleichtert seine ubiquitäre Verbreitung und macht ihn zu einem der häufigsten parasitären Zoonoseerreger weltweit (1.2.3).

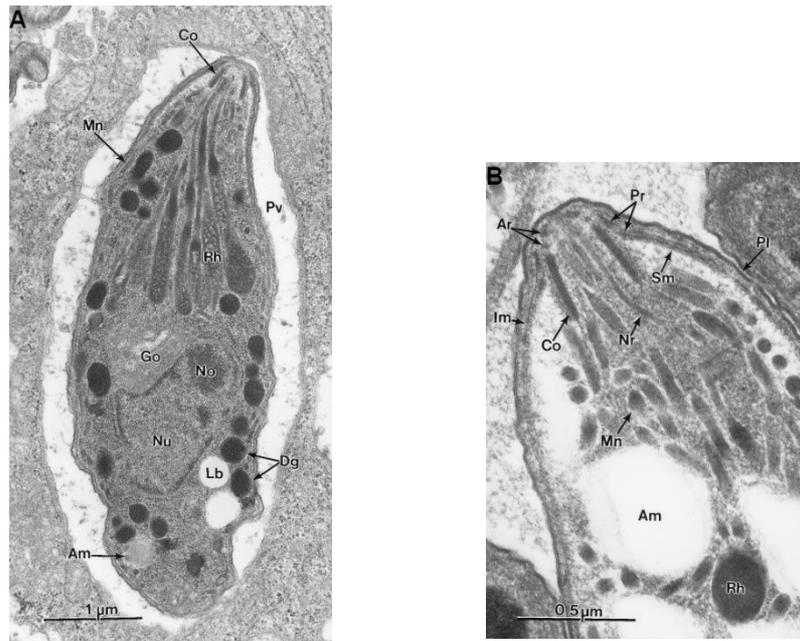


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Bilder eines *T.-gondii*-Tachyzoiten und des Apikalkomplexes eines Bradyzoiten

Elektronenmikroskopisches Bild eines Tachyzoiten des *T.-gondii*-Stammes VEG, gewonnen aus dem Peritonealexsudat einer Maus (A). Zu sehen sind Amylopectin-Granula (Am), Konoid (Co), Dichte-Granula (Dg), Golgi-Apparat (Go), Mikronemen (Mn), Nukleolus (No) und Nukleus (Nu), die parasitophore Vakuole (Pv), Lucent bodies (Lb) und die Rhoptrien (Rh). Das elektronenmikroskopische Bild des vorderen Endes eines Bradyzoiten zeigt den Apikalkomplex (B). Zu sehen sind die Apikal-Ringe 1 und 2 (Ar), der innere Membrankomplex (Im), Teile der Rhoptrien (Nr), das Plasmalemm (Pl), die Polarring 1 und 2 (Pr) sowie subpellikuläre Mikrotubuli (Sm, Dubey et al. 1998). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von J. P. Dubey.

1.1.2 Der Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *T. gondii* lässt sich in einen geschlechtlichen und einen ungeschlechtlichen Zyklus unterteilen, die mit verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten eng verknüpft sind. Endwirt und damit Ort der geschlechtlichen Vermehrung sind Katzenartige (= *Felidae*), die Gewebssysteme mit Bradyzoiten von *T. gondii* über Beutetiere aufnehmen (Dubey 1998).

Dabei setzt nach enzymatischer Zystenwandlyse der Gewebssysteme, Freisetzung von Bradyzoiten im Gastrointestinaltrakt, Infektion der Enterozyten und anfänglicher ungeschlechtlicher Vermehrung die geschlechtliche Vermehrung ein (Dubey 1998; Hill et al. 2005). Hierbei spalten sich von den zu Schizonten umgewandelten Bradyzoiten kleine Tochterzellen, die sog. Merozoiten, ab, welche sowohl männliche als auch weibliche (Mikro- bzw. Makro-) Gameten bilden. Diese befruchten sich gegenseitig und werden anschließend von einer Oozystenwand umschlossen. Dieser Vorgang findet vielfach in einer Epithelzelle statt, bis diese rupturiert und unsporulierte Oozysten ins Darmlumen

freisetzt. Je nach Art der Infektion des Endwirtes variiert die Präpatenzzeit (= Zeit zwischen Aufnahme des Parasiten und Ausscheidung von Oozysten mit dem Faeces) zwischen 3 bis 10 Tagen bei Gewebszysten, mehr als 13 Tagen bei Tachyzoiten und mehr als 18 Tagen bei Oozysten. In den Oozysten befinden sich die sog. Sporozysten, die innerhalb von 1-5 Tagen unter Sauerstoffzufuhr sporulieren und Sporozoiten ausbilden, die dann für neue Wirte infektiös sind, sodass der Lebenszyklus von Neuem beginnen kann (Dubey 1998, 2005). Die Infektion eines Zwischenwirtes, wie z. B. des Menschen oder eines anderen warmblütigen Tieres, kann über Gewebszysten aus rohem oder nicht durchgegartem Fleisch chronisch infizierter Zwischenwirte erfolgen. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Infektion über Lebensmittel, Wasser und Erde, die zuvor mit Oozystenhaltigem Katzenkot kontaminiert wurden. Ein weiterer Weg ist die vertikale Übertragung, also diaplazentar auf den Fötus über Tachyzoiten bei akuter Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft (Abbildung 2, Tenter et al. 2000; Frenkel et al. 1975).

Wichtig für die ubiquitäre Verbreitung des Parasiten ist, dass auch eine horizontale Übertragung zwischen verschiedenen Zwischenwirten möglich ist, was zum Teil die Vielfalt der betroffenen Arten erklärt (Tenter 2009).

Nimmt ein Zwischenwirt Gewebszysten oder Oozysten (enthalten Sporozoiten) über kontaminiertes Material auf, wird deren Gewebswand im Gastrointestinaltrakt des Zwischenwirts enzymatisch aufgespalten, und die enthaltenen Parasiten werden freigesetzt. Diese penetrieren nun aktiv die Dünndarmepithelzellen und bilden intrazellulär eine parasitophore Vakuole (PV) aus, die den Parasiten gegenüber lysosomalem Abbau schützt (Joiner et al. 1994; Schwab et al. 1994).

Via Endodyogenie (= ungeschlechtliche Längsteilung innerhalb einer Mutterzelle, bei der jeweils zwei Tochterzellen entstehen) vermehrt sich der Parasit, bis der Enterozyt aufplatzt und die zu Tachyzoiten entwickelten Parasiten frei werden, sich über Blut- und Lymphwege im Körper ausbreiten und in den nächsten Tagen Organe wie Lymphknoten, Lunge und Leber befallen (Dubey 1997, 1998). Diese Parasitämie mit Tachyzoiten wird auch als akute Toxoplasmose bezeichnet, die mit unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen einhergehen kann (1.2.1).

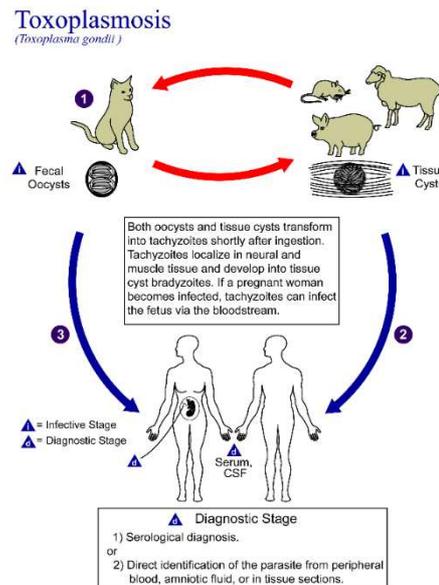


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. gondii* (vereinfacht)

Katzenartige nehmen Gewebszysten, die *T. gondii*-Bradyzoiten enthalten, über Beutetiere auf. Es folgt die geschlechtliche Vermehrung, an dessen Ende die Freisetzung von Oozysten über den Faeces steht (1). Diese werden von anderen Tieren aufgenommen und es kommt nach einer Parasitämie zu einer erneuten Ausbildung von Gewebszysten, z. B. im Muskelgewebe. Über rohes oder unzureichend gegartes Fleisch kann sich der Mensch infizieren (2). Ein weiterer Infektionsweg für den Menschen ist die orale Aufnahme von Oozysten über z. B. kontaminiertes Trinkwasser (3). Während einer Erstinfektion bei Schwangerschaft können die Parasiten auch diaplazentar auf den Fötus übertragen werden. Infektiöse (i) und diagnostische (d) Stadien sind in der Abbildung gekennzeichnet (Silva und Moser 2002).

Im Zuge der Immunantwort des Wirtes auf die akute Infektion macht der Parasit eine Stadienkonversion durch: Die sich schnell teilenden Tachyzoiten wandeln sich zu Bradyzoiten mit geringer Replikationsrate und minimiertem Metabolismus um, gleichzeitig ändert sich das Profil der Oberflächenantigene (Kasper 1989; Bohne et al. 1999) und die PVs werden zu Gewebszysten mit einer festen Zystenwand umgebaut, in denen Bradyzoiten mit Hilfe verschiedener Immunevasionsmechanismen lebenslang persistieren können. Dieses stellt den Übergang zur chronischen bzw. latenten Toxoplasmose dar. Obwohl nahezu alle kernhaltigen Zellen des Zwischenwirts befallen sein können, findet man die Gewebszysten bevorzugt in Gehirn, Auge, Herz und anderen Muskelzellen (Gross et al. 1992; Dubey 1998). Unter bestimmten Bedingungen kann beliebig oft eine Reaktivierung, also ein Wiedereintritt in eine Replikationsphase, der bis dahin ruhenden Bradyzoiten in den Gewebszysten mit resultierender Parasitämie erfolgen (1.2.1).

1.2 Die klinische Relevanz einer Infektion mit *T. gondii*

1.2.1 Das klinische Erscheinungsbild der akuten bzw. reaktivierten Toxoplasmose

Entscheidend für das symptomatische Bild einer Infektion mit *T. gondii* ist der Immunstatus des Patienten. Eine akute Infektion verläuft beim immunkompetenten Menschen häufig klinisch inapparent oder mit milden Allgemeinsymptomen wie Fieber und Lymphknotenschwellungen occipital und/oder cervical (Hill und Dubey 2002). Jedoch können auch bei immunkompetenten Patienten schwere Schäden auftreten, wie z. B. eine okuläre Toxoplasmose, die den häufigsten Grund einer posterioren Uveitis darstellt (Shobab et al. 2013). Seltener sind fulminante Verläufe mit Beteiligung anderer Organe, wie Lunge und Gehirn beschrieben (Demar et al. 2007).

Nach durchgemachter Infektion kann bei persistierenden IgG-Titern (Immunglobulin G) von einer Immunität gegen eine erneute Infektion ausgegangen werden (Wilson 2012).

Von klinischer Bedeutung sind insbesondere Toxoplasmosen in Form der Reaktivierung einer latenten Infektion bei Immunsuppression oder der konnatalen Toxoplasmose des Fötus bei Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft (Gross 2004).

Eitrige Myokarditiden, Pneumonien und Enzephalitiden ausgelöst durch *T. gondii* treten insbesondere bei organtransplantierten, therapeutisch immunsupprimierten Patienten auf (Derouin und Pelloux 2008) und reduzieren damit das Überleben dieser Patienten (Doesch et al. 2010).

Weiterhin führt der Parasit zu einer opportunistischen Infektion bei Menschen mit dem erworbenen Immundefizienzsyndrom AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*), die mit einer hohen Mortalität verknüpft ist (Bonnet et al. 2005). Nicht antiretroviral behandelte Patienten erleiden in bis zu 50% der Fälle bei *Toxoplasma*-Infektion eine *Toxoplasma*-Enzephalitis (TE, Happe et al. 2002), wobei der Anteil unter Patienten mit einer Kombinationstherapie auf 2,2% gesenkt werden konnte (Sacktor et al. 2001). Trotz aller therapeutischer Bemühungen bleibt die TE die häufigste Todesursache bei AIDS-Patienten (Luft und Remington 1992; Contini 2008).

Findet eine Infektion mit *T. gondii* erstmalig während der Schwangerschaft statt, kann dies zu fokalen Läsionen der Plazenta mit der Durchtrittsmöglichkeit für Tachyzoiten zum Fötus und somit zu einer Infektion des Fötus führen (Hill und Dubey 2002). Maßgeblich für die Folgen dieser Infektion sind die Zahl der übertragenen Parasiten und deren Virulenz, viel mehr jedoch noch das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Infektion. So steigt die Übertragungsrate von der Mutter auf den Fötus während der Schwangerschaft auf ca. 60% im dritten Trimenon an, wohingegen das Risiko von Symptomen reziprok dazu verläuft: Es sinkt im Laufe der Schwangerschaft von 60-75% im ersten auf 10% im dritten Trimenon ab (Gross 2004; Lopes et al. 2007; Montoya und Remington 2008). Zu klinisch

schweren Fällen kann eine Infektion in der frühen Schwangerschaft führen, die sich mit Retinochorioiditis, Hydrozephalus und Enzephalitis (Trias) oder sogar als Spontanabort zeigt. Weiterhin kann es zu mentaler Retardierung, zerebraler Kalzifizierung sowie psychomotorischen, neurologischen Störungen und zu Wachstumsstörungen kommen. Bei kongenitaler, subklinischer Infektion können Spätschäden wie die okuläre Toxoplasmose mit einer Latenz von Monaten bis Jahren auftreten (Hill und Dubey 2002; Montoya und Liesenfeld 2004; Lopes et al. 2007; Montoya und Remington 2008).

Zu großer medialer Popularität kam *T. gondii*, als bekannt wurde, dass eine Infektion das Verhalten des Wirtes manipulieren kann. So weisen z. B. infizierte Ratten einen verminderten Fluchtinstinkt gegenüber Katzen auf (Berdoy et al. 2000), was zu der Frage führte, ob auch der infizierte Mensch in seinem Verhalten beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden psychologische Studien mit Infizierten und nicht-infizierten Kontrollpersonen durchgeführt, die zu signifikanten, geschlechtsspezifischen Ergebnissen kamen: Frauen verhielten sich aufgeschlossener und Männer hatten ein vermindertes Regelbewusstsein (Flegr und Havlíček 1999; Lindová et al. 2006; Flegr 2007). In Fachkreisen sind Schlussfolgerungen daraus jedoch umstritten.

1.2.2 Diagnostik

Diagnoseverfahren der Wahl beim gesunden, nicht-immunkompromittierten Patienten ist der Nachweis von *Toxoplasma*-spezifischen Antikörpern (IgG). Sind diese nicht vorhanden, besteht in der Schwangerschaft die Gefahr einer Erstinfektion. Steigt der IgG-Titer im Vergleich zum Vorwert an, kann dies beim immunsupprimierten Patienten auf eine Reaktivierung einer chronischen Infektion hinweisen (Montoya und Liesenfeld 2004; Montoya und Remington 2008). Da dieser Labortiter jedoch keine Rückschlüsse zur Differenzierung zwischen akuter und chronischer Infektion liefert, werden bei Bedarf noch weitere Verfahren eingesetzt. Zu nennen sind hier subklassen-spezifische ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), IFAT (Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test), *Sabin-Feldmen Dye Test*, Agglutinationstest und die IgG-Aviditätstestung. Mit Hilfe dieser Laboruntersuchungen ist es möglich eine akut erworbene Infektion von einer chronischen abzugrenzen (Montoya und Liesenfeld 2004; Iqbal und Khalid 2007).

IgM ist das Immunglobulin der ersten Infektionsphase und somit während der akuten Infektion, teilweise aber auch noch bis Monate nach durchgemachter Infektion serologisch nachzuweisen. Aufgrund dessen kann es keine akute Infektion beweisen, jedoch bei negativem IgM eine akute Infektion ausschließen (Bobić et al. 1991; Liesenfeld et al. 1997). Als sensitiverer Marker für eine akute Toxoplasmose steht IgA in Kombination mit IgG als Test in der perinatalen Diagnostik zur Verfügung (Stepick-Biek et al. 1990).

Ist während einer Infektion der Titer für serologische Verfahren zu niedrig, kann ein direkter Nachweis von *T. gondii* notwendig sein. Hier steht neben einer Mausinokulation und der Zellkultur vor allem die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) im Vordergrund (Montoya

2002). Ein Vorteil der Real-Time-PCR ist, dass viele verschiedene Probenmaterialien (z. B. Flüssigkeit einer bronchoalveolären Lavage bei AIDS-Patient mit Pneumonie) benutzt werden können (Petersen et al. 2006).

In der Pränataldiagnostik ist die PCR-Analyse von Nabelschnurblut eine Standarduntersuchung, jedoch ist sie mit einer Sensitivität von 64-97 % je nach Gestationsalter nicht immer zuverlässig (Hohlfeld et al. 1994; Montoya und Remington 2008). Sensitiver, jedoch mit einem Abort-Risiko von ca. 1 % verbunden ist die Untersuchung von Fruchtwasser aus einer Punktion der Fruchtblase (Amniozentese). Ab der 18. Schwangerschaftswoche (SSW) kann dieses Verfahren unter strenger Indikationsstellung verwendet werden (Montoya und Remington 2008; Tabor und Alfirevic 2010).

1.2.3 Epidemiologie

Aufgrund verschiedener Faktoren wie Hygiene, Klima und Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung variiert die Durchseuchungsrate von *T. gondii* von Region zu Region stark. Verstärkt betroffen sind z. B. dichtbesiedelte, warme Küstenregionen verglichen mit trockenen Wüstengebieten (Julvez et al. 1996; Chacin-Bonilla et al. 2001).

Ein Beispiel für ein Land mit einer hohen Seroprävalenz von 75-80% ist Brasilien. In Europa ist sie in Frankreich ähnlich hoch (Miller et al. 2009), und somit liegen beide Länder über der weltweiten Prävalenz von gut einem Drittel der Weltbevölkerung (Montoya und Liesenfeld 2004).

Zwar konnte in Deutschland durch die Einführung des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001, das eine nicht-namentliche Meldepflicht vorsieht, die Erfassung konnataler Toxoplasmose-Fälle verbessert werden, jedoch ist von einer hohen Dunkelziffer, insbesondere bei klinisch inapparenten Fällen, auszugehen (Robert-Koch-Institut 2009, RKI). Man geht daher von einer Seroprävalenz bei Schwangeren von 26-54% aus, die mit wachsendem Lebensalter steigt (Gross 2004). Eine aktuelle Veröffentlichung des RKIs aus dem Jahr 2016 gibt eine Durchseuchung von 55% für Erwachsene in Deutschland an (Wilking et al. 2016).

Ein Grund der hohen Durchseuchungsrate liegt in der Umweltresistenz der Oozysten, die bis zu 18 Monate im Erdreich unterschiedlichste klimatische Bedingungen überleben können (Frenkel et al. 1975). So ist es möglich, dass aus Katzenkot ausgewaschene Oozysten mit starken Regenfällen in Trinkwasserreservoirs, Flüsse und Ozeane gespült werden (Lindsay und Dubey 2009), über die sie Oberflächentrinkwasser in (sub-)tropischen Regionen (Bahia-Oliveira et al. 2003) und Teilen Europas kontaminieren können (Ertug et al. 2005). Da Oozysten auch eine hohe Resistenz gegenüber gängigen Verfahren der Trinkwasseraufbereitung wie z. B. der Desinfektion mittels Ozon oder UV-Strahlung (Ultraviolett) aufweisen, ist diese Infektionsquelle vermutlich von großer Bedeutung (Wainwright et al. 2007a; Wainwright et al. 2007b). Der größte Risikofaktor einer Infektion

ist jedoch unzureichend gegartes oder rohes Fleisch, was in Europa für 30 – 63% der Infektionen verantwortlich ist (Cook et al. 2000). Trotz des Wissens um diese Risikofaktoren ist die Diagnose bei einem größeren Teil von Toxoplasmose-Ausbrüchen schwierig zu stellen. Kriterien hierbei sind regionale und zeitliche Häufung von Symptomen einer akuten *T.gondii*-Infektion und serologischer Nachweis von spezifischem IgG und IgM (Demar et al. 2007).

1.2.4 Die aktuelle Therapie

Die Therapie der Toxoplasmose richtet sich nach dem Immunstatus des Patienten, der Schwere der Erkrankung, dem Vorliegen einer Schwangerschaft und anderen medizinischen Faktoren wie z. B. der Nierenfunktion und bekannten Allergien.

Bei immunkompetenten Menschen kann bei unkomplizierten Verläufen in der Regel auf eine medikamentöse Therapie verzichtet werden (Montoya und Liesenfeld 2004). Indikationen für eine antiparasitäre Medikation sind die okuläre Toxoplasmose, eine aktive Infektion bei Immunsupprimierten und die pränatale Toxoplasmose des Neugeborenen sowie die Erstinfektion während der Schwangerschaft. Letztere wird bis zur 16. SSW mit dem Makrolid Spiramycin, nach der 16. SSW mit einer Kombination aus Pyrimethamin (Dihydrofolatreduktase-Hemmer, potenziell teratogen, hämatotoxisch) und Sulfadiazin behandelt. Zur Vermeidung von Knochenmarksschäden, die durch das Pyrimethamin entstehen können, wird die gleichzeitige Gabe von Folsäure empfohlen. Bei nachgewiesener Infektion des Fötus sollte eine vierwöchige Intervalltherapie mit dieser Dreifachkombination bis zum Ende der Schwangerschaft erfolgen (Schema: 4 Wochen Kombinationstherapie, 4 Wochen frei oder Spiramycin, usw.). Für Neugeborene wird ebenfalls diese Kombination empfohlen, wobei die Dauer individuell angepasst werden muss. Zur rechtzeitigen Erkennung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen müssen regelmäßige Blutbild- und Leberfunktionswertkontrollen erfolgen. Clindamycin ist als Alternative angegeben (Montoya und Remington 2008; Robert-Koch-Institut 2009).

Für organtransplantierte, immunsupprimierte Patienten wird eine hochwirksame Therapie mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol vorgesehen, die TE wird mit Pyrimethamin und Sulfadiazin bzw. Atovaquone behandelt. Anschließend sollte eine prophylaktische Therapie mit halber Dosierung bis zum Erreichen der Immunkompetenz fortgeführt werden (AIDS-Patienten: CD4+ (*cluster of differentiation*)-T-Zellen >200/ μ l und mindestens 6 Monate therapeutisch kontrollierte Viruslast, Montoya und Liesenfeld 2004).

1.2.5 Prävention

Die häufigste Infektionsquelle des Menschen mit *T. gondii* ist die Ingestion von Gewebszysten aus ungekochtem und unzureichend gegartem Fleisch. Dies ist daher der Hauptrisikofaktor einer Infektion (Roghmann et al. 1999) und für ca. 50 % der Erkrankungen verantwortlich (Slifko et al. 2000). Verglichen mit Infektionen über

Oozysten-kontaminiertes Erdreich mit bis zu 17% (Cook et al. 2000) kann der Aufnahme von ungenügend gegartem, mit Gewebezysten kontaminierten Fleisches je nach Region in Europa eine Häufigkeit von 30-63 % zugeschrieben werden, was sie zum wichtigsten Ansatzpunkt von Präventionsprogrammen macht. Auf verunreinigtes Wasser, Aufnahme von Oozysten aus dem Erdreich und ungekochtes Gemüse sind bei der nicht-fleischessenden Bevölkerung 22- 48 % der *Toxoplasma*-Infektionen zurückzuführen (Hall et al. 1999; Roghmann et al. 1999; Chacin-Bonilla et al. 2001).

Demnach wird Schwangeren die ausreichende Erhitzung von Fleisch auf über 66 °C empfohlen, da ab dieser Temperatur die Bradyzoiten in Gewebezysten denaturieren, Gemüse und Obst sollten gründlich gewaschen werden, Gartenarbeit sollte gemieden werden (Dubey et al. 2005). Katzenklos sollten nur von Nicht-Schwangeren mit heißem Wasser gesäubert werden, wohingegen der Kontakt mit Katzen kein signifikantes Risiko darstellt (Cook et al. 2000). Kommt es dennoch zu einem Risikokontakt sollten anschließend die Hände gründlich gereinigt werden.

Eine Infektion kann für organtransplantierte Patienten unter Umständen fatale Folgen haben (1.2.1) und kann über das Tachyzoiten-haltige transplantierte Organ (Herz, Leber, Lunge) oder Blut erfolgen (Hermanns et al. 2001; Derouin und Pelloux 2008). Hochrisikopatienten, die durch serologische Untersuchungen von Spender und Empfänger erkannt wurden, profitieren von einer Prophylaxe mit Cotrimoxazol, auch wenn die genaue epidemiologische Bedeutung nicht abschließend geklärt ist (Derouin und Pelloux 2008).

Zum Schutz der breiten Bevölkerung sollte über die notwendigen Hygienemaßnahmen aufgeklärt werden und eine zuverlässige Trinkwasseraufbereitung erfolgen (Isaac-Renton et al. 1998), insbesondere um Menschen mit niedrigem sozioökonomischen Status zu schützen, die laut einer Studie eine höhere Seroprävalenz aufweisen (Bahia-Oliveira et al. 2003).

Screening-Programme für Schwangere zeigen gute Erfolge: So konnten durch primäre Prävention die Serokonversionsrate um 63 %, durch sekundäre Prävention um 40% gesenkt werden (Foulon et al. 1994), was jedoch auch von der Prävalenz der untersuchten Region anhängig ist.

Da in neueren Studien auch die medizinische Bedeutung einer Infektion von immunkompetenten Patienten vor allem aufgrund der von *T. gondii* ausgelösten Retinochorioiditis gezeigt wurde, wird vermehrt eine Impfung für den Menschen diskutiert, bisher ist jedoch nur ein zugelassener Impfstoff für Schafe in Umlauf (*Ovilis Toxovax*, Intervet International). Somit ist nicht mehr alleine der Schutz vor kongenitalen Infektionen Schwerpunkt der Toxoplasmose-Prävention (Havelaar et al. 2007; Innes und Vermeulen 2006).

1.3 Die immunologische Reaktion des Wirtes auf eine Infektion mit *T. gondii*

1.3.1 Die Immunreaktion auf eine Parasitämie mit Toxoplasmen

Wie bei jeder Infektion ist auch bei der Infektion mit *T. gondii* das Ziel des Wirtes eine dauerhafte Schädigung zu vermeiden und die Erreger entsprechend schnell und stark einzudämmen.

Immunkompetente Wirte reagieren auf eine Parasitämie mit Tachyzoiten von *T. gondii* heftig, um eine weitere Replikation des Parasiten und damit mögliche Schäden zu verhindern. Hierbei werden eine Reihe von pro-inflammatorischen Signalkaskaden aktiviert und Abwehrzellen mobilisiert, die in der Regel die akute Infektion erfolgreich eindämmen.

Eine zentrale Funktion spielt das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-12 (IL-12), welches in der Frühphase der Infektion nach Phagozytose von Parasiten durch Monozyten, neutrophile Granulozyten und antigenpräsentierende Dendritische Zellen (DCs) sezerniert wird. Es aktiviert in Natürlichen Killer (NK)-Zellen den STAT4 (*Signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg, an dessen Ende Interferon-gamma (IFN- γ) ausgeschüttet wird (Gazzinelli et al. 1993; Fukao et al. 2001). Gleichzeitig spielt IL-12 eine Rolle in der Differenzierung und Aktivität von T-Lymphozyten (Reis e Sousa et al. 1997), sodass diese vermehrt *T.-gondii*-infizierte Zellen zytotoxisch angreifen bzw. wesentlich zur IFN- γ -Produktion beitragen (Montoya et al. 1996).

IFN- γ ist bei der Abwehr von intrazellulären Protozoen von zentraler Bedeutung, da es auf vielfältige Weise immunologische Prozesse aktiviert, die sich unter anderem gegen intrazelluläre Pathogene richten (Suzuki et al. 1988; Lykens et al. 2010). Unter anderem aktiviert es die Genexpression für MHC (*Major Histocompatibility*)-Moleküle der Klasse I und II, für Proteine des Zellwachstums und der Apoptose (Boehm et al. 1997). Dem gegenüber führt die Abwesenheit von IFN- γ zu einer unkontrollierten Vermehrung oder Reaktivierung von Toxoplasmen bei Mäusen, was zu einer erhöhten Mortalität führt (Scharton-Kersten et al. 1996; Yap und Sher 1999).

Gleichzeitig ablaufende anti-inflammatorische Prozesse vermindern bei Infektionen mit Protozoen durch die Immunantwort hervorgerufene Gewebeschäden, was jedoch ebenso eine Persistenz der Parasiten im Wirt ermöglicht (Raes et al. 2007, 1.3.3).

Monozyten spielen als Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems und bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort über die Präsentation von Antigenen über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4⁺-T-Zellen oder direkt an B-Zellen ohne gleichzeitige Präsentation an T-Zellen eine wichtige Rolle. Ebenso können sie durch direkte antimikrobielle Wirkungen, u.a. durch Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, Begrenzung essentieller Wachstumsfaktoren oder Lyse von Vakuolenmembranen durch GTPasen (Guanosintriphosphat) Infektionserreger bekämpfen (Serbina et al. 2008).

Durch CCR2 (*C-C chemokine receptor type*) -vermittelte Rekrutierung gelangen Monozyten an den Ort der Infektion, um dort die fortschreitende Erregerausbreitung einzugrenzen. CCR2-Knock-out-Mäuse sind nicht in der Lage die Vermehrung von *T. gondii* zu kontrollieren und weisen gleichzeitig niedrigere IL-12-Spiegel unter einer solchen Infektion auf, was zu einer erhöhten Mortalität führt (Dunay et al. 2008; Serbina et al. 2008).

Durch die Kombination von IFN- γ , produziert von NK-Zellen und T-Lymphozyten vom T-Helfer-1-Typ, und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , produziert von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), werden aus Gewebsmakrophagen und Blutmonozyten klassisch aktivierte Makrophagen mit pro-inflammatorischer und gesteigerter antimikrobieller Aktivität (sog. M1-Makrophagen). So werden von ihnen durch IFN- γ eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-23 sezerniert, die wiederum auf andere Zellen des Immunsystems wirken (Mosser und Edwards 2008). Weiterhin wird die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) im Rahmen der Erregerzerstörung erhöht (Lüder et al. 2003).

Studien zeigten, dass eine starke zelluläre Immunantwort zwar wichtig für die rasche Bekämpfung von *T. gondii* ist (Dunay und Sibley 2010), jedoch auch mit dem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen korreliert. Solche Autoimmunerkrankungen können durch polymorphonukleäre Leukozyten ausgelöst werden, die über die Signalkaskade IL-13, T-Helfer-17-Zellen, und IL-17-Sekretion rekrutiert werden (Langrish et al. 2005). Weiterhin konnte im Modell mit *T. gondii*-infizierten Mäusen eine erhöhte Mortalität durch überschießende Produktion von IL-12, IFN- γ und TNF- α bei Abwesenheit des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden, sodass angenommen wird, dass jede unterschwellige und jede überschießende Reaktion auf eine Infektion zu verschiedenen Schädigungen führen kann (Gazzinelli et al. 1996).

Dendritische Zellen, die sich aus Monozyten-Vorläufern differenzieren, sind nicht nur an der Abwehr einer Infektion mit *T. gondii* beteiligt, sondern auch Wirtszellen des Parasiten. Sie können in Abhängigkeit vom Genotyp von *T. gondii* nach Infektion hypermotil werden und als „Trojanische Pferde“ die Dissemination des Parasiten in seinem Wirt sogar begünstigen (Lambert et al. 2009).

Neuere Studien zeigten außerdem, dass die Freisetzung des parasitären Proteins Dichte Granula-Protein GRA15 im Zytoplasma einer dendritischen Wirtszelle zur Aktivierung des NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) -Signalweges führt, was unter anderem die Synthese von IL-12 induziert. Jedoch unterliegt diese Eigenschaft Stammspezifischen Unterschieden (Rosowski et al. 2011). Somit sind infizierte Zellen des angeborenen Immunsystems an der schnellen Ausbreitung des Parasiten im gesamten Organismus, aber auch an der Abwehr einer Infektion mit Toxoplasmen beteiligt.

1.3.2 Der Einfluss einer chronischen *Toxoplasma*-Infektion auf das Immunsystem

Eine Reihe von Veränderungen der Immunreaktivität lassen sich nicht nur bei akuter Toxoplasmose, sondern auch bei einer latenten Infektion feststellen.

So zeigte eine Studie bei chronisch-infizierten Patienten erhöhte Spiegel von Malondialdehyd (MDA) und NO (Stickstoffmonoxid) bei gleichzeitig erniedrigter Glutathion (GSH)-Aktivität (Karaman et al. 2008). Während der erhöhte NO-Spiegel als Zeichen gesteigerter Abwehrbereitschaft gegen die bestehende Infektion mit *T. gondii* gedeutet wurde, deutet die hohe MDA-Konzentration im Blut der Patienten auf erhöhten oxidativen Stress für Zellen und Gewebe hin. Die erniedrigte Aktivität des endogenen Antioxidans GSH wurde als Zeichen einer verminderten Antwort auf den oxidativen Stress interpretiert, sodass die Autoren zusammenfassend von einer erniedrigten Aktivität der Schutzmechanismen gegenüber Schäden durch freie Radikale bei chronisch-infizierten Patienten ausgingen.

Eine Studie zur Immunsuppression durch *T. gondii* zeigte im Mausmodell auf der einen Seite eine zeitweise erhöhte Produktion von IL-12 und IFN- γ , also eine Stimulation der Immunantwort, auf der anderen jedoch eine erniedrigte Proliferation von Splenozyten mit einer geringeren Produktion von IL-2 durch diese Zellen nach Stimulation mit allogenen Zellmaterial. Dies deutet auf eine Hemmung der Immunantwort hin. Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die NO-Produktion durch Makrophagen auch 15 Wochen nach Infektion bei einer Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) niedriger ist als bei den Mäusen in der Kontrollgruppe (Kankova et al. 2010).

Neuere Studien zeigten sogar, dass eine chronische Infektion mit *T. gondii* zu einem immunologischen Vorteil für Mäuse bei einer akuten Infektion mit *Listeria monocytogenes* wird. Ursächlich dafür ist die Stimulation des Nager-spezifischen Toll-like-Rezeptors TLR11 durch *T. gondii*, durch die pro-inflammatorische Monozyten rekrutiert werden, die den Wirt gegenüber einer Infektion mit Listerien schützen (Neal und Knoll 2014).

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass sowohl HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-A,B,C als auch HLA-DR,DP,DQ bei chronisch-infizierten Blutspendern verstärkt exprimiert werden, was in einem Shift der Monozyten-Subpopulationen (1.4.1) begründet sein und eine erhöhte Immunreaktivität auch gegenüber anderen Erregern zur Folge haben könnte (Stalling 2013).

Somit scheint eine chronische Infektion mit *T. gondii* das Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen, indem der Organismus vermehrtem oxidativen Stress und zumindest zeitweise einer verstärkten Entzündungsreaktion ausgesetzt ist. Dies könnte das Auftreten einer Autoimmunerkrankung während der chronischen Toxoplasmose begünstigen (Fischer et al. 2013). Eine länger andauernde Immunsuppression könnte dagegen zu einer

erhöhten Anfälligkeit gegenüber anderen Infektionserregern führen, wobei die erhöhte Antigen-Präsentation über MHC-Moleküle diesem Effekt entgegensteht.

1.3.3 Lebenslange Persistenz des Parasiten durch Immunevasionsmechanismen

Von großer Bedeutung für die lebenslange Persistenz von *T. gondii* in seinen Zwischenwirten ist die Balance zwischen Eindämmung des Parasiten durch das Immunsystem des Wirtes und der Immunevasion des Parasiten. Ein Überwiegen der Immunantwort würde zu einer Eradikation, ein Überwiegen der Immunevasion zu einer unkontrollierten Erregerausbreitung und somit zum Tod des Wirtes führen (Denkers et al. 2012). In beiden Fällen wäre die Infektion weiterer End- oder Zwischenwirte nicht mehr möglich.

Eine Schlüsselrolle in der Immunevasion spielt bei Mäusen die Rhoptrien-Protein-Kinase ROP18, die *immunity-related GTPase* (IRG)-Proteine inaktiviert (Fentress et al. 2010; Steinfeldt et al. 2010) und somit verhindert, dass die Membran der parasitophoren Vakuole zerstört wird und Tachyzoiten ins Zytoplasma gelangen, in dem sie nicht überleben können (Howard et al. 2011).

Die Effekte von ROP16 sind komplexer. Es aktiviert in Abhängigkeit vom Genotyp des Parasiten im Zytoplasma der Wirtszelle die Signalmoleküle STAT3 und STAT6, was die zelluläre Immunität begrenzt und dem Parasiten Zugang zu Nährstoffen der Wirtszelle ermöglicht (Butcher et al. 2011; Jensen et al. 2011). Weiterhin verringert die IL10-unabhängige STAT3-Aktivierung durch den Parasiten die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α (Butcher et al. 2005). Das Conoid-assoziierte Protein CAP-1 ist in seiner Wirkungsweise noch nicht vollständig verstanden, jedoch führt ein Fehlen dieses Proteins zu einer erhöhten Anfälligkeit des Parasiten gegenüber Stickstoffoxid-Radikalen (Skariah et al. 2012).

Eine *In-vitro*-Infektion humaner Monozyten-angereicherter PBMCs mit Toxoplasmen führt zu einer signifikanten Hemmung der Expression von HLA-A,B,C und HLA-DR,DP,DQ (Stalling 2013), was analog zu Studien mit murinen Monozyten zu einer verminderten Antigenpräsentation an T-Lymphozyten und somit zu einer abgeschwächten Antwort des erworbenen Immunsystems führen könnte (Lüder et al. 2001; Lüder und Seeber 2001). Die Manipulation der Apoptose infizierter Wirtszellen ist ein weiterer Mechanismus, der die Eradikation des Parasiten verhindert (Lüder und Gross 2005; Hippe et al. 2009).

Somit ermöglicht die Balance zwischen pro-inflammatorischen, anti-parasitären und anti-inflammatorischen, gewebeschonenden Reaktionen bei Infektion mit *T. gondii* im Zusammenspiel mit Immunevasionsmechanismen des Parasiten die lebenslange Persistenz des Parasiten in Form ruhender Bradyzoiten in verschiedenen Geweben des Zwischenwirtes (1.1.2).

1.4 Monozyten als Teil der antiparasitären Abwehr

1.4.1 Entwicklung, allgemeine Aufgaben und die Unterteilung in drei Monozyten-Subtypen mit deren Oberflächenantigenen

Humane Monozyten spielen bei vielen Prozessen der Erregerabwehr, der Regulation des Immunsystems, aber auch der Wundheilung eine große Rolle und sind eine sehr heterogene Gruppe von mononukleären Zellen des angeborenen Abwehrsystems (Mosser und Edwards 2008). Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen über myeloide Progenitorzellen, die auch Vorläuferzellen einer Reihe anderer Zellen, wie zum Beispiel von Granulozyten sind. Aus *granulocyte/macrophage colony-forming units* reifen Monoblasten heran, die sich über Pro-Monozyten zu reifen Monozyten entwickeln, die ins Blut abgegeben werden (Gordon und Taylor 2005).

Nicht nur ihre Phagozytose-Aktivität von opsonisierten und nicht-opsonisierten Partikeln, sondern auch die Fähigkeit inflammatorische Prozesse im Körper zu modulieren, die Zellen des erworbenen Immunsystems zu aktivieren, als antigenpräsentierende-Zellen zu fungieren und sich in verschiedenen Geweben zu ortsständigen Gewebsmakrophagen oder Vorläufer von dendritischen Zellen zu differenzieren, sind wichtige Eigenschaften ihrer antimikrobiellen Aktivität (Sampath et al. 2018; Recalcati et al. 2018).

Der gemeinsame Marker aller humaner Blutmonozyten sowie von dendritischen Zellen des Blutes ist CD115, der *monocyte colony stimulating factor 1 receptor* (Ingersoll et al. 2010). Die eigentlichen Monozyten des Menschen können anhand der Oberflächenantigene CD14 und CD16 in drei Subtypen eingeteilt werden. Ca. 90-95% sind CD14⁺CD16⁻ und werden als „klassische Monozyten“ bezeichnet. Sie exprimieren CCR2, CD64, CD62L auf ihrer Oberfläche. Eine gut dokumentierte Funktion dieser Subpopulation ist das Recycling von apoptotischen neutrophilen Granulozyten, die ständig in großer Zahl anfallen und nach einer lokalen Infektion vermehrt vorliegen können (Chimma et al. 2009). CD16⁺CD14^{dim} werden auch „nicht-klassische“ oder „pro-inflammatorische Monozyten“ genannt, da sie TNF- α sezernieren (Chimma et al. 2009; Takeyama et al. 2007). Dieses Zytokin wirkt über verschiedene Signalkaskaden auf die Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose von vielen Zellen des Immunsystems und verstärkt so die Antwort auf eine Infektion (Hehlgans und Pfeffer 2005). Gegenspieler und somit „anti-inflammatorische“ bzw. „intermediäre Monozyten“ sind CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Sie exprimieren HLA-DR und produzieren IL-10 (Chimma et al. 2009), was inflammatorische Prozesse hemmt und so den Körper vor überschießenden Immunreaktionen schützt (Grütz 2005). Eine starre Zuordnung von Subpopulation und Funktion *in vivo* ist jedoch nur eingeschränkt korrekt, da auch ein „pro-inflammatorischer Monozyt“ anti-inflammatorische Funktionen aufweist und umgekehrt (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Diese Subpopulationen und damit eingeschlossen die Expression von bestimmten Oberflächenantigenen und ihre antimikrobielle Aktivität werden durch Infektionen beeinflusst (Ziegler-Heitbrock 2007).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die Modulation des Immunsystems, genauer gesagt der immunologischen Zellen, Signalwege und Zytokine durch *Toxoplasma gondii* ist für das Verständnis der pathogenetischen Prozesse während der Toxoplasmose von zentraler Bedeutung. Während Immunantworten und deren Einfluss auf den Infektionsverlauf während der akuten Infektion vor allem im Mausmodell sehr gut charakterisiert sind, ist der Einfluss von chronisch-persistierenden Infektionen mit *T. gondii* auf Zellen des Immunsystems weniger gut untersucht. Dies ist in Anbetracht der hohen Seroprävalenz chronischer *Toxoplasma*-Infektionen des Menschen (Wilking et al. 2016) sowie des vermutlich jahrelangen, eventuell sogar lebenslangen Verlaufs jedoch von großem Interesse. Langanhaltende Veränderungen von Zellen der angeborenen Immunität während chronischer Toxoplasmose können dabei deren Verlauf, aber auch den anderer Infektionserkrankungen beeinflussen.

Vorangegangene Arbeiten unseres Instituts beschäftigten sich unter anderem mit Signalwegen und Proteinen der Antigenpräsentation und deren Expression nach *In-vitro*-Infektion humaner Monozyten sowie bei chronischer Infektion des Menschen mit dem Parasiten. Stalling 2013 zeigte, dass sowohl die Expression von HLA-A,B,C als auch die von HLA-DR,DP,DQ auf humanen Monozyten durch eine *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten signifikant gehemmt wird. Interessanterweise war eine latente *Toxoplasma*-Infektion hingegen mit einer Hochregulation dieser Moleküle verglichen mit Monozyten *T. gondii*-naiver Blutspender assoziiert. Letzteres wurde als mögliche Dominanz einer Monozyten-Subpopulation mit erhöhter HLA-Expression gedeutet (Stalling 2013).

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob chronisch *T. gondii*-Infizierte eine veränderte Zusammensetzung des Monozytensubtypen-Pools im Vergleich zu nicht-infizierten Personen aufweisen. Außerdem sollte die Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf Monozyten chronisch-infizierter Toxoplasmose-Patienten und nicht-infizierter Kontrollpersonen verglichen werden. Weiterhin sollten Unterschiede zwischen den phänotypischen Veränderungen von Monozyten der beiden Serogruppen durch eine akute *In-vitro*-Infektion mit *Toxoplasma*-Tachyzoiten ermittelt werden. Zusätzlich wurden hierbei auch die Expressionsmuster pro- und anti-inflammatorischer Zytokine bestimmt.

Die Monozyten wurden dazu aus PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) von Blutspendern der Universitätsmedizin Göttingen isoliert und der *Toxoplasma*-Infektionsstatus serologisch ermittelt. Mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) wurden die für die Subtypisierung von Monozyten genutzten Antigene CD14 und CD16 sowie weiterer Markerantigene auf den Oberflächen der Monozyten direkt nach Isolation sowie nach *In-vitro*-Infektion zytometrisch bestimmt. Aufgrund der CD14- und CD16-Expression erfolgte die Einteilung in „klassische“ (CD14⁺CD16⁻), „intermediäre“ (CD14⁺CD16⁺) und „nicht-klassische Monozyten“ (CD16⁺CD14^{dim}). Die Transkriptmengen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine Monozyten-angereicherter PBMCs wurden *ex vivo* und nach *In-vitro*-Infektion

mittels RT-qPCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*) bestimmt. Die genannten Untersuchungen haben zu neuen Erkenntnissen über Wirt-Parasit-Interaktionen während einer chronischen Infektion des Menschen mit *Toxoplasma gondii* geführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Linie	
L929	Murine Fibroblasten (adhärierend), die als Wirtszellen zur Kokultivierung von <i>T. gondii</i> genutzt wurden
<i>T. gondii</i> NTE	<i>Toxoplasma gondii</i> Typ II-Stamm, ursprünglich aus einem AIDS-Patienten in Deutschland isolierte Tachyzoiten (Gross et al. 1991)
PBMCs	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes, die durch Zentrifugation und Aufreinigung aus mononukleären peripheren Blutzellgemischen (sog. Buffy Coats) von Blutspendern aus Göttingen gewonnen wurden. Sie enthalten humane Monozyten (English und Andersen 1974)
THP-1-Monozyten	Humane Monozyten (Suspensionszelllinie), die aus einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie isoliert wurden (Tsuchiya et al. 1980)

2.1.2 Zellkulturmedien und Additive

Alle Zellkulturmedien, -reagenzien und -additive stammten von Biochrom, Berlin. Andere Hersteller sind direkt vermerkt.

2.1.2.1 Medien

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Instandpulver (Instamed T043-10), 580 mg/l L-Glutamin, 3700 mg/l NaCO₃, 4,5 g/l Glucose, auf pH 7,2 eingestellt, sterilfiltriert

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)

Instandpulver (Instamed T121-10), 300 mg/l L-Glutamin, 2000 mg/l NaCO₃, auf pH 7,2 eingestellt, sterilfiltriert

2.1.2.2 Additive

Tabelle 2: Additive

FCS (<i>fetal calf serum</i>), hitzeinaktiviert
Penicillin – 10.000 U/ml / Streptomycin – 10.000 µg/ml
NEAA (<i>non-essential amino acids</i>), 100x
Na-Pyruvat, 100 mM Stammlösung
Glucose, 10% Lösung
HEPES (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>) Puffer, 1 M

2.1.2.3 Zellkulturmedien

L929-Fibroblastenmedium:

DMEM

1% FCS

100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

1x NEAA

1 mM Na-Pyruvat

NTE-Medium:

RPMI 1640

1% FCS

100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

THP-1-Medium:

RPMI 1640

10 % FCS

1 mM Na-Pyruvat

10 mM HEPES

2,5 g/l Glucose

100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

PBMC-Medium

RPMI 1640

10% FCS

100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

PBMC-Verdünnungsmedium

RPMI 1640

100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Reagenzien	Hersteller
Agarose-Pulver	Roth, Karlsruhe
10% bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Humanes Serum AB	Institutseigene Herstellung, geprüfte Spender
2% Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
1% Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), 100 µM Stammlösung	Sigma-Aldrich, München

Reagenzien	Hersteller
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS), pH 7,4	Biochrom, Berlin
0,1% Trypanblau	Ferak, Berlin
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer), pH 8	Merck, Darmstadt
Andere Standardchemikalien	Merck, Darmstadt; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, München

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Primärantikörper	Klon	Hersteller
FITC (Fluorescein) Mouse IgG _{2a} Anti-Human CD14	M5E2	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle: FITC Mouse IgG _{2a} , κ	G155-178	BD Biosciences, Heidelberg
PE (Phycoerythrin) Mouse IgG ₁ Anti-Human CD16	3G8	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle: PE Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21	BD Biosciences, Heidelberg
Unmarkierte Antikörper (AK)		
Purified Mouse IgG ₁ Anti-Human HLA-A,B,C	G46-2.6	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Mouse IgG ₁ Anti-Human CD62L	DREG-56	BD Biosciences, Heidelberg

Primärantikörper	Klon	Hersteller
Unmarkierte Antikörper (AK)		
Purified Mouse IgG ₁ Anti-Human CD64	10.01.13	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle: Purified Mouse IgG ₁ , κ	MOPC-21	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Mouse IgG _{2b} Anti-Human CCR2	48607	R&D Systems
Isotyp-Kontrolle: Purified Mouse IgG _{2b} , κ	27-35	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Mouse IgG _{2a} Anti-Human HLA-DR,DP,DQ	Tu39	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle: Purified Mouse IgG _{2a} , κ	G155-178	BD Biosciences, Heidelberg
Sekundärantikörper		
PE-konjugiertes Ziege anti-Mouse IgG		Dianova, Hamburg

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 5: Primer für die RT-qPCR

Oligonukleotide (alle human)	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße
β -Actin forward	TATCCAGGCTGTGCTATCCC	266 bp
β -Actin reverse	CCATCTCTTGCTCGAAGTCC	
IL-10 forward	GGCGCTGTCATCGATTTCTTC	188 bp
IL-10 reverse	TAGAGTCGCCACCCTGATGT	
IL-12 forward	ATGCCCTGGAGAAATGGTG	171 bp

Oligonukleotide (alle human)	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße
IL-12 reverse	GAACCTCGCCTCCTT* ^T TGTGA	171 bp
TNF- α forward	GCCCATGTTGTAGCAAACCC	241 bp
TNF- α reverse	GGAGGT* ^T GACCT* ^T TGGTCTGG	

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich, München, bezogen.

2.1.6 Reaktionskits und Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits und Enzyme

Anwendung	Name	Hersteller
Isolation von RNA	GenElute Mammalian Total RNA Kit	Sigma-Aldrich, München
DNase-Verdau	DNase 1, Amplification Grade	Sigma-Aldrich, München
Reverse Transkription	Omniscript Reverse Transkriptase, Enzym: Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
Ribonuklease-Inhibitor	RNasin 10 U/ μ l	Promega, Madison, USA
RT-qPCR	LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I, Enzym: <i>Taq</i> -Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Roche, Mannheim

2.1.7 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Modell und Hersteller
Laminar-Flow-Sicherheitsbänke	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Zellkulturinkubator	Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Auflichtmikroskop	Leica DM IL (Leica, Heidelberg)
Mikroskop	Zeiss Axiostar plus (Zeiss, Göttingen)
Durchflusszytometer	FACS-Calibur (BD Biosciences, Heidelberg)
PCR-System	LightCycler 2.0 Real-Time PCR-System (Roche, Mannheim)
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Transilluminator	BioDoc II Digital Imaging System (Biometra, Göttingen)
Waage	Feinwaage LP 6200 S (Sartorius, Göttingen)

Weiterhin wurden Standardgeräte von üblichen Herstellern für Laborbedarf verwendet.

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial für die Zellkulturen wurde von Greiner (Frickenhäuser), Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmedienherstellung

Die Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen an Laminar-Flow-Sicherheitsbänken hergestellt und vor jedem Gebrauch optisch auf Kontaminationen untersucht.

Pro Ansatz wurde ein Volumen von ca. 500 ml mit den unter 2.1.2.2 genannten Additiven hergestellt, nach der Zubereitung wurden sie im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2 Zellkulturen und -kokulturen

Jegliche Arbeiten mit Zellkulturen fanden ebenfalls unter sterilen Bedingungen an Laminar-Flow-Sicherheitsbänken statt. Zellkulturmedien wurden vor Benutzung circa 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Zeiten der Zellen außerhalb des Inkubators wurden so gering wie möglich gehalten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Bevor die Kulturen weiterverwendet wurden, wurden sie mikroskopisch auf Zelldichte, -zustand und eventuelle Verunreinigungen kontrolliert.

2.2.2.1 L929-Mausfibroblasten

Mausfibroblasten der L929-Linie dienten als Wirtszellen für die Kokultivierung mit *T. gondii* und wurden in 6-Loch-Platten mit dem unter 2.1.2.3 genannten Medium kultiviert.

Für ihre Subkultivierung wurden die adhärenierten Zellen zunächst mit einem Zellschaber von den Böden der Zellkulturplatten gelöst und anschließend resuspendiert. Die Suspension wurde teilweise für die Kultivierung der Parasiten nach u.g. Schema (2.2.2.2) in 12-Loch-Platten pipettiert. Die verbliebene Suspension wurde zur Rekultivierung der Fibroblasten genutzt. Dazu wurden in jedes Loch einer 6-Loch-Platte 7-9 Tropfen der L929-Suspension (je nach Zelldichte) pipettiert, anschließend kamen jeweils 4 ml L929-Medium hinzu und die Inkubation wurde fortgesetzt. Dies erfolgte zweimal pro Woche, damit permanent vitale Zellen zur Verfügung standen.

2.2.2.2 *Toxoplasma gondii* NTE-Stamm

Alle Infektionen mit *Toxoplasma gondii* wurden mit dem Maus-avirulenten Typ-II-Stamm NTE durchgeführt, der ursprünglich aus einem AIDS-Patienten isoliert wurde (Gross et al. 1991).

Die Tachyzoiten wurden in 12-Loch-Platten in unterschiedlichen Parasit-Wirtszell-Verhältnissen kultiviert und bei ausreichender Wirtszellyse und vitaler, bogenförmiger Gestalt zweimal pro Woche subkultiviert.

Als Wirtszellen wurden die o.g. L929-Mausfibroblasten verwendet, deren Zellsuspension in absteigender Menge in die Vertiefungen einer neuen 12-Loch-Platte verteilt wurde. Fünf

stark besiedelte Vertiefungen einer 12-Loch-Platte mit *T.gondii*-Kultur wurden resuspendiert und dann ebenfalls in absteigender Menge in die Vertiefungen pipettiert, alle Vertiefungen der 12-Loch-Platte wurden mit etwa 1,5 ml *Toxoplasma*-Medium aufgefüllt und inkubiert. Auf diese Weise konnten über einen längeren Zeitraum reife *T.gondii*-Tachyzoiten in ausreichender Konzentration für die Infektionsversuche zur Verfügung gestellt werden.

2.2.2.3 THP1-Monozyten

Bei Monozyten der THP-1-Zelllinie handelt es sich um nicht-adhären wachsende Zellen, die aus dem Blut eines Jungen mit akuter monozystischer Leukämie isoliert wurden. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie Fc (*fragment, crystallizable*)-Rezeptoren. Weiterhin sind sie in der Lage zu phagozytieren und Lysozyme zu produzieren, sie weisen Esterase-Aktivität auf, und ihre Entartung war nicht auf eine Epstein-Barr-Virus-Infektion zurückzuführen (Tsuchiya et al. 1980).

Sie wurden in 75-cm²-Gewebekulturflaschen mit dem unter 2.1.2.3 genannten THP-1-Medium im Inkubator kultiviert. Nach einer Behandlung mit dem Phorbol-Diester PMA adhärten die Zellen an den Böden der Gewebekulturschalen. Sie wurden für die Etablierung der Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern und die korrekte Einstellung der Messparameter des Durchflusszytometers genutzt.

2.2.2.4 Isolierung von Monozyten aus Buffy Coats

Im Zentrum dieser Arbeit standen Monozyten von Blutspendern des Universitätsklinikums Göttingen. Sie wurden aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Buffy Coats gewonnen.

Die Verwendung von humanem Zellmaterial wurde unter der Antragsnummer 1/3/13 durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt.

Vor der Monozytenisolation wurde jedem Buffy Coat circa 2 ml entnommen. Diese Probe wurde bei 3.000 x g (Gravitationskonstante 9,81 m/s²) für 5 Minuten zentrifugiert und das Plasma anschließend bei -20°C eingefroren, um es später serologisch auf spezifische Immunglobuline gegen *T. gondii* zu untersuchen, sodass zwischen akut-, chronisch- bzw. nicht-infizierten Spendern unterschieden werden konnte (2.2.2.5).

Um zunächst die im Buffy Coat enthaltenen PBMCs von den Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und vom Plasma zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit dem Separationsmedium Ficoll-Paque Plus durchgeführt. Hierzu wurden 110-120 ml Buffy Coat im Verhältnis 1:3 mit PBMC-Verdünnungsmedium gemischt und anschließend je 35 ml in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque Plus pipettiert, sodass zwei Phasen entstanden. Anschließend wurde bei 900 x g für 30 Minuten mit geringer Beschleunigung und Abbremsung (Stufe 2) zentrifugiert, wobei vier Phasen

entstanden. Die dünnen, milchig-trüben Interphasen aus zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Zellen gleicher Spender) wurden nun vorsichtig abgenommen, mit mindestens dem gleichen Volumen PBMC-Verdünnungsmedium verdünnt und bei 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in PBMC-Verdünnungsmedium wurden die Zellsuspensionen gleicher Spender zusammengeführt und anschließend die Zellzahl nach Färbung mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Je nach Zellzahl wurden in vier Gewebekulturschalen je $2,65 \times 10^7$ bis 8×10^7 für die Durchflusszytometrie und in einer 6-Loch-Platte je 1×10^7 bis 2×10^7 Zellen für die RNA-Isolation ausgesät und für zwei Stunden mit PBMC-Verdünnungsmedium im Brutschrank inkubiert. Da die Monozyten an Plastikoberflächen adhärten, konnten die nicht-adhären, nicht-monozytären Zellen anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBMC-Medium entfernt werden. Schließlich wurden die Monozyten im Inkubator für Infektionsversuche (2.2.3) für 24 Stunden aufbewahrt bzw. direkt analysiert (2.2.4).

2.2.2.5 Serologischer Nachweis einer *T.-gondii*-Infektion

Blutplasma aus den Buffy Coats diente zur Bestimmung des *Toxoplasma*-Serostatus der Spender. Um zwischen positiven und negativen Proben zu unterscheiden, wurde ein immunenzymatischer, qualitativer Test zur Detektion von *T.-gondii*-spezifischen Antikörpern verwendet (VIDAS TOXO Competition Kit mit Multiparameter-Immunoanalyzer mini VIDAS, beides von bioMérieux, Nürtingen). Bei positiven Proben wurde weitergehend zwischen akuter und chronischer Infektion differenziert, indem mit zwei Reaktionskits per *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) die Immunglobuline G und M quantitativ bestimmt wurden (VIDAS TOXO IgG II und IgM mit mini VIDAS, beides von bioMérieux, Nürtingen). Ließ sich IgM nachweisen, ist von einer akuten oder abklingenden Infektion auszugehen, wobei auch Jahre nach einer Infektion der Titer persistieren kann. Um bei solchen Proben eine Infektion in den letzten Monaten auszuschließen, wurde die IgG-Avidität bestimmt (VIDAS TOXO IgG Avidity mit mini VIDAS, beides von bioMérieux, Nürtingen), wobei eine hohe Avidität zwischen Antikörper und Antigen auf eine mehr als vier Monate zurückliegende Infektion hindeutete (Suter et al. 1999). Wenn sich dem gegenüber IgM nicht nachweisen ließ, war eine chronische (latente) Infektion wahrscheinlich.

Zusätzlich wurde mit einem Reaktionskit qualitativ auf IgA getestet (PLATELIA TOXO IgA TMB von BIO RAD, München mit Microplate Washer LP35 von Sanofi Pasteur, Berlin), was bei akuter Infektion oder Reaktivierung einer chronischen Infektion nachweisbar wäre.

2.2.3 *In-vitro*-Infektion humaner Monozyten mit *T. gondii*

Alle Infektionen wurden unter sterilen Bedingungen an Laminar-Flow-Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Weiterhin wurden Kokulturen bei 37 °C, 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatosphäre inkubiert.

2.2.3.1 Isolation von *T. gondii*

Die zur *In-vitro*-Infektion benötigten Toxoplasmen stammten aus den unter 2.2.2.2 genannten Kulturen, wobei acht bis zehn Tage alte Kokulturen verwendet wurden, um eine ausreichende Zahl frisch freigesetzter Parasiten zu gewährleisten. Der Anteil von lysierten Wirtszellen bzw. von freigesetzten Parasiten wurde mikroskopisch kontrolliert, ebenso wie die Vitalität der Toxoplasmen (bogenförmig, beweglich).

Zunächst wurde die Parasit-L929-Suspension bei 34 x g für fünf Minuten zentrifugiert, um Wirtszellen zu pelletieren und von den im Überstand befindlichen Toxoplasmen zu trennen. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand bei 1.300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Bei dieser höheren Zentrifugalkraft entstand ein Parasiten-Pellet, das nach zweimaligem Waschen in 1 ml des Mediums der zu infizierenden Zellen (THP-1 oder PMBC) resuspendiert wurde. Dann erfolgte eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.3.2 Infektion von PBMC-Monozyten mit *T. gondii*

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die unter 2.2.2.4 isolierten und ausgesäten Monozyten aus Buffy Coats mit Tachyzoiten des NTE-Stammes infiziert.

Erneute Zellzahlbestimmungen wie in 2.2.2.4 ergaben, dass die Zahl vitaler Monozyten um den Faktor 5 während dieser Inkubation abnahm. Ausgehend von dieser neuen Zellzahl wurden die entsprechenden Parasitenzahlen für das korrekte Parasit-zu-Wirtszellverhältnis errechnet. Für die FACS-Analyse wurden die Wirtszellen im Parasit-zu-Wirtszellverhältnis von 3:1 und 6:1 infiziert; eine Zellkultur blieb nicht-infiziert. Für die mRNA-Isolation wurden zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Platte im Verhältnis 6:1 infiziert und zwei verblieben als nicht-infizierte Kontrollen.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die infizierten Zellen und deren Kontrollen durchflusszytometrisch analysiert (2.2.4) oder es wurde RNA isoliert (2.2.5.1).

2.2.4 Durchflusszytometrie

Von Zellen jedes Spenders wurden durchflusszytometrische Analysen zu zwei Zeitpunkten durchgeführt: Zum einen direkt nach Isolation der Monozyten (2.2.2.4), zum anderen 48 Stunden nach Isolation, wobei die Zellen zum Teil für die letzten 24 Stunden mit *T. gondii* infiziert waren (2.2.3.2).

Um die Monozyten durchflusszytometrisch untersuchen zu können, wurden zunächst die adhärennten Zellen mit Zellkulturschabern von den Böden der Gewebekulturschalen abgelöst, resuspendiert und in 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei $400 \times g$ für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Monozyten-Pellet in 10 ml PBS, pH 7,4, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und die Zahl lebender Zellen nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Pro Probe wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-V-Boden-Platte pipettiert, zentrifugiert ($400 \times g$, 4°C , 5 Minuten), der Überstand abgesaugt und die Pellets in $50 \mu\text{l}$ Blockierlösung (Tabelle 8: Lösungen für die FACS-Färbung) resuspendiert. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen sowie Fc-Rezeptoren weitgehend zu blockieren. Dadurch wurde die Spezifität der Bindung bei Inkubation mit den spezifischen Antikörpern erhöht. Daran anschließend wurde mit den Fluoreszenz-markierten (Probe 2 – 3) bzw. unmarkierten (Probe 4 - 11) Primärantikörpern (Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie) inkubiert. Dazu wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets mit je $50 \mu\text{l}$ Antikörperlösung für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Endkonzentration der unmarkierten Antikörper war $2 \mu\text{g/ml}$ und die bereits Fluoreszenz-markierten wurden im Verhältnis 1:5 verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit je $100 \mu\text{l}$ Inkubationslösung (Tabelle 8: Lösungen für die FACS-Färbung) wurden die Proben 1 – 3 in $400 \mu\text{l}$ 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in $500 \mu\text{l}$ -FACS-Röhrchen überführt. Die Proben 4 – 11 wurden 30 Minuten mit einem Fluoreszenz-markierten, 1:50-verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie) inkubiert, erneut wie oben angegeben dreimal gewaschen und in 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend in einem FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Das Prinzip des FACS ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

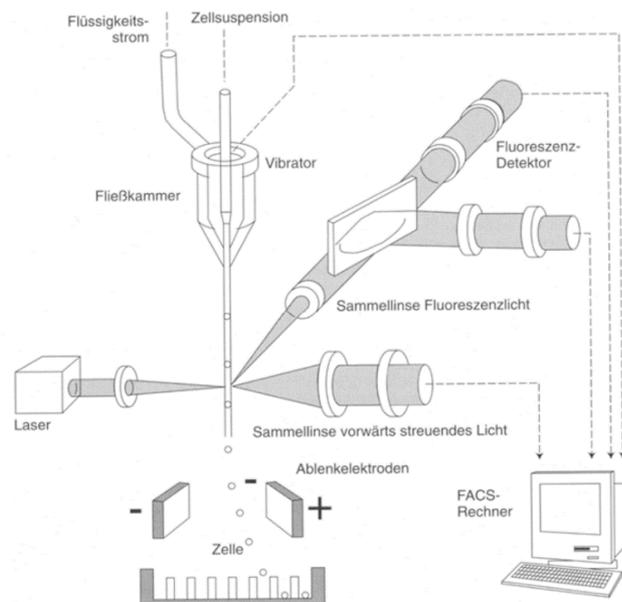


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS beruht auf der Bindung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern an spezifischen Oberflächenantigenen von Zellen und der anschließenden zytometrischen Messung ihrer Fluoreszenzintensität, Zellgröße und -granularität. Dabei wird von einer Suspension Antikörper-markierter Zellen durch einen Hüllstrom von Trägerflüssigkeit und einen sich verjüngenden Austrittskanal eine Einzelzellströmung erzeugt (*single flow*), die die Zellen nacheinander an einem Laser-Strahl vorbeiführt. Bei der Passage dieses Laser-Strahls wird ein Teil des Lichts charakteristisch als Vorwärts- und als Seitwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*, SSC = *side scatter*, nicht abgebildet) abgelenkt und von Lichtverstärkern detektiert. Aus diesen Werten wird die Zellgröße (FSC) und die Zellgranularität (SSC) abgeleitet. Weiterhin werden die an Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht einer für sie spezifischen Wellenlänge (FL (Fluoreszenz)-1, FL-2 usw.) angeregt. Durch Detektion der Lichtintensitäten können somit Rückschlüsse auf die Expression eines bestimmten Antigens gezogen werden (Bernal Sierra et al. 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Andrea Yinth Bernal Sierra.

Tabelle 8: Lösungen für die FACS-Färbung

Blockierlösung	Inkubationslösung
PBS, pH 7,4	PBS, pH 7,4
1% BSA	1% BSA
0,1% NaN ₃	0,1% NaN ₃
1% humanes Serum AB	

2.2.5 RT-qPCR

2.2.5.1 RNA-Isolation

Aus den in 6-Loch-Platten ausgesäten Monozyten-angereicherten PBMCs wurde RNA für transkriptionelle Untersuchungen isoliert, wobei zum einen direkt nach PBMC-Isolation und zum anderen nach Inkubation und Infektion mit *T. gondii* isoliert wurde.

Zunächst wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellkulturschabers von den Böden der Vertiefungen gelöst, in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, zentrifugiert (400 x g, 5 Minuten) und anschließend in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Aus den Zellpellets wurde daraufhin mit dem GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma Aldrich, München) die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Eluierung in 50 µl RNase-freiem Wasser erfolgte mit Hilfe des DNase 1, Amplification Grade-Kits (Sigma Aldrich, München) nach dem Protokoll des Herstellers ein DNase-Verdau, um bei der RT-qPCR Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen. Bevor die Proben bei – 80 °C eingefroren wurden, wurde eine geringe Menge des RNA-Eluats zur photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) abgenommen.

2.2.5.2 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Für die RT-qPCR wurde zunächst die mRNA in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben. Hierbei macht man sich ein retrovirales Enzym, die reverse Transkriptase zunutze, die aus mRNA-Strängen einzelsträngige, komplementäre DNA synthetisiert. Retroviren, wie sein populärster Vertreter, das HI-Virus (Humanes Immundefizienz-Virus), benötigen dieses Enzym, um ihre RNA in DNA umzuschreiben, die dann anschließend in das Genom der Wirtszelle integriert wird (Figiel et al. 2018).

Die mRNA wurde mit Hilfe des Omniscript Reverse Transkriptase Kits von Qiagen, Hilden umgeschrieben.

Zunächst wurde aus der photometrisch gemessenen Konzentration das Volumen der Eluate errechnet, die 1 µg RNA enthalten. Diese Volumina wurden ad 22,6 µl mit RNA-freiem Wasser in sterilen Eppendorf-Gefäßen aufgefüllt und auf Eis gehalten. Anschließend wurden 7,4 µl des Mastermix (Tabelle 9: Mastermix für die reverse Transkription) hinzugegeben und die Proben für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 9: Mastermix für die reverse Transkription

Bestandteile des Mastermixes	Volumen (pro Probe)
10x RT (Reverse Transkriptase) Puffer	3 μ l
dNTP (2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat) -Mix (5 nM pro dNTP)	2 μ l
Oligo-dT (15-25 Desoxythymidin)-Primer (50 μ M)	0,4 μ l
RNase-Inhibitor (10 U/ μ l)	1 μ l
Reverse Transkriptase (4 U/ μ l)	1 μ l
Gesamt	7,4 μ l

Nach der Inkubation befand sich die cDNA in einem Volumen von 30 μ l, von denen 10 μ l zur Herstellung von Verdünnungen mit sterilem Wasser genutzt wurden. Alle Proben wurden bei -20 °C für die qPCR eingefroren.

2.2.5.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die mRNA-Mengen aus PBMCs (bzw. die daraus generierten cDNA-Mengen) der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α , sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 wurden durch quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion bestimmt. Bei der qPCR wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (Roche, Mannheim), der an DNA-Stränge bindet, nach jedem Amplifikationszyklus die entstandene Menge an DNA photometrisch gemessen. Entscheidend war ein Schwellenwert (der sogenannte *Crossing point* (Cp)-Wert), der angab, nach welchem Amplifikationszyklus so viel DNA vorhanden war, dass ein signifikanter Fluoreszenz-Anstieg gemessen werden konnte. Je kleiner dieser Wert war, desto mehr Gen-spezifische cDNA war in der Probe vor Beginn der Amplifikationen vorhanden. Für jedes der drei oben genannten Gene und für das zur Normalisierung benutzte Gen des Proteins β -Aktin, welches konstitutiv exprimiert wird, wurden spezifische Primerpaare verwendet, die in Vorversuchen etabliert worden waren.

In dieser Arbeit wurden Zellen von fünf chronisch- und fünf nicht-*T.gondii*-infizierten Spendern untersucht, mit jeweils einem Ansatz direkt nach Isolation und je einem Ansatz nach 48h Inkubation mit bzw. ohne 24h-Infektion mit *T. gondii*.

Zunächst wurden die cDNA-Proben und Primer (5 μ M Stammlösungen) auf Eis aufgetaut, und von den Proben wurden jeweils eine 1:5- und eine 1:50-Verdünnung (bei IL-12 stattdessen 1:10-Verdünnung) mit sterilem Wasser angesetzt. Je nach Anzahl der Proben wurde nach Herstellerangaben (Tabelle 10: Probenansatz für die qPCR) der Mastermix mit dem LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim) angesetzt und davon jeweils 15 μ l in gekühlte PCR-Kapillaren (Roche, Mannheim) pipettiert. Anschließend wurden von jeder Probe 5 μ l der 1:5- oder 1:50-Verdünnung (bei IL-12 stattdessen 1:10-Verdünnung) hinzugegeben und die Kapillaren kurz zentrifugiert. Die qPCR wurde nach dem in Tabelle 11: Ablaufprotokoll der qPCR genannten Schema mit 45 Zyklen im LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführt.

Tabelle 10: Probenansatz für die qPCR

Reagenz	Volumen (pro Probe)
RNA-freies H ₂ O	9 μ l
5 μ M Primer forward	1 μ l
5 μ M Primer reverse	1 μ l
Enzymgemisch (u.a. SYBR Green I)	4 μ l
Gesamt (Mastermix)	15 μ l
+ cDNA	5 μ l
Pro Kapillare	20 μ l

Tabelle 11: Ablaufprotokoll der qPCR

Primer (alle human)	Abschnitt	Zeit	Temperatur
Alle	Initiale Denaturierung	10 Minuten	95 °C
Alle	Denaturierung	10 Sekunden	95 °C
IL-12	Annealing	10 Sekunden	67 °C
TNF-α, β-Aktin	Annealing	10 Sekunden	65 °C
IL-10	Annealing	10 Sekunden	66 °C
IL-12, TNF-α, β-Actin	Elongation	20 Sekunden	72 °C
IL-10	Elongation	10 Sekunden	72 °C
Alle	Schmelzkurve	0 Sekunden	95 °C
Alle	Kühlung	10 Minuten	40 °C

(fettgedrucktes: 45 Zyklen)

2.2.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Um die Etablierung der Primer zu kontrollieren, wurden die amplifizierten cDNA-Abschnitte mittels Agarosegel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und über ihre Größe als die korrekten Produkte identifiziert.

Dazu wurde ein 2% Gel mit TAE-Puffer hergestellt, welches mit 1 μ l Ethidiumbromid pro 10 ml Gel versetzt wurde, damit unter UV-Licht die Banden der amplifizierten DNA-Abschnitte sichtbar wurden.

Jeweils 10 μ l der amplifizierten DNA wurden dabei mit 1,5 μ l 6x DNA-Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gemischt und anschließend 10 μ l davon in eine Gel-Tasche pipettiert. In einer weiteren Tasche befand sich ein 50-bp-Molekulargewichtsmarker, mit dessen Banden später auf die Größen der Proben-DNA geschlossen werden konnte. Bei 120 V liefen die Proben für ca. 30 Minuten durch das Gel. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht im Transilluminators beleuchtet und das Bild fotografiert und ausgewertet.

2.2.6 Datenverarbeitung und -bearbeitung

Mit Hilfe der Software CellQuest Pro 5.2.1 (BD Biosciences, Heidelberg) wurden die Daten der Durchflusszytometrie erfasst und verarbeitet. Weiterhin wurden damit sämtliche Dot-Plot-Diagramme erstellt. Daten der RT-qPCR wurden mit der Software LightCycler 3 Run 5.32 bzw. Data Analysis 3.5.28 (Roche, Mannheim) erstellt.

Zur statistischen Verarbeitung der Daten wurde die Tabellenkalkulation von Excel aus Office 365 (Microsoft) und STATISTIKA 13 (Dell) benutzt. Statistische Ausreißer wurden mit Hilfe des Dixon-Tests erkannt und flossen nicht in die Auswertung mit ein. Angegeben wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanzen zwischen diesen Mittelwerten wurden mit Hilfe des Student's *t*-Tests ermittelt, wobei *p*-Werte $< 0,05$ als signifikant, *p*-Werte $< 0,01$ als hochsignifikant gewertet wurden.

Für die Sammlung, Verarbeitung und Speicherung aller Quellen wurde das Literaturverwaltungsprogramm Citavi 6 (Swiss Academic Software) verwendet. Als Textverarbeitungsprogramm wurde Word aus Office 365 (Microsoft) verwendet.

3 Ergebnisse

Schon in früheren Arbeiten wurde die Expression von Oberflächenantigenen auf murinen (Lang et al. 2006) beziehungsweise auf humanen (Stalling 2013) *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten Monozyten untersucht. Im Focus stand dabei der Einfluss des Parasiten bei *In-vitro*-Infektion und chronischer Infektion auf die Expression von HLA-A, -B, -C und HLA-DR, -DP, -DQ. Es wurde eine signifikante Inhibition der Expression der MHC-I bzw. -II-Moleküle durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* festgestellt, die von der Dosis des Parasiten abhängig war und nicht durch steigende Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ aufgehoben werden konnte. Ebenso wurden höhere Expressionsniveaus für diese Oberflächenmoleküle bei chronisch mit *T. gondii* infizierten Blutspendern beobachtet, die als Veränderungen der Subtypen-Zusammensetzung des Monozytenpools gedeutet wurden (Stalling 2013).

In dieser Arbeit wurde diese Fragestellung weiterverfolgt; es wurden die Monozyten chronisch-infizierter mit denen *T. gondii*-seronegativer Blutspender durchflusszytometrisch auf verschiedene Oberflächenantigene untersucht, die Hinweise auf Monozytensubpopulationen gaben (2.2.4). Dadurch sollte eine mögliche Verschiebung von Monozytensubpopulationen während der chronischen Toxoplasmose des Menschen nachgewiesen werden (1.4.1). Weiterhin wurde die Expression dieser Antigene auch nach *In-vitro*-Infektionsversuchen untersucht, um mögliche Unterschiede in der Reaktion von Monozyten auf eine Infektion zwischen seronegativen und -positiven Spendern zu erfassen (2.2.3).

3.1 Serologische Untersuchung der Blutproben auf *T. gondii*-spezifische Antikörper

Zur Unterscheidung zwischen *T. gondii*-naiven und akut- oder chronisch-infizierten Spendern wurden alle Proben in der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie serologisch untersucht (2.2.2.5).

Von den 21 Proben von Blutspendern der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) waren fünf *Toxoplasma*-seropositiv, wobei es sich bei allen fünf um chronische Infektionen handelte (Tabelle 12: Serologische Ergebnisse der 21 untersuchten Buffy Coats). Diese fünf Proben fielen durch einen positiven kompetitiven Screeningtest (ein immunenzymatischer qualitativer Test zur Detektion von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern) auf. Drei von ihnen wiesen in weiterführenden quantitativen Untersuchungen IgG- jedoch keine IgM-Antikörper gegen Toxoplasmen auf und konnten somit als chronisch-infiziert identifiziert werden. Bei den zwei verbliebenen Proben mit IgM-Antikörpern zeigte die hohe IgG-

Avidität an, dass eine Infektion mit *T. gondii* mindestens vier Monate zurückliegen musste, dementsprechend handelte es sich auch hierbei um latente Infektionen (Suter et al. 1999). *T.-gondii*-IgA-Antikörper, die auf eine akute oder reaktivierte Infektion hinweisen, waren bei keiner der seropositiven Proben zu finden. Fünf seropositive von 21 untersuchten Proben entspricht einer Kollektivprävalenz von 23,8% (Abbildung 4).

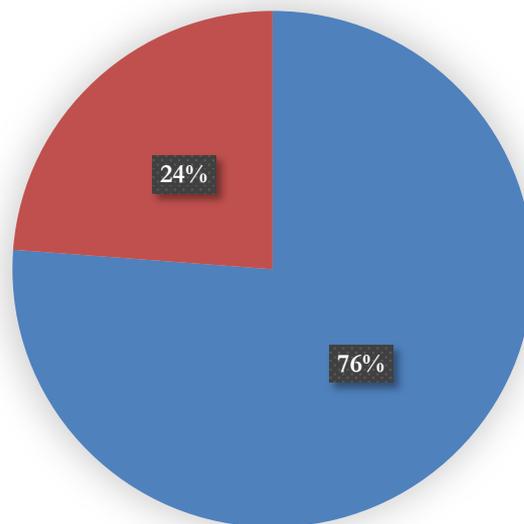


Abbildung 4: *T.-gondii*-Seroprävalenz im untersuchten Patientenkollektiv

Vor der Isolation der Monozyten wurden jedem Buffy Coat ca. 0,5 ml Blutplasma zur serologischen Analyse entnommen. Es erfolgte ein kompetitiver Screeningtest auf *Toxoplasma*-spezifische Antikörper, der bei positivem Ergebnis um quantitative Tests auf IgG, IgM und IgA sowie um die IgG-Avidität erweitert wurde. Von 21 untersuchten Proben waren 16 *Toxoplasma*-negativ (blau) und fünf -positiv (rot).

Tabelle 12: Serologische Ergebnisse der 21 untersuchten Buffy Coats

Nummer	Comp (Ig) ¹	IgG	IgM ²	IgA	IgG-Avidität
1	positiv 0,03	55 IU/ml	negativ	negativ	
2	negativ				
3	negativ				
4	negativ				
5	negativ				
6	negativ				
7	negativ				
8	negativ				
9	positiv 0,06	24 IU/ml	negativ	negativ	
10	negativ				
11	negativ				
12	negativ				
13	negativ				
14	negativ				
15	negativ				
16	positiv 0,00	>300 IU/ml	positiv 1,95	negativ	hoch
17	positiv 0,03	63 IU/ml	positiv 0,94	negativ	hoch
18	negativ				
19	negativ				
20	negativ				
21	positiv 0,01	267 UI/ml	negativ	negativ	

¹ Kompetitiver Test; angegeben sind Indexwerte, die umgekehrt proportional zur Menge der *T.-gondii*-spezifischen Antikörper sind (positiv < 1,6; VIDAS TOXO Competition Manual, bioMérieux, Nürtingen)

² Quantitativer Test; angegeben sind Indexwerte, die proportional zur Zahl der *T.-gondii*-IgM-Antikörper sind (positiv > 0,65; VIDAS TOXO IgM Manual, bioMérieux, Nürtingen)

3.2 Unterschiedliche Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten chronisch-infizierter und gesunder Blutspender *ex vivo*

Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) wurden aus Buffy Coats von Blutspendern in Göttingen isoliert und zum Teil für spätere Versuche bereitgestellt, aber auch direkt nach Isolation (zum Zeitpunkt 0h) mit Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. CD14 und CD16 wurden als Doppel- und CD62L, CD64, CCR2, HLA-A,-B,-C sowie HLA-DR,-DP,-DQ als Einzelfärbungen durchgeführt (2.2.2.4; 2.2.4). Nach CD14-Färbung von frisch isolierten PBMCs wurden Zellpopulationen selektiert, die im Durchschnitt zu ca. 97,5% \pm 0,6% CD14 schwach (CD14^{dim}) bis stark positiv (CD14⁺) waren (Abbildung 5, A) und somit als Monozyten identifiziert werden konnten (Chimma et al. 2009).

Diese CD14 positiven Zellen wurden nach Doppelfärbung direkt auf Expression von CD16 untersucht (Abbildung 5, B) oder sie wurden im FSC-/SSC-Dot-Plot-Diagramm markiert (Maß für das Zellvolumen und die -granularität in relativen Einheiten; Abbildung 6, B und C). Mit Hilfe dieser Markierung wurde anschließend die Expression einzeln gefärbter Oberflächenmoleküle untersucht, um möglichst wenig andere Zelltypen außer Monozyten in die Auswertung einfließen zu lassen (Abbildung 6).

Ausgewertet wurden jeweils die Fluoreszenz-Intensitäten sowie der prozentuale Anteil von positiven Zellen einer Probe, d. h. solchen, deren Fluoreszenzintensität höher als die der Isotypkontrolle war. Dabei wurde jeweils nach Proben chronisch *T.gondii*-infizierter sowie nicht-infizierter Personen differenziert.

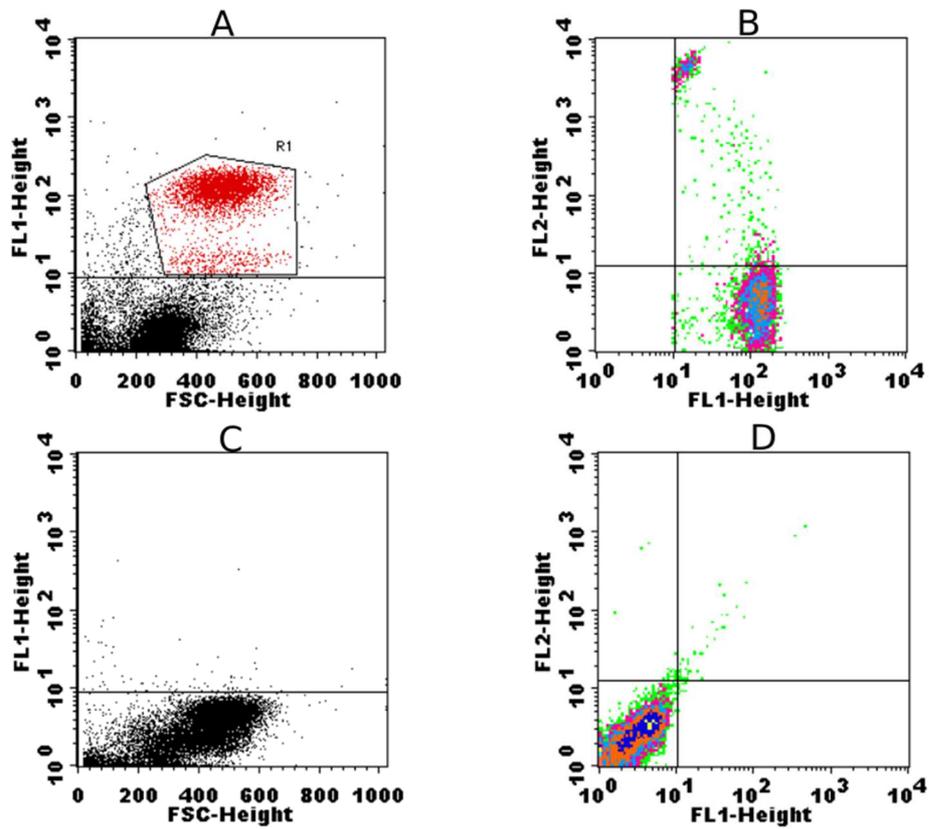


Abbildung 5: Dot-Plot-Diagramme der Doppelfärbung für CD14 und CD16 mit dazugehörigen Isotypkontrollen

Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse von peripheren mononukleären Zellen eines *Toxoplasma*-seronegativen Blutspenders. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Intensitäten für CD14 (FL1-Height, relative Einheiten) wurde die Monozyten-Population in der Probe identifiziert (A) und mit einem Analyse-Gate markiert (rote Punkte, Gate R1). Nur Zellen dieses Gates wurden zur Auswertung der Doppelfärbung für CD14 (FL1-Height) und CD16 (FL2-Height) genutzt (B). Mit Hilfe parallel durchgeführter Isotypkontrollfärbungen wurden die Grenzwerte für Antigen-positive Zellen bestimmt (C, D).

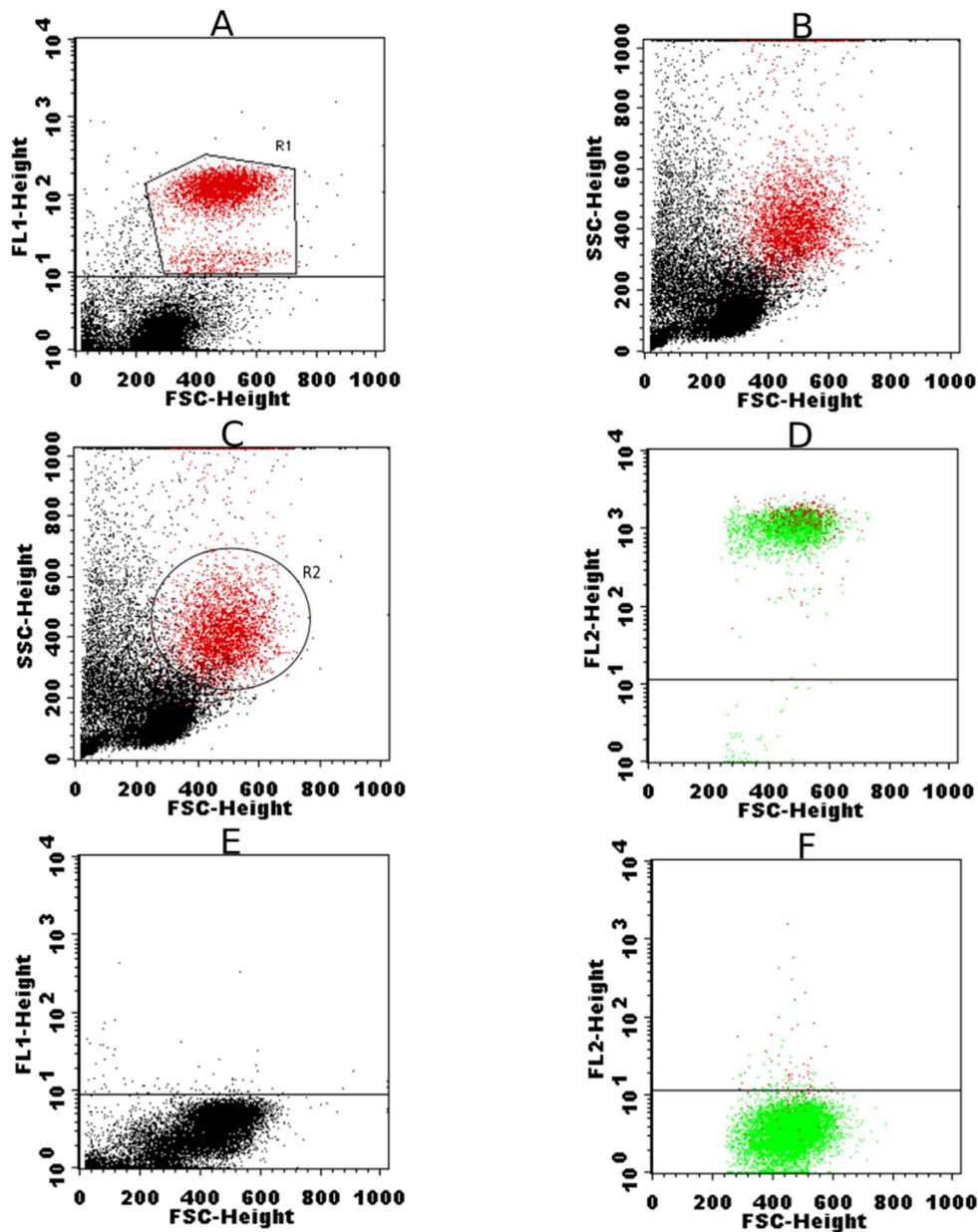


Abbildung 6: Dot-Plot-Diagramme zur Analyse einer Einzelfärbung für HLA-A,B,C und der zugehörigen Isotypkontrollfärbung

Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse der peripheren mononukleären Zellen eines *Toxoplasma*-seronegativen Blutspenders. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Intensitäten für CD14 (FL1-Height, relative Einheiten) wurde die Monozyten-Population in der Probe identifiziert (A) und mit einem Analyse-Gate markiert (rote Punkte, Gate R1). Die CD14-positiven Zellen wurden im FSC-/SSC-Dot-Plot-Diagramm markiert (B) und mit Hilfe eines weiteren Gates (C, Gate R2) für die nachfolgende Analyse von Einzelfärbungen von Zellen des gleichen Spenders selektiert. Die so ausgewählten Zellen wurden anschließend auf die Expression anderer Antigene, wie hier HLA-A,B,C (D, FL2-Height) untersucht. Mit Hilfe parallel durchgeführter Isotypkontrollfärbungen wurden die Grenzwerte für Antigen-positive Zellen festgelegt (E, F).

Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Oberflächenantigene von *Toxoplasma*-seropositiven und -negativen frisch isolierten Proben fand sich eine hochsignifikante Reduktion von CD16, gleichzeitig wurden die meisten der anderen untersuchten Oberflächenmoleküle bei chronischer *Toxoplasma*-Infektion zwar nicht-signifikant, aber im Durchschnitt deutlich geringer exprimiert als in seronegativen Spendern.

Bei chronisch-Infizierten war die Expression von CD14 (ein Lipopolysaccharidrezeptor, der vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird; Wright et al. 1990) mit $75,9 \pm 5,4$ relativen Einheiten niedriger als im Vergleich zu Kontrollspendern ($92,0 \pm 5,2$ rel. Einheiten; Abbildung 7). Der niedrigaffine IgG-Fc-Rezeptor CD16 (wird u.a. von „nicht-klassischen Monozyten“ exprimiert; Chikka et al. 2009; Li et al. 2016) wurde am deutlichsten durch eine latente Infektion mit *T. gondii* beeinflusst. Die mittlere Fluoreszenzintensität von CD16 war mit $47,2 \pm 5,4$ bei *Toxoplasma*-positiven Spendern im Vergleich zu $176,7 \pm 21,1$ rel. Einheiten bei seronegativen Personen hochsignifikant geringer ($p=0,009$; Abbildung 7). Weiterhin wurde das Zelladhäsionsmolekül CD62L (wird u.a. von „klassischen Monozyten“ exprimiert; Xu et al. 2008; Chikka et al. 2009) deutlich weniger und der Chemotaxis-Rezeptor CCR2 (wird von „klassischen Monozyten“ exprimiert; Han et al. 1998; Chikka et al. 2009) durchschnittlich weniger auf Monozyten *T.gondii*-positiver Spender exprimiert (Abbildung 7). CD64, ein hochaffiner Fc-Rezeptor für IgG, der ebenfalls von „klassischen Monozyten“ exprimiert wird (Hulett und Hogarth 1998; Chikka et al. 2009) war bei seropositiven mit $146,9 \pm 24,7$ und seronegativen Individuen mit $155,8 \pm 13,6$ rel. Einheiten nahezu gleich stark exprimiert (nicht gezeigte Ergebnisse). Gleiches gilt für die MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A,B,C und die MHC-Klasse-II-Moleküle HLA-DR,DP,DQ (nicht gezeigte Ergebnisse).

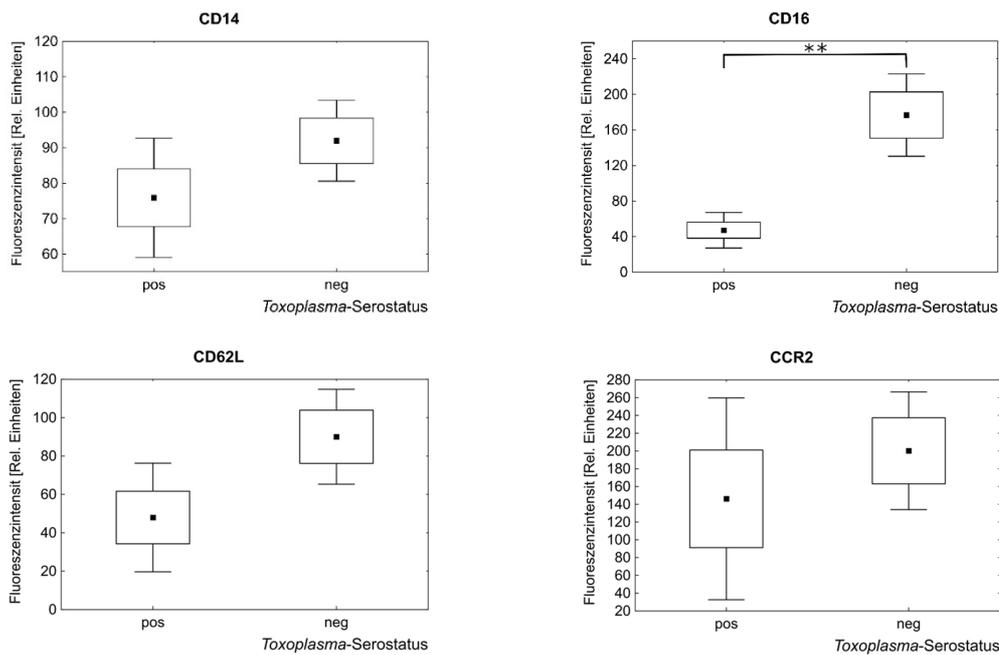


Abbildung 7: Expression von CD14, CD16, CD62L und CCR2 auf humanen Monozyten von chronisch *T.-gondii*-infizierten und nicht-infizierten Blutspendern

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs von chronisch *T.-gondii*-infizierten und nicht-infizierten Blutspendern wurden direkt nach Isolation mit Antikörpern für die o.g. Oberflächenantigene markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden Proben von 16 seronegativen (neg) und fünf seropositiven (pos) Blutspendern untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der Fluoreszenzintensitäten von den Oberflächenantigenen CD14, CD16, CD62L und CCR2. Hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Unterschiede zwischen chronisch-infizierten und *T.-gondii*-negativen Blutspendern wurden mit dem Student's *t*-Test ermittelt.

Bei der prozentualen Verteilung der Monozyten wurden dagegen zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Spendergruppen festgestellt, die jedoch nicht auf eine Umverteilung zwischen den drei bekanntesten Monozyten-Subpopulationen des Menschen während einer chronischen Toxoplasmose hindeuteten. So war der Anteil an CD14⁺CD16⁻ Zellen bei seropositiven Spendern ähnlich hoch wie bei seronegativen Spendern (86,1% \pm 1,8% im Vergleich zu 84,4% \pm 1,0%; Abbildung 8). Gleichzeitig war der Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten bei Spendern mit chronischer Toxoplasmose geringfügig, jedoch nicht-signifikant niedriger als bei nicht-infizierten Personen (7,1% \pm 1,7% im Vergleich zu 8,1% \pm 0,8%; Abbildung 8). CD16⁺CD14^{dim} und CCR2 positive Monozyten waren in beiden Personengruppen nahezu gleich häufig nachzuweisen. In der Gruppe der seronegativen Spender lag der Anteil der CD16⁺CD14^{dim} Monozyten bei 4,8% \pm 0,6%, positiv für CCR2 waren in dieser Gruppe 86,8% \pm 1,5% der Monozyten (nicht gezeigte

Ergebnisse). Ebenso veränderte sich der Gesamtanteil an CD14 positiven Zellen ($CD14^+CD16^- + CD14^+CD16^+$) mit jeweils etwa $97\% \pm 0,7\%$ durch den Infektionsstatus nicht (Abbildung 8, siehe Grafiken für $CD14^+CD16^-$ und $CD14^+CD16^+$). Weiterhin war bei Chronisch-Infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollpersonen der Prozentsatz von CD62L positiven Monozyten mit $29,1\% \pm 5,9\%$ gegenüber $51,3\% \pm 4,4\%$ signifikant niedriger (Abbildung 8; $p=0,022$). Dagegen war der Anteil von CD64-positiven Zellen bei Chronisch-Infizierten mit $93,5\% \pm 1,2\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $89,5\% \pm 0,8\%$ signifikant höher ($p=0,037$, Abbildung 8). Außer einem geringfügig höheren Anteil von HLA-A,B,C-positiven Zellen bei *Toxoplasma*-seropositiven Personen, der aber statistisch nicht signifikant war, ließen sich keine Auswirkungen auf die Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen durch eine chronische Infektion mit *T. gondii* nachweisen (nicht gezeigte Ergebnisse).

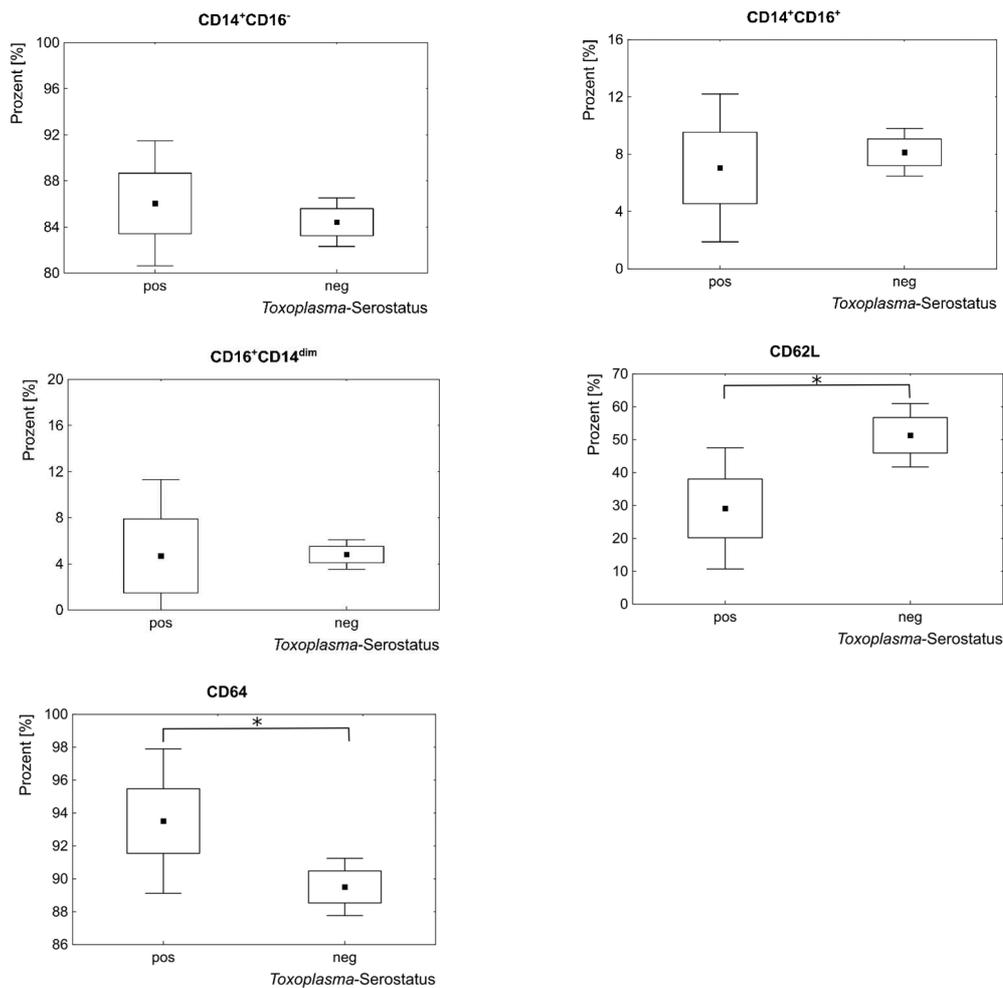


Abbildung 8: Anteil CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD16⁺CD14^{dim}, CD62L-positiver und CD64-positiver Monozyten von chronisch *T. gondii*-infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs von chronisch *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten Blutspendern wurden direkt nach Isolation mit Antikörpern für die o.g. Oberflächenantigene markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden die Zellen von 16 seronegativen und fünf seropositiven Blutspendern untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der prozentualen Anteile von CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD16⁺CD14^{dim}, CD62L- und CD64-positiven Monozyten. Als positiv wurden Monozyten gewertet, deren Fluoreszenz über denen der dazugehörigen Isotypkontrollfärbung lagen. Signifikante (*; $p < 0,05$) Unterschiede zwischen chronisch-infizierten und *T. gondii*-negativen Blutspendern wurden mit dem Student's *t*-Test ermittelt.

Zusammenfassend wiesen Monozyten von *T.gondii*-seropositiven Spendern im Vergleich zu seronegativen Spendern zum Teil deutliche Veränderungen im Expressionsmuster von CD14, CD16, CD62L und CD64 auf, die jedoch nicht mit veränderten prozentualen Verteilungen von den drei bekanntesten Monozytensubpopulationen einhergingen.

3.3 Auswirkungen von *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* auf die Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten chronischer Toxoplasmose-Patienten und seronegativer Kontrollpersonen

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs wurden nicht nur direkt nach Isolation durchflusszytometrisch analysiert (2.2.4), sondern auch für weitere Infektionsversuche bereitgehalten. Dazu wurden sie nach Isolation für 24 Stunden in PBMC-Medium inkubiert und anschließend in den Parasit-Wirtszellverhältnissen von 3:1 und 6:1 für 24 Stunden mit *T. gondii* infiziert (48h + Tg). Eine Kontrollprobe verblieb nicht-infiziert und wurde weitere 24h inkubiert (48h ni), sodass die Proben zum gleichen Zeitpunkt untersucht werden konnten. Diese Kontrollprobe diente dem Ziel, einen Effekt durch die Inkubation *in vitro* nicht fälschlicherweise als Effekt der parasitären Infektion zu deuten. Im Folgenden sind im Text hauptsächlich die Ergebnisse für Monozyten der Gruppe *T.gondii*-negativer Spender explizit dargestellt, da diese den größeren Probenumfang mit 16 versus fünf Proben besaßen und sich häufig nicht von den Proben chronisch-infizierter Personen unterschieden. Deutliche Unterschiede zwischen den zwei Spendergruppen werden jedoch ebenfalls explizit erwähnt.

Durch eine 24-stündige *In-vitro*-Infektion von PBMCs seronegativer Blutspender mit *T. gondii* wurde die Expression von CD14 dosis-abhängig und im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle hochsignifikant gehemmt (Abbildung 9). So reduzierte sich die Fluoreszenz-Intensität von $156,0 \pm 12,0$ auf $94,0 \pm 8,5$ für 3:1-infizierte Zellen und für 6:1 auf $79,4 \pm 9,0$ rel. Einheiten ($p=0,001$ bzw. $p=0,0001$). Auch im Vergleich zu frisch isolierten Zellen konnte bei der höheren Infektionsdosis eine geringgradige Hemmung beobachtet werden. Interessanterweise stieg die Expression von CD14 auf nicht-infizierten Monozyten von seronegativen Spendern innerhalb von 2 Tagen hochsignifikant an ($p=0,00009$; Abbildung 9). Die Expression von CD14 wurde auch auf Monozyten chronisch *Toxoplasma*-Infizierter durch *In-vitro*-Infektion hochsignifikant gehemmt (Abbildung 9). Ebenso stieg die Expression von CD14 auf Kontroll-Monozyten Toxoplasmose-positiver Spender innerhalb von zwei Tagen nach Isolation hochsignifikant an (Abbildung 9). Die Expression von CD16 wurde auf nicht-infizierten Kontroll-Monozyten von seronegativen Individuen innerhalb von 48 Stunden nach Isolation von

176,7 \pm 21,1 auf 245,5 \pm 36,0 rel. Einheiten ebenfalls hochreguliert, bei seropositiven Spendern war dies mit $p=0,006$ sogar hochsignifikant (Abbildung 9). Die CD16-Hochregulation war durch *In-vitro*-Infektion von PBMCs seronegativer Spender mit *T. gondii* Dosis-unabhängig und signifikant auf 130,0 \pm 15,3 (3:1, $p=0,013$) bzw. 134,0 \pm 17,1 rel. Einheiten (6:1, $p=0,015$) gehemmt. Auf Monozyten *Toxoplasma*-seropositiver Spender war diese Parasiten-induzierte Hemmung sogar noch ausgeprägter, auch hier konnte keine Dosis-Abhängigkeit festgestellt werden. So verminderte sich in dieser Gruppe die Fluoreszenz-Intensität nach Infektion im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 von 271,2 \pm 35,7 auf 83,0 \pm 23,0 rel. Einheiten (Abbildung 9; $p=0,004$).

In der Gruppe der *Toxoplasma*-negativen Kontrollspender wurde auch die durch zweitägige Inkubation bedingte Hochregulation von CD62L durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* im Mittel gehemmt, jedoch war diese Hemmung nicht signifikant oder Dosis-abhängig (nicht gezeigte Ergebnisse). Bei chronisch-infizierten Blutspendern ließ sich diese Veränderung gar nicht nachweisen. Eine *Ex-vivo*-Inkubation von PBMCs von chronisch-infizierten und von seronegativen Blutspendern führte zu deutlich verstärkter Expression von HLA-A,B,C und HLA-DR,DP,DQ. Die Infektionsversuche mit Toxoplasmen veränderten sowohl bei seropositiven als auch *T. gondii*-naiven Spendern die Expression von HLA-A,B,C-Molekülen kaum (nicht gezeigte Ergebnisse). Die Monozyten der beiden Spendergruppen reagierten dagegen auf *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* hinsichtlich der Expression von HLA-DR,DP,DQ gegensätzlich. So wurde durch eine 6:1-Infektion bei seronegativen Individuen die Expression signifikant gehemmt ($p=0,044$), wohingegen das gleiche Parasit-Wirtszellverhältnis bei *T. gondii*-seropositiven Individuen die Expression signifikant hochregulierte ($p=0,047$). Bei der niedrigeren Infektionsdosis wurde in beiden Fällen keine Signifikanz erreicht, was für eine Dosis-Abhängigkeit spricht (Abbildung 10).

Die Expression von CD64 wurde auf Monozyten beider Personengruppen durch *In-vitro*-Inkubation für 2 Tage zum Teil deutlich gehemmt, ein Effekt, der durch *T. gondii* vor allem in geringer Infektionsdosis signifikant gehemmt wurde (Abbildung 10; $p=0,022$).

In-vitro-Infektion mit *T. gondii* führte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle auch zu einer sehr stark verminderten Expression von CCR2 auf den Monozyten beider Personengruppen (Abbildung 10). So reduzierte sich die Fluoreszenz-Intensität bei Monozyten von seronegativen Spendern annähernd um den Faktor 8 im Vergleich zur Kontrollinkubation; sie sank von 126,1 \pm 34,8 auf 16,0 \pm 1,1 (3:1, $p=0,0176$) und auf 17,8 \pm 1,6 rel. Einheiten (6:1, $p=0,007$). Noch deutlicher waren diese Veränderungen bei den chronisch-infizierten Spendern, jedoch erreichte dies nur bei der höheren Infektionsdosis einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0446$; Abbildung 10).

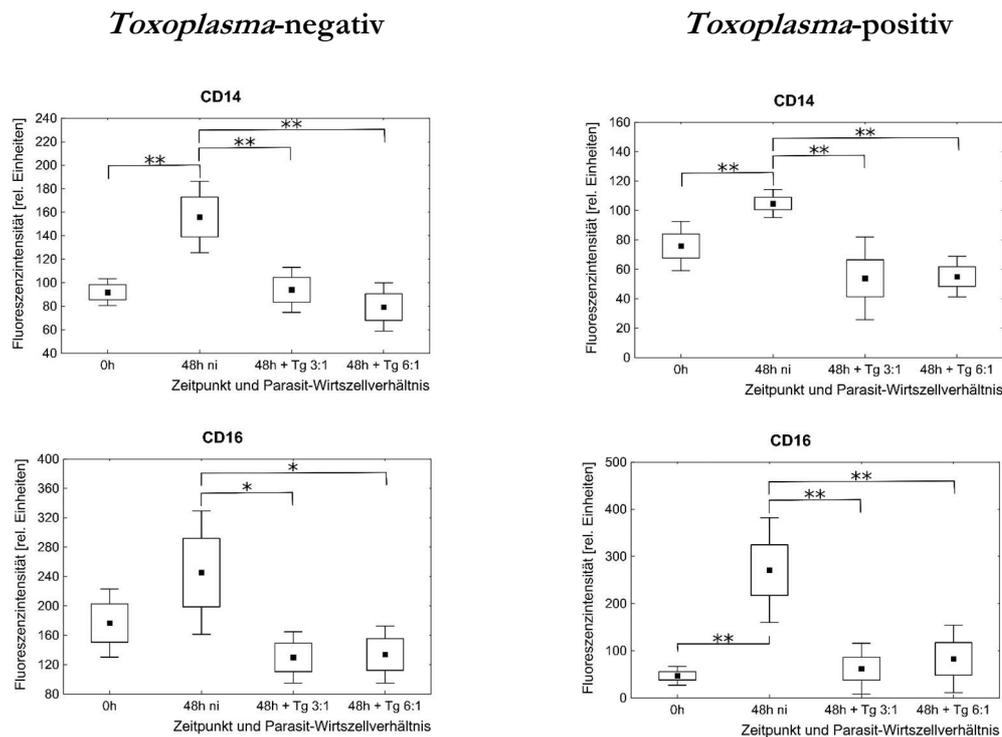


Abbildung 9: Expression von CD14 und CD16 auf humanen Monozyten von chronisch *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten Blutspendern *ex vivo* und nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii*

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs wurden für 24 h in PBMC-Medium inkubiert und anschließend in den Parasit-Wirtszellverhältnissen 3:1 (48h + Tg 3:1) und 6:1 (48h + Tg 6:1) für weitere 24 h infiziert. Kontrollzellen blieben nicht-infiziert (48h ni). Im Anschluss erfolgte die Markierung mit Antikörpern für die o.g. Oberflächenantigene und die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden PBMCs von 16 seronegativen und fünf seropositiven Individuen untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der Fluoreszenzintensitäten von den Oberflächenantigenen CD14 und CD16. Signifikante (*; $p < 0,05$) bzw. hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Veränderungen durch *In-vitro*-Infektion oder Inkubation wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt.

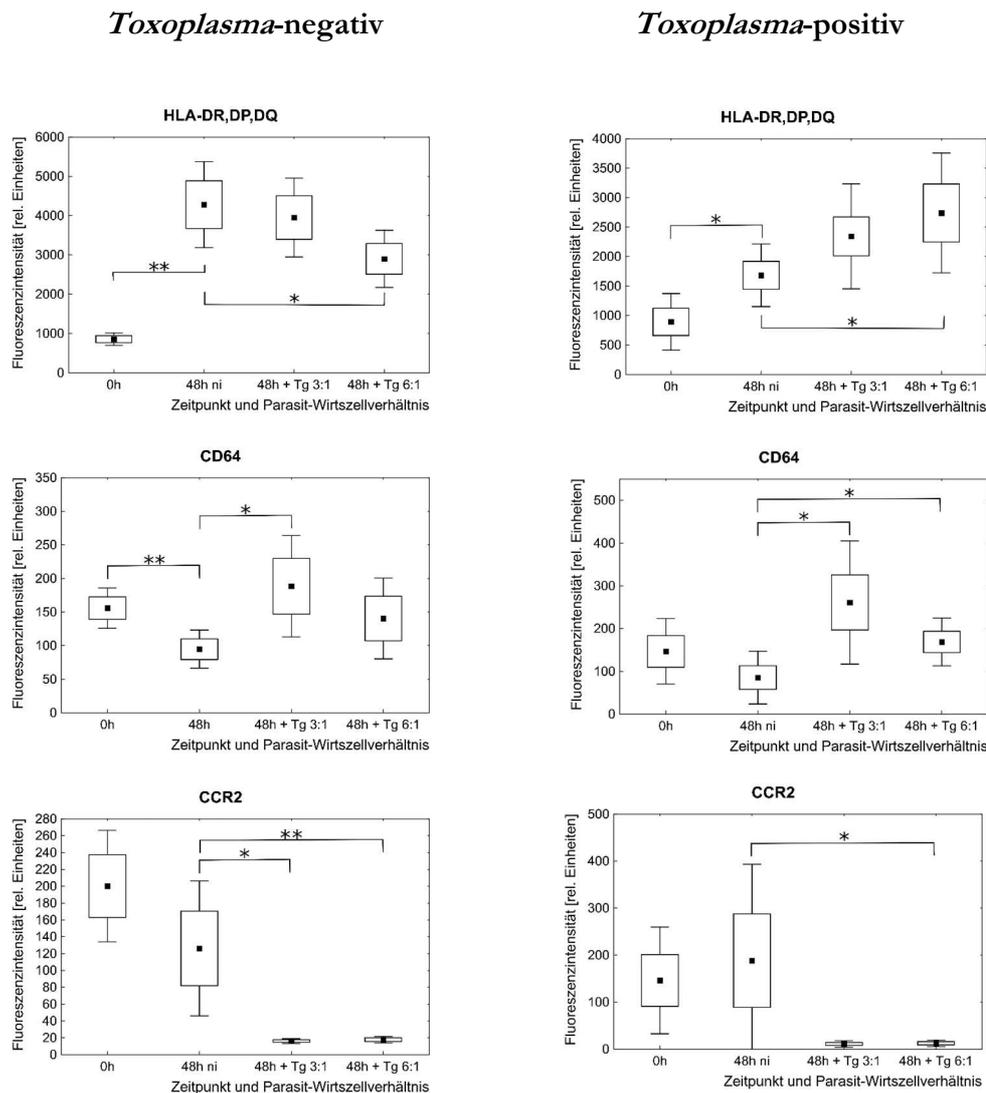


Abbildung 10: Expression von HLA-DR,DP,DQ, CD64 und CCR2 auf humanen Monozyten von chronisch *T.-gondii*-infizierten und nicht-infizierten Blutspendern *ex vivo* und nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii*

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs wurden für 24 h in PBMC-Medium inkubiert und anschließend in den Parasit-Wirtszellverhältnissen 3:1 (48h + Tg 3:1) und 6:1 (48h + Tg 6:1) für weitere 24 h infiziert. Kontrollzellen blieben nicht-infiziert (48h ni). Im Anschluss erfolgte die Markierung mit Antikörpern für CD14 und die o.g. Oberflächenantigene und die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden PBMCs von 16 seronegativen und fünf seropositiven Individuen untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der Fluoreszenzintensitäten von den o.g. Oberflächenantigenen. Signifikante (*; $p < 0,05$) bzw. hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Veränderungen durch *In-vitro*-Infektion oder Inkubation wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt.

In-vitro-Infektion mit *T. gondii* löste auch spezifische Veränderungen der Zusammensetzung humaner Monozytensubpopulationen aus. Durch Inkubation der PBMCs von *Toxoplasma*-seronegativen Spendern *ex vivo* für 2 Tage reduzierte sich der Anteil CD14⁺CD16⁻ Monozyten hochsignifikant ($p < 0,001$) von 84,4% \pm 1,0% bei frisch isolierten Proben auf 22,0% \pm 2,8% (Abbildung 11). Eine *Ex-vivo*-Infektion mit *T. gondii* hob diesen Effekt mehr als vollständig und Dosis-abhängig auf, der Anteil CD14⁺CD16⁻ Zellen stieg hochsignifikant auf 92,8% \pm 1,5% (3:1, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollinkubation) bzw. auf 94,6% \pm 0,6% (6:1, $p < 0,001$; Abbildung 11). Ähnliche Veränderungen des Anteils CD14⁺CD16⁻ Monozyten wurden auch nach Kontrollinkubation bzw. *Ex-vivo*-Infektion von PBMCs chronisch-infizierter Toxoplasmose-Patienten nachgewiesen (Abbildung 11). Im Gegensatz zur steigenden Fluoreszenz von CD16 durch 48-stündige Inkubation fiel der Anteil CD16⁺CD14^{dim} Zellen durch diese deutlich um mehr als die Hälfte von 4,8% \pm 0,6% auf 1,3% \pm 0,2% bei *T. gondii*-seronegativen Personen ($p < 0,001$). Durch *In-vitro*-Infektion der PBMCs reduzierte sich dieser Wert weiter und Dosis-abhängig auf 0,6% \pm 0,2% bei einem Parasit-Wirtszellverhältnis von 3:1 ($p = 0,048$) und bei einem Verhältnis von 6:1 auf 0,3% \pm 0,1% ($p = 0,002$). Bei humanen Monozyten von *Toxoplasma*-seropositiven Spendern reduzierte sich der Anteil CD16⁺CD14^{dim} Zellen durch *Ex-vivo*-Inkubation nicht-signifikant, und nur bei höherer Infektionsdosis wurde eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils erreicht (Abbildung 11). Analog dazu sank auch der Anteil von CD14⁺CD16⁺ Zellen unter den untersuchten Monozyten von seronegativen Kontrollpersonen und chronisch *Toxoplasma*-Infizierten in Folge der parasitären Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen hochsignifikant und Dosis-abhängig (Abbildung 11). Damit wirkte die Infektion mit *T. gondii* dem hochsignifikanten Anstieg von z. B. 8,1% \pm 0,8% auf 74,0% \pm 3,0% ($p < 0,001$) bei seronegativen Spendern nach *Ex-vivo*-Inkubation der Zellen für 2 Tage deutlich entgegen. Am stärksten ausgeprägt war dies bei Chronisch-Infizierten und einem Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 (von 77,1% \pm 1,4% auf 2,3% \pm 0,9%, $p < 0,001$; Abbildung 11). Bei seronegativen Kontrollspendern, nicht aber bei chronisch-infizierten Spendern war der Gesamtanteil CD14 positiver Monozyten (CD14⁺CD16⁻ + CD14⁺CD16⁺) nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 von 97,2% \pm 0,4% auf 98,7% \pm 0,2% ($p = 0,007$) hochsignifikant erhöht. Infektion mit der niedrigeren Dosis von 3:1 führte diesbezüglich dagegen nicht zu signifikanten Veränderungen (nicht gezeigte Ergebnisse). Die für CD64 positiven Monozyten reduzierten sich in beiden Spendergruppen hochsignifikant durch zweitägige Inkubation. *In-vitro*-Infektionen führten dagegen zu keinen nennenswerten Veränderungen der Pools von CD64 und CD62L positiven Zellen (nicht gezeigte Ergebnisse).

Bei den CCR2-positiven Zellen ließen sich die deutlichsten Veränderungen durch eine Infektion mit *T. gondii* feststellen. So reduzierte die Infektion der PBMCs von *Toxoplasma*-naiven Blutspendern mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 den Anteil CCR2 positiver Monozyten von 86,2% \pm 1,5% auf nur noch 4,8% \pm 1,0% (Abbildung 12). Dagegen sank der Anteil CCR2-positiver Zellen in nicht-infizierten Kontrollzellen im

gleichen Zeitraum lediglich auf $42,4\% \pm 5,8\%$ ($p < 0,001$). *T. gondii* verstärkte damit den Effekt der *In-vitro*-Kultivierung noch einmal hochsignifikant ($p = 0,000019$). Diese Veränderungen traten ähnlich auch nach Infektion von PBMCs chronisch *Toxoplasma*-infizierter Personen bzw. in nicht-infizierten Kontrollzellen auf (Abbildung 12).

Infektionen von PBMCs *in vitro* mit *T. gondii* führten zu keiner eindeutigen Veränderung des Pools MHC-Klasse-I- und -II-positiver Zellen in beiden Spendergruppen. So wurde zum Beispiel der Anteil HLA-A,B,C- und HLA-DR,DP,DQ-positiver Zellen bei seropositiven Personen durch die niedrigere Infektionsdosis reduziert und durch die höhere erhöht. *T. gondii*-naive Individuen wiesen nach *In-vitro*-Infektion diskrete Erhöhungen des HLA-A,B,C-Zell-Pools auf, jedoch konnte über ihren HLA-DR,DP,DQ-Zell-Pool wegen hoher Variabilität der Werte kein Ergebnis formuliert werden (nicht gezeigte Ergebnisse).

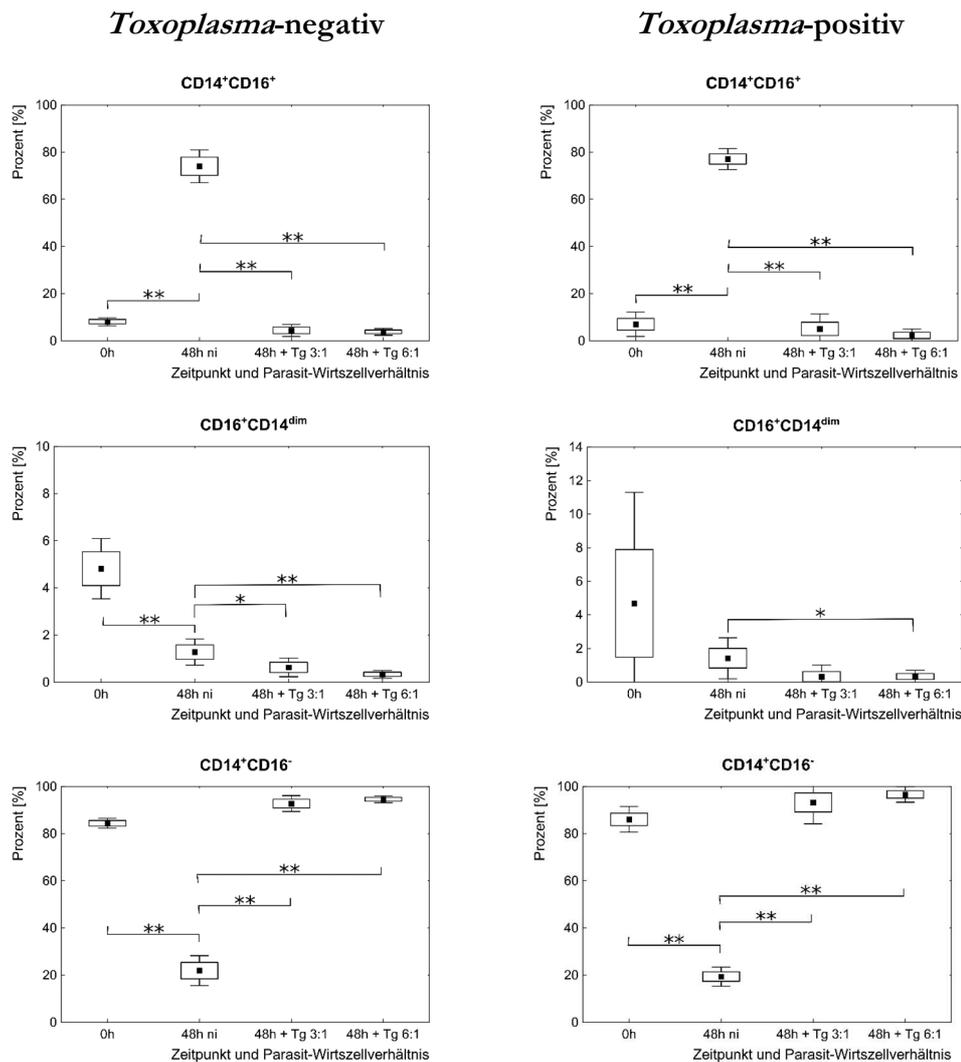


Abbildung 11: Anteil $CD14^+CD16^-$, $CD16^+CD14^{dim}$ und $CD14^+CD16^+$ mononukleärer Zellen von chronisch *T. gondii*-infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen *ex vivo* und nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii*

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs wurden für 24 h in PBMC-Medium inkubiert und anschließend in den Parasit-Wirtszellverhältnissen 3:1 (48h + Tg 3:1) und 6:1 (48h + Tg 6:1) für weitere 24 h infiziert. Kontrollzellen blieben nicht-infiziert (48h ni). Im Anschluss erfolgte die Markierung mit Antikörpern für die o.g. Oberflächenantigene und die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden 16 seronegative und fünf -positive Proben untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der prozentualen Anteile von $CD14^+CD16^-$, $CD16^+CD14^{dim}$ und $CD14^+CD16^+$ Monozyten. Als Antigen-positiv wurden Monozyten gewertet, deren Fluoreszenz-Werte über denen der dazugehörigen Isotypkontrolle lagen. Signifikante (*; $p < 0,05$) bzw. hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Änderungen durch *In-vitro*-Infektion oder Inkubation wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt.

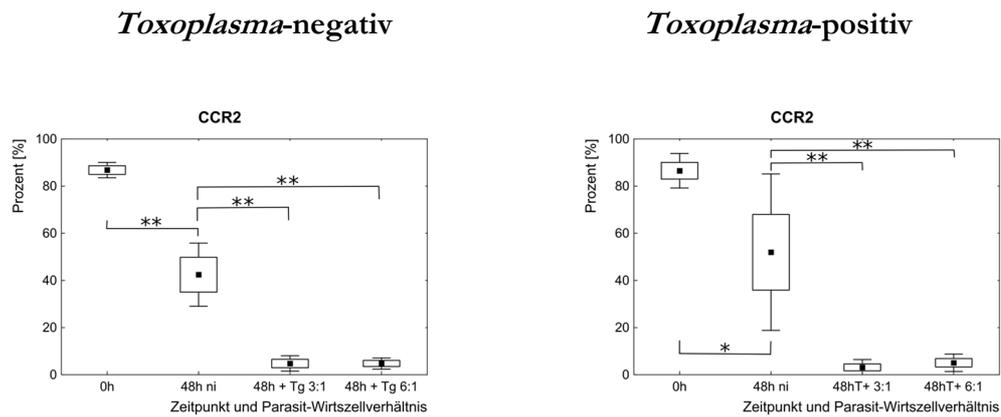


Abbildung 12: Anteil CCR2 positiver peripherer mononukleärer Zellen von chronisch *T. gondii*-infizierten Blutspendern und seronegativen Kontrollen *ex vivo* und nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii*

Die aus Buffy Coats isolierten PBMCs wurden für 24 h in PBMC-Medium inkubiert und anschließend in den Parasit-Wirtszellverhältnissen 3:1 (48h + Tg 3:1) und 6:1 (48h + Tg 6:1) für weitere 24 h infiziert. Kontrollzellen blieben nicht-infiziert (48h ni). Im Anschluss erfolgte die Markierung mit Antikörpern für CD14 und CCR2 und die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden die CD14-positiven Zellen markiert und für die weitere Analyse selektiert. Es wurden 16 seronegative und fünf -positive Proben untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der prozentualen Anteile von CCR2 positiven Monozyten. Als positiv wurden Monozyten gewertet, deren Fluoreszenz-Werte über denen der dazugehörigen Isotypkontrolle lagen. Signifikante (*; $p < 0,05$) bzw. hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Einflüsse durch die *In-vitro*-Infektion oder Inkubation wurden mittels Student's t-Test ermittelt.

Zusammenfassend konnten nach *In-vitro*-Infektion von PBMCs mit *T. gondii* bei *Toxoplasma*-seropositiven und -negativen Spendern zum Teil hochsignifikante Veränderungen der Expression von Oberflächenmarkern auf Monozyten nachgewiesen werden. So erhöhte die 24-stündige Infektion den Anteil von CD14⁺CD16⁻ Zellen während gleichzeitig weniger CD16⁺CD14^{dim} und weniger CD14⁺CD16⁺ Monozyten nachgewiesen wurden. Ebenso war die Population CCR2-positiver Monozyten stark reduziert. Die Fluoreszenzintensitäten all dieser Oberflächenantigene nahmen nach *In-vitro*-Infektion ab, nur die von CD64 und die von HLA-DR,DP,DQ seropositiver Spender stieg an. Dabei reagierten CD14-positive PBMCs chronisch-infizierter Toxoplasmose-Patienten und seronegativen Kontrollpersonen nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* meist ähnlich. Auch *In-vitro*-Kultivierung von PBMCs beider Spendergruppen ohne *T. gondii* führte häufig zu spezifischen Veränderungen in der Expression der hier untersuchten Oberflächenmoleküle bzw. der Zusammensetzung der Monozytenpopulation.

3.4 Transkriptmengen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach Infektion von PBMCs mit *T. gondii in vitro*

Die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen auf Monozyten und deren Veränderungen in Abhängigkeit vom Infektionsstatus bzw. nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* wies auf deutliche Veränderungen des Oberflächenantigen-Musters von Monozyten unter dem Einfluss des Parasiten hin.

Ob sich der Effekt auf Oberflächenantigene der Monozyten beschränkt oder auch Einfluss auf die Zytokin-Produktion von Monozyten-angereicherten PBMCs hat, wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (RT-qPCR) untersucht. Dazu wurden die Transkriptmengen von Genabschnitten der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen.

3.4.1 Hochregulation von IL-12 und Runterregulation von IL-10 auf mRNA-Ebene bei *In-vitro*-Infektion

Die Transkriptmengen der Zytokine IL-10, IL-12, TNF- α und des konstitutiv exprimierten, zur Normalisierung der mRNA-Mengen genutzten β -Actins wurden in Monozyten-angereicherten peripheren mononukleären Zellen des Blutes von jeweils fünf *Toxoplasma*-seropositiven und seronegativen Blutspendern bestimmt (2.2.5). Dabei wurden adhärente PBMCs direkt nach Isolation der Zellen (0 Stunden) und nach *In-vitro*-Kultivierung der Zellen für 48 Stunden mit bzw. ohne 24-stündige *T. gondii*-Infektion im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 untersucht.

3.4.1.1 IL-12

Durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* wurde die Transkriptmenge für IL-12 gegenüber nicht-infizierten Kontrollzellen signifikant erhöht (Abbildung 13). So wurde in adhärennten PBMCs von *Toxoplasma*-seropositiven Proben die IL-12-mRNA in infizierten Zellen ca. 5-fach stärker hochreguliert als in nicht-infizierten Kontrollzellen (5,2-fach \pm 1,8 in nicht-infizierten PBMCs und 25,9-fach \pm 6,0 in infizierten PBMCs; $p=0,0152$). In ähnlicher Weise erhöhte sich der IL-12-mRNA-Gehalt in adhärennten PBMCs seronegativen Blutspender von 3,1-fach \pm 0,9 auf 14,2-fach \pm 3,1; $p=0,0154$), jedoch lagen deren Ratios deutlich, aber nicht signifikant unter denen der positiven Blutspender (Abbildung 13).

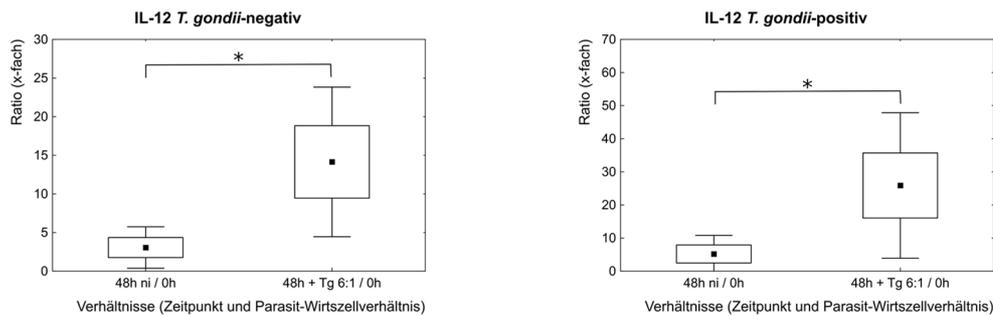


Abbildung 13: IL-12-Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs *T.-gondii*-positiver und -negativer Blutspender nach Infektion mit *T. gondii in vitro* und in nicht-infizierten Kontrollzellen

PBMCs von fünf seropositiven und fünf seronegativen Blutspendern wurden bezüglich ihrer Transkriptmenge für IL-12 mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Jeweils eine Probe wurde direkt nach Isolation (0h), eine nach 48-stündiger Inkubation ohne Infektion (48h ni) und eine nach 48-stündiger Inkubation mit 24-stündiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 (48h + Tg 6:1) untersucht. Die IL-12-Transkriptmengen wurden jeweils auf die des konstitutiv exprimierten β -Actins normalisiert und die Regulation in nicht-infizierten bzw. *T.-gondii*-infizierten Zellen zwischen 0 und 48 Stunden berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der x-fachen Regulation der Transkriptmengen für IL-12. Signifikante Unterschiede der mRNA-Mengen wurden mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (*; $p < 0,05$).

3.4.1.2 IL-10

Nach *In-vitro*-Infektion von adhärennten PBMCs chronisch *Toxoplasma*-infizierter Spender reduzierte sich die Transkriptmenge für anti-inflammatorisches IL-10 um den Faktor 10 (von 2,0-fach \pm 0,4 in nicht-infizierten Kontrollzellen auf 0,2-fach \pm 0,1 in infizierten PBMCs; $p = 0,0094$; Abbildung 14). Auch in PBMCs seronegativer Blutspender reduzierte sich der IL-10-mRNA-Gehalt nach Infektion mit *T. gondii* im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen signifikant (1,5-fach \pm 0,5 in nicht-infizierten Zellen auf 0,2-fach \pm 0,1 nach Infektion; $p = 0,0365$; Abbildung 14). Die Monozyten-angereicherten PBMCs von chronisch-infizierten Blutspendern wiesen im Vergleich zu denen *Toxoplasma*-Naiver geringfügig höhere Ratios nach Inkubation der Zellen ohne Parasiten auf (Abbildung 14).

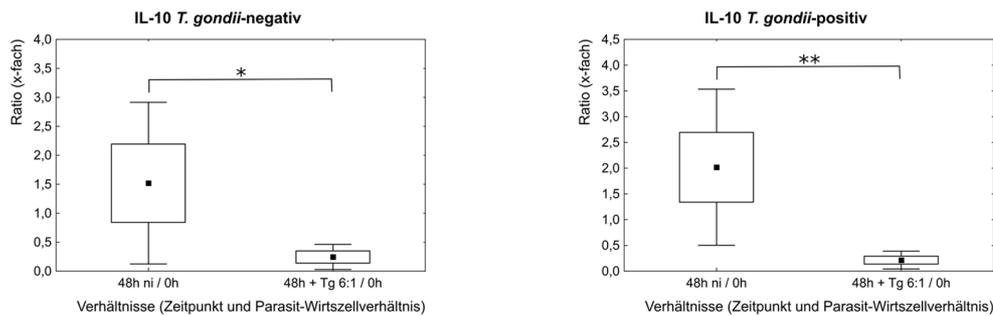


Abbildung 14: IL-10-Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs *T.-gondii*-positiver und -negativer Blutspender nach Infektion mit *T. gondii in vitro* und in nicht-infizierten Kontrollzellen

PBMCs von fünf seropositiven und fünf seronegativen Blutspendern wurden bezüglich ihrer Transkriptmenge für IL-10 mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Jeweils eine Probe wurde direkt nach Isolation (0h), eine nach 48-stündiger Inkubation ohne Infektion (48h ni) und eine nach 48-stündiger Inkubation mit 24-stündiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 (48h + Tg 6:1) untersucht. Die IL-10-Transkriptmengen wurden jeweils auf die des konstitutiv exprimierten β -Actins normalisiert und die Regulation in nicht-infizierten bzw. *T.-gondii*-infizierten Zellen zwischen 0 und 48 Stunden berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der x-fachen Regulation der Transkriptmengen für IL-10. Signifikante (*) ($p < 0,05$) bzw. hochsignifikante (**; $p < 0,01$) Unterschiede der mRNA-Mengen wurden mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt.

3.4.1.3 TNF- α

Die Transkriptmengen für TNF- α reduzierten sich während einer 48-stündigen Inkubation *in vitro* von adhären PBMCs Chronisch-Infizierter und *Toxoplasma*-Naiver auf das 0,34-fache $\pm 0,08$ bzw. auf das 0,29-fache $\pm 0,06$ der Mengen direkt nach Isolation. Die *In-vitro*-Infektion der Zellen beider Spendergruppen führte zu ähnlichen Reduktionen der TNF- α -mRNA-Mengen (Abbildung 15).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der RT-qPCR auf die pro-inflammatorische Wirkung einer *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* hin. Dies spiegelte sich in einer deutlich stärkeren Expression von IL-12 bei gleichzeitiger Inhibition der IL-10-Synthese wider. Der Serostatus der PBMC-Spender hatte dabei allenfalls einen geringen Einfluss, indem die Zellen positiver Spender geringfügig höhere Regulationen für IL-12 zeigten. Die TNF- α -Synthese wurde dagegen in PBMCs beider Spendergruppen durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* nicht deutlich beeinflusst.

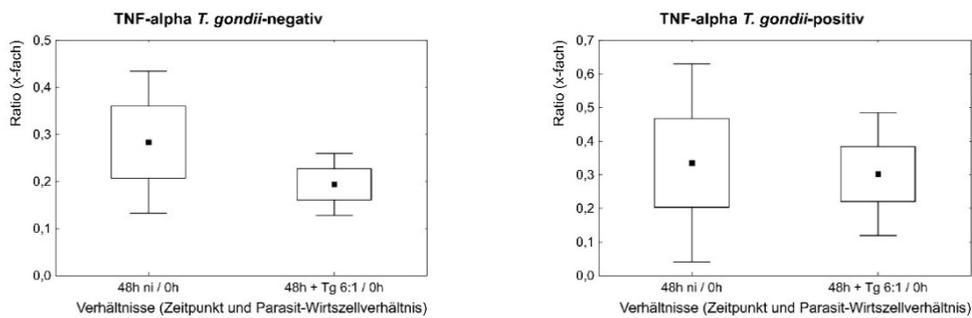


Abbildung 15: TNF- α -Transkriptmengen in Monozyten-angereicherten PBMCs *T. gondii*-positiver und -negativer Blutspender nach Infektion mit *T. gondii in vitro* und in nicht-infizierten Kontrollzellen

Adhärente PBMCs von fünf seropositiven und fünf seronegativen Blutspendern wurden bezüglich ihrer Transkriptmenge für TNF- α mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Jeweils eine Probe wurde direkt nach Isolation (0h), eine nach 48-stündiger Inkubation ohne Infektion (48h ni) und eine nach 48-stündiger Inkubation mit 24-stündiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 6:1 (48h + Tg 6:1) untersucht. Die TNF- α -Transkriptmengen wurden jeweils auf die des konstitutiv exprimierten β -Actins normalisiert und die Regulation in nicht-infizierten bzw. *T. gondii*-infizierten Zellen zwischen 0 und 48 Stunden berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert (schwarzes, kleines Quadrat), das 75%-Konfidenzintervall (Box) und das 95%-Konfidenzintervall (Whiskers) der x-fachen Regulation der Transkriptmengen für TNF- α .

3.4.2 Die Agarosegel-Elektrophorese bestätigt die korrekte Amplifikation der Genabschnitte von IL-12, IL-10 und TNF- α in der RT-qPCR

Um sicherzustellen, dass bei der quantitativen Real-Time PCR (3.4.1) die cDNAs der Zytokine IL-12, IL-10 und TNF- α korrekt amplifiziert worden waren, erfolgte im Anschluss eine Agarosegel-Elektrophorese (2.2.5.4). Dabei wurden die amplifizierten DNA-Stränge der Proben im Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel aufgetrennt und ihre Größe mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers in Basenpaare (bp) bestimmt. Da die Größe der zu erwartenden Amplifikate bekannt war, konnte so validiert werden, dass bei der RT-qPCR die korrekten Gene amplifiziert und analysiert wurden.

Die Länge der Genabschnitte betrug für IL-12 171 bp, für IL-10 188 bp, für TNF α 241 bp und für die Kontroll-cDNA β -Actin 266 bp (Abbildung 16). Damit konnte die Annahme, dass es sich bei den amplifizierten DNA-Strängen um die gewünschten Genabschnitte handelte, bestätigt werden.

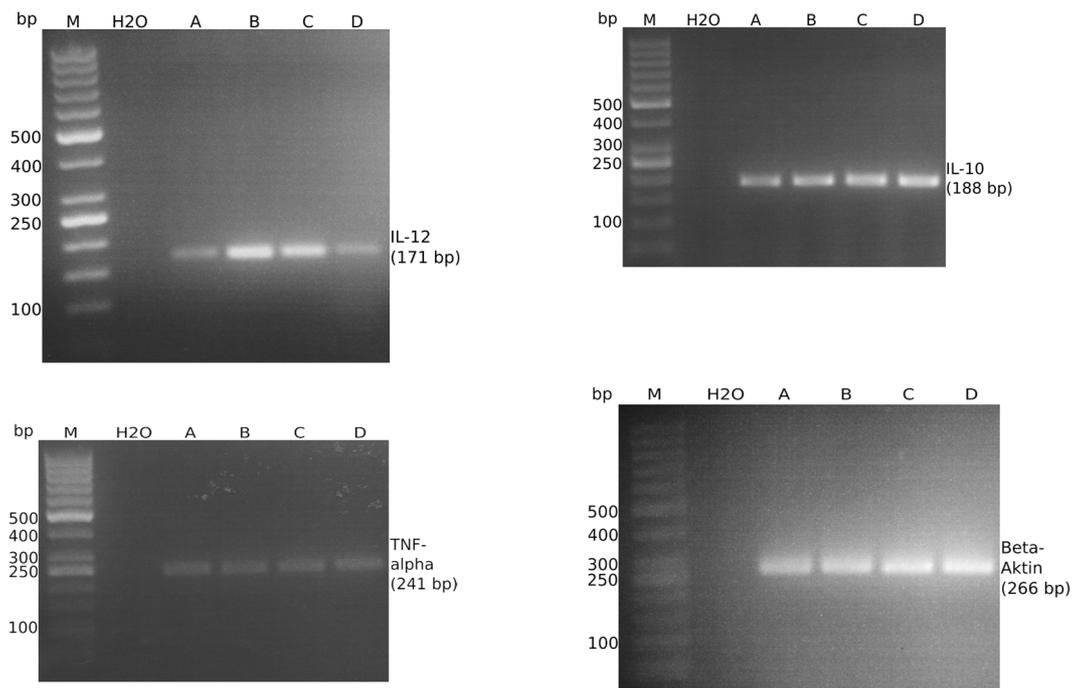


Abbildung 16: Agarosegel-Elektrophorese der Amplifikate spezifischer Sequenzabschnitte von IL-12, IL-10, TNF- α und β -Actin zur Bestätigung der korrekten Gen-Amplifikation bei der RT-qPCR

Reaktionsgemische nach quantitativer PCR von cDNAs ausgesuchter PBMC-Proben wurden mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels eines 50 bp Molekulargewichtsmarker (M) bezüglich ihrer korrekten Größe kontrolliert. Die Abbildung zeigt die unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden der Amplifikate. Als Negativkontrolle der qPCR-Reaktion wurde statt cDNA Wasser (H₂O) parallel mitgeführt. Die Proben A (48h ni, seronegativ), B (48h + Tg 6:1, seronegativ), C (0h, seropositiv) und D (48h ni, seropositiv) waren stichprobenartig ausgewählt.

4 Diskussion

Der intrazellulär lebende Parasit *Toxoplasma gondii* beeinflusst seine Wirte auf vielerlei Art und Weise. In Presse und Medien wird häufig von Veränderungen des Verhaltens chronisch-infizierter Menschen berichtet³. Besser dokumentiert und zum Teil intensiv erforscht sind die Auswirkungen einer Infektion auf Zellen des Immunsystems des Wirtes (Lang et al. 2006). Nach oraler Aufnahme von *T. gondii*-Gewebezysten oder -Oozysten mit darauffolgender Parasitämie wird die akute Toxoplasmose in der Regel durch eine starke inflammatorische Immunantwort des Wirtes beendet, jedoch persistieren wenige Parasiten dauerhaft in Form von Gewebezysten im infizierten Organismus (Rougier et al. 2017, 1.2.1). Immunevasionsmechanismen ermöglichen unter anderem diese Persistenz und führen gleichzeitig zu einer Reihe von möglicherweise längerfristigen Veränderungen der Immunantwort gegenüber anderen Infektionserregern (1.3.3). Veränderungen von Immunantworten, wie die Reduktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase in murinen Makrophagen (Lüder et al. 2003), deren „immunsupprimierende“ Auswirkung auch über die akute Infektion hinaus beobachtet werden konnte (Kankova et al. 2010) oder die Modulation der Wirtszell-Apoptose (Lüder und Gross 2005), die verhindert, dass infizierte Zellen effektiv vernichtet werden, sind zwei von vielen Mechanismen der Evasion.

Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit der IFN- γ -induzierten Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen auf humanen Monozyten in Abhängigkeit vom *T. gondii*-Serostatus und bei *In-vitro*-Infektion mit dem Parasiten. Der Autor beschrieb eine Reduktion beider Molekül-Klassen bei *In-vitro*-Infektion und, dass serologisch *Toxoplasma*-positive, chronisch-infizierte Personen mehr HLA-DR als serologisch negative Spender auf Monozyten exprimierten. Er führte dies auf eine Beeinflussung des Monozyten-Subtypenpools während chronischer Toxoplasmose zurück (Stalling 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese weiterverfolgt. Humane Monozyten wurden sowohl in Abhängigkeit vom *Toxoplasma*-Serostatus des Spenders als auch nach *In-vitro*-Infektion bezüglich ihrer Subtypen-Zugehörigkeit analysiert, und die Expression pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine von PBMCs wurde quantitativ untersucht. Ich kam dabei zu dem Ergebnis, dass serologisch *Toxoplasma*-positiv getestete im Vergleich zu

³ http://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/psychologie/persoenlichkeit/staendig-wuetend-vielleicht-leiden-sie-an-toxoplasmose_id_5397224.html; Zugriff am 29.11.16)

negativ getesteten Spendern *ex vivo* hochsignifikant weniger CD16 exprimieren und gleichzeitig eine Verminderung der Oberflächenantigene CD14, CD62L, CCR2 und HLA-A,B,C auf Monozyten aufwiesen. Diese verminderten Expressionen beeinflussten jedoch nicht die prozentuale Zusammensetzung der klassischen Monozytensubtypen, jedoch sank der Anteil CD62L-positiver, und es stieg der Anteil CD64-positiver Monozyten in chronisch-infizierten Toxoplasmose-Patienten signifikant. Nach *In-vitro*-Infektionen humaner PBMCs mit *T. gondii* zeigte sich eine Zunahme „klassischer Monozyten“ (CD14⁺CD16⁻), während sich der Anteil „intermediärer“ (CD14⁺CD16⁺) und „nicht-klassischer Monozyten“ (CD16⁺CD14^{dim}) deutlich reduzierte. Gleichzeitig wurden die Expressionen der zur Einteilung der Monozyten benutzten Antigene CD14 und CD16 durch die *In-vitro*-Infektion stark inhibiert. Als Zeichen gesteigerter Inflammation war in *in-vitro*-infizierten PBMCs die Transkription von IL-12 erhöht und die von IL-10 erniedrigt. Die Expression von CCR2, einem Chemotaxis-Rezeptor, wurde durch die *In-vitro*-Infektion beinahe vollständig verhindert. Weiterhin ist die in dieser Arbeit erhobene *T. gondii*-Seroprävalenz deutlich niedriger als die im Bundesdurchschnitt (Wilking et al. 2016), was im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll.

4.1 Die *T. gondii*-Seroprävalenz von 24% beruht auf den größtenteils jungen Blutspendern der Universitätsmedizin Göttingen

Vor weiterführenden Analysen wurden alle hier untersuchten Buffy Coats von Blutspendern der Universitätsmedizin Göttingen bezüglich ihres *T. gondii*-Serostatus untersucht (3.1). Fünf von 21 Buffy Coats stammten von chronisch-infizierten Spendern, was einer Kollektivprävalenz von 23,8% entspricht. Dies liegt deutlich unter dem im Jahr 2016 erhobenen Bundesdurchschnitt von beinahe 50%. Schaut man sich in der gleichen Studie jedoch an, in welcher Altersgruppe eine Prävalenz von ca. 24% auftrat, so kommt man bei Männern auf 28 und bei Frauen auf 30 Jahre. Gleichzeitig stieg die Prävalenz kontinuierlich mit dem Alter der untersuchten Personen an (Wilking et al. 2016). Somit könnte die unterdurchschnittliche Prävalenz der Spender der hier vorliegenden Arbeit in einem jungen Alter der Blutspender und -spenderinnen begründet sein. Weiterhin hat wahrscheinlich ein größerer Teil der Spenderinnen und Spender einen akademischen Bildungshintergrund und deshalb einen eher höheren sozioökonomischen Status. Hoher sozioökonomischer Status ist ebenfalls mit einer verminderten Seroprävalenz verbunden (Gross 2004; Wilking et al. 2016). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die hier ermittelte Prävalenz auf die relativ geringe Stichprobengröße zurückzuführen ist und damit nicht repräsentativ ist. Statistische Auswertungen der Spendenden durch die Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen weisen jedoch darauf hin, dass ein geringes Durchschnittsalter für den Wert verantwortlich ist. Im Jahr 2013 wurde Vollblut von 7611 verschiedenen Personen gespendet. Davon entfielen ca. 57% auf die

Altersgruppe unter 35 Jahre und ganze 30,6% auf die unter 25 Jahre. Da also fast jeder dritte Buffy Coat von einer Person unter 25 Jahren und mehr als jeder zweite von einer Person unter 35 Jahren stammte, kann die vergleichsweise niedrige *T. gondii*-Seroprävalenz zum Teil damit erklärt werden. Um einen statistischen Fehler gänzlich ausschließen zu können, hätte man jedoch deutlich mehr Proben bezüglich ihres Serostatus untersuchen müssen.

4.2 Eine chronische *T. gondii*-Infektion führt zu einer hochsignifikanten Expressionsminderung von CD16 ohne damit die Zusammensetzung des Monozyten-Subtypenpools zu ändern

Die Monozyten von *Toxoplasma*-seropositiven wiesen im Vergleich zu denen *Toxoplasma*-naiver Individuen eine veränderte Zusammensetzung ihrer Oberflächenantigene auf. Insbesondere die Expression von CD16 war hochsignifikant reduziert, was vor allem die kleineren Populationen, also die CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten beeinflussen sollte. Zwar änderte sich die Zusammensetzung der Monozytensubtypen nicht, die Modulation bestimmter Funktionen der CD16-positiven Monozyten ist jedoch dennoch möglich.

Es ist bemerkenswert, dass eine latente Infektion, mit wenigen Gewebszysten in Muskulatur und Gehirn bzw. eine abgelaufene akute Infektion mit *T. gondii* so deutliche Auswirkungen auf mehrere Oberflächenantigene humaner Monozyten des peripheren Blutes nehmen kann. So waren neben der hochsignifikanten Reduktion von CD16 auch CD14, CD62L, CCR2 und HLA-A,B,C in der Expression reduziert. Eine mögliche Erklärung für diese Inhibitionen ist, dass eine andauernde Aus- bzw. Nachwirkung der zurückliegenden akuten Toxoplasmose die Expression von Antigenen verändert. Alternativ könnten *T. gondii*-Gewebszysten in Gehirn und Muskeln die Expression dieser Antigene auf Monozyten durch konstante Signale inhibieren. Dies soll nun im Folgenden diskutiert werden.

Auswirkungen chronischer Infektionen auf Zellen des Immunsystems sind bei verschiedenen Erregern beschrieben und erforscht. So führt eine latente Infektion mit Stämmen des humanen Cytomegalievirus (HCMV) dazu, dass infizierte, monozytäre Vorläuferzellen vermehrt das Zytokin *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) bilden und sezernieren. MCP-1 steht im Verdacht arteriosklerotische Prozesse zu begünstigen und somit könnte eine latente HCMV-Infektion dies ebenfalls begünstigen (Stern und Slobedman 2008). Ein wichtiger Unterschied zwischen den Ergebnissen von Stern und Slobedman und denen dieser Arbeit ist jedoch, dass die monozytären Vorläuferzellen selbst latent HCMV-infiziert waren und nicht Erreger aus bestimmten Regionen des Körpers

periphere Monozyten beeinflussen, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall sein könnte. Neuere Arbeiten zur Funktion von Alveolar-Makrophagen bei HIV1-Patienten konnten ebenfalls Effekte einer direkten Zellinfektion, aber auch eine generalisierte Beeinflussung der nicht-infizierten Alveolar-Makrophagen zeigen. Die Autoren vermuten, dass diese nicht-infizierten Zellen durch höhere IFN- γ -Level im Lungengewebe HIV-positiver Patienten aktiviert und dadurch proteolytisch weniger aktiv werden (Jambo et al. 2014). In ähnlicher Weise kann auch *T. gondii* die HLA-DR,DP,DQ-Expression von nicht-infizierten Monozyten über benachbarte infizierte Zellen *in vitro* beeinflussen, wie eine Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigte. Verschiedene parasitäre Proteine, die an die Umgebung abgegeben werden, könnten für solche „Bystander-Effekte“ verantwortlich sein und sind Teil intensiver Forschung (Stalling 2013). Jedoch lässt sich aus einer Beeinflussung der Zellen in der Umgebung von *T.gondii*-positiven Zellen nicht schlussfolgern, dass diese Proteine ebenfalls in der Lage sind, Eigenschaften entfernter Zellen des peripheren Blutes zu modulieren. Einen konkreteren Hinweis liefert eine Publikation zu sog. Exosomen, die bei der interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle spielen und auch von *T. gondii* an den Wirtsorganismus abgegeben werden. Exosomen enthalten eine Vielzahl an Proteinen und im Falle von *T.gondii*-Exosomen unter anderem parasitäre Proteine wie Dichte Granula-Proteine (GRA), die neben den Rhoptrien (ROP) die Hauptquelle von Effektorproteinen des Parasiten sind (Dlugonska und Gatkowska 2016). Da diese „verpackten“ Proteine ebenfalls vom Infektionsherd entferntere Zellen erreichen und das Immunsystem beeinflussen können (Li et al. 2006), sind parasitäre Exosomen eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen von peripheren humanen Monozyten. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Exosomen auch während einer latenten Infektion durch Gewebssystem-haltige Zellen sezerniert werden. Weiterführende Studien zu parasitären Exosomen während einer chronischen Infektion mit *T. gondii* könnten Hinweise liefern, wie der Parasit das Immunsystem chronisch-infizierter Wirte moduliert.

4.2.1 CD16-abhängige Abwehrmechanismen könnten durch eine chronische Infektion mit *T. gondii* eingeschränkt werden

CD16 ist ein niedrigaffiner Fc-Rezeptor für IgG (Fc γ RIII). Er wird unter anderem für die *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC, Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität) und die *antibody-dependent cellular phagocytosis* (ADCP, Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose) von Monozyten benötigt, durch die unter anderem Tumorzellen abgetötet werden können (Herter et al. 2014; Li et al. 2016). Eine mögliche Folge der verminderten CD16-Expression wäre demnach, dass während chronischer Toxoplasmose Tumorzellen weniger effektiv ADCC- und/oder ADCP-abhängig zerstört werden können als dies bei seronegativen Personen möglich ist. Zum einen könnte dies die Wahrscheinlichkeit an einer Tumorerkrankung zu erkranken erhöhen, da semimaligne Zellpopulationen nicht frühzeitig ausreichend effektiv zerstört werden, um weitere

Entartung und invasives Wachstum zu stoppen. Zum anderen könnte auch die Therapie bestimmter Krebserkrankungen erschwert werden. So beruht die Behandlung einiger B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome unter anderem auf der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (Hiddemann et al. 2005). Einschränkend muss zu diesen Überlegungen jedoch festgestellt werden, dass es nach aktueller Studienlage allenfalls vereinzelt Hinweise auf eine Assoziation von Malignomen und chronischer Toxoplasmose gibt. So entdeckten australische Forscher eine zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte *T. gondii*-Prävalenz bei Meningeom-Patienten (Ryan et al. 1993). Für konkretere Hinweise müssten jedoch weitere klinische und experimentelle Studien zur Assoziation von Tumorerkrankungen und zum Stellenwert von CD16 auf Monozyten bei diesen Erkrankungen in Abhängigkeit vom *T. gondii*-Serostatus durchgeführt werden.

4.2.2 Verändert die Reduktion von CD16 bei einer chronischen Infektion mit *T. gondii* das Auftreten von Autoimmunerkrankungen?

Andere Studien beschäftigten sich mit CD16-assoziierten Autoimmunerkrankungen und beschreiben FcγRIII als ein mögliches Ziel für neue Therapeutika. Zwei dieser Erkrankungen sind die autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) und die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), für dessen Therapie bereits ein humanisierter anti-CD16-Antikörper tierexperimentell erprobt wurde (Clarkson et al. 1986; Meyer et al. 1998; Flaherty et al. 2012). Die hochsignifikant niedrigere Expression von CD16 auf humanen Monozyten *T. gondii*-seropositiver Blutspender könnte somit auch zu einem individuellen Überlebensvorteil werden, da möglicherweise die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer solchen Autoimmunerkrankung reduziert ist. Es gilt jedoch zu bedenken, dass auch andere Zellen neben CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten CD16 exprimieren, deren Expressionsverhalten in Bezug auf eine chronische Infektion mit *T. gondii* in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Ebenso ist dies zurzeit eine eher theoretische Überlegung, denn Hinweise auf eine negative Assoziation zwischen CD16-assoziierten Autoimmunerkrankungen und einer latenten Infektion mit *T. gondii* gibt es nach aktueller Studienlage nicht. Es gibt zwar eine ganze Reihe von Autoimmunerkrankungen, die mit anti-*Toxoplasma*-Antikörpern vom Typ IgG einhergehen, jedoch gehören die CD16-assoziierten nicht dazu. Weiterhin führt die chronische Infektion mit *T. gondii* zu einem erhöhten Auftreten dieser Autoimmunerkrankungen, über einen Schutz wird nicht berichtet (Shapira et al. 2012). Auch hier müssten klinische Studien zur Prävalenz von CD16-assoziierten Autoimmunerkrankungen in Abhängigkeit vom *T. gondii*-Serostatus durchgeführt werden, um einen Hinweis auf einen protektiven Effekt einer chronischen Infektion zu erhalten.

4.3 Eine chronische *T.-gondii*-Infektion reduziert den Anteil CD62L-positiver und erhöht den Anteil CD64-positiver Monozyten

Neben den zur Einteilung der Monozyten genutzten Antigenen CD14 und CD16 stehen auch andere Oberflächenmarker zur Verfügung, die verstärkt von bestimmten Subpopulationen exprimiert werden. Mit ihnen kann eine weitere Differenzierung von Monozyten innerhalb der drei klassischen Subpopulationen erfolgen. Da eine chronische Infektion mit *T. gondii* keine Auswirkungen auf die prozentuale Verteilung von CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten zeigte, sollen im Folgenden die prozentualen Veränderungen von CD62L- und CD64-positiven Monozyten in Abhängigkeit vom *T. gondii*-Serostatus diskutiert werden.

In dieser Arbeit zeigten sich bezüglich der Anteile von CD62L- und CD64-positiver Monozyten bei *T.-gondii*-seropositiver Spender widersprüchliche Expressionsmuster. So wiesen diese Blutspender signifikant weniger CD62L- und gleichzeitig signifikant mehr CD64-positiv Monozyten auf, zusätzlich war auch die Expression von CD62L reduziert (3.2). Beide Antigene sind in der Literatur generell als Marker für „klassische Monozyten“ bekannt (Chimma et al. 2009), jedoch wird in neuen Publikationen betont, dass auf Monozyten CD62L exklusiv von „klassischen Monozyten“ exprimiert wird, wohingegen CD64 auch von „intermediäre Monozyten“ exprimiert werden kann (Wong et al. 2012). Bei bestimmten chronischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, ist die Expression von CD64 sogar in allen drei Monozytensubpopulationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht (Rossol et al. 2012). Dementsprechend ist CD64 kein eindeutiger Marker für „klassische Monozyten“. Somit könnten die hier genannten Ergebnisse auf einen erhöhten Anteil der „intermediären“ und / oder der „nicht-klassischen Monozyten“ zu Lasten der „klassischen (CD62L-positiven) Monozyten“ bei chronischer *T.-gondii*-Infektion hindeuten. Die wichtigste Aufgabe der „klassischen Monozyten“ ist die Phagozytose von Antikörper-markierten Partikeln und Detritus. Daneben sind sie auch an der Wundheilung und der Gerinnung beteiligt (Wong et al. 2012). Schrumpft diese Population stark, könnte sich dies auf den kompletten Organismus auswirken und so zum Beispiel Wundheilungsstörungen älterer Patienten verstärken (Guo und DiPietro 2010). Allerdings wurden in dieser Arbeit zwar signifikante, aber dennoch lediglich geringe Schwankungen zwischen seropositiven und -negativen Spendern festgestellt, wie sie regelhaft auch bei anderen chronischen Infektionen auftreten können (Nockher und Scherberich 1998; Fernandes et al. 2014). Ein erhöhtes Risiko für Wundheilungsstörungen aufgrund der möglichen Abnahme CD62L-positiver „klassischer“ Monozyten während chronischer Toxoplasmose scheint daher eher unwahrscheinlich. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Übergänge zwischen den drei Subpopulationen fließend sind und sich somit ein Teil der analysierten Zellen „zwischen“ den Subtypen der üblichen Einteilung befinden könnte. Diese phänotypische Plastizität ermöglicht eine Anpassung der

Monozyten an die Aufgaben, die ihr aktuelles Milieu an sie stellt, wie z. B. Wundheilung oder Inflammation (Mosser und Edwards 2008).

Die oben genannte Schlussfolgerung deckt sich jedoch mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe, in der eine Anteilserhöhung der „intermediären Monozyten“ bei chronischer Toxoplasmose vermutet wurde. Dies wurde mit einer deutlich erhöhten Expression von HLA-DR begründet, das von CD14⁺CD16⁺ Monozyten besonders stark exprimiert wird (Stalling 2013). Weniger CD62L-positive und mehr CD64-positive Monozyten würden diese These stützen: Dies ist jedoch allenfalls ein diskreter Hinweis auf eine Expansion der „intermediären Monozyten“, da die durchflusszytometrischen Untersuchungen auf CD14 und CD16 diesbezüglich keine Veränderungen der Monozytensubpopulationen zeigen.

Zusammenfassend betrachtet ist es bemerkenswert, dass im Stadium der chronischen Toxoplasmose die Infektion deutlichen Einfluss auf die Expression von Oberflächenantigenen peripherer humaner Monozyten hat. Ob es sich dabei um eine Nachwirkung der akuten Infektion oder den Effekt von *T.gondii*-Gewebssystemen handelt, müssen weiterführende Arbeiten klären. Es bestünde jedoch die Möglichkeit, dass der Parasit das Wirtsimmunsystem über Exosomen beeinflusst. Die hochsignifikante Reduktion von CD16 bei *T.gondii*-seropositiven Personen könnte Mechanismen der Tumorabwehr durch Monozyten einschränken. Ob sich eine solche Einschränkung der ADCC und der ADCP *in vivo* auf die effektive Bekämpfung entarteter Zellen und damit auf die Wahrscheinlichkeit, an einer Krebserkrankung zu erkranken, widerspiegelt, muss jedoch durch zukünftige Studien statistisch und experimentell nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die möglicherweise erniedrigte Wirksamkeit einer zum Teil ADCC/ADCP-basierten Malignom-Therapie oder für die erniedrigte Anfälligkeit gegenüber CD16-assoziierten Autoimmunerkrankungen. Weiterhin geben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse Hinweise, dass sich der Pool „intermediärer Monozyten“ zu Lasten der „klassischen Monozyten“ in chronisch-infizierten Toxoplasmose-Patienten vergrößert. Indirekt geben die signifikanten Veränderungen der für die Oberflächenantigene CD62L und CD64 positiven Monozyten einen Hinweis auf diese Umverteilung. Jedoch konnte dies nicht mit Hilfe der zur klassischen Einteilung benutzten Antigene CD14 und CD16 nachvollzogen werden.

4.4 Eine chronische Toxoplasmose führt zu vermehrter IL-12-mRNA

Neben der Analyse von Oberflächenantigenen auf Monozyten wurden auch die Transkriptmengen der Zytokine IL-10, IL-12 und TNF- α in PBMCs in Abhängigkeit von einer chronischen Infektion mit *T. gondii* bestimmt. Die Ergebnisse zeigten insbesondere,

dass Monozyten-angereicherte PBMCs Chronisch-Infizierter vor und nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* durchschnittlich 1,5-fach höhere IL-12-mRNA-Mengen als PBMCs von Spendern in der Kontrollgruppe hatten. Gleichzeitig hatte die latente Infektion keinen Einfluss auf die IL-10- oder die TNF- α -mRNA-Menge. Bei IL-12 ist sowohl die mRNA-Menge *ex vivo* als auch die nach einer inflammatorischen Reaktion auf *In-vitro*-Infektion mit Toxoplasmen bei seropositiven Individuen höher. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-12 wird u.a. von Makrophagen und dendritischen Zellen nach Erregerkontakt sezerniert und induziert die Produktion von IFN- γ durch T- und NK-Zellen, erhöht deren zytotoxische Aktivität und beeinflusst die T-Zell-Differenzierung (Wolf et al. 1994). Eine mögliche Folge dieser erhöhten IL-12-Level ist eine generell erhöhte Inflammationsbereitschaft chronisch *Toxoplasma*-Infizierter, die Auswirkungen auf die Reaktion gegen Infektionserreger, aber auch auf den Organismus selbst haben könnte. So könnte bei erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegeln eine Immunantwort auf eine Infektion schneller und heftiger ausgelöst werden und somit die Eradikation von Erregern effektiver sein. Dass erhöhte IL-12-Spiegel bei Infektion von Vorteil sein können, zeigten Studien mit verschiedenen Infektionserregern und exogenem IL-12 als Therapeutikum (Hamza et al. 2010). So hatten Mäuse durch exogenes IL-12 eine gesteigerte Resistenz gegenüber einer Infektion mit dem Herpes simplex Typ 1-Virus (Matsuo et al. 1996) und eine IL-12-Applikation führte zu einer gesteigerten Überlebensrate von Mäusen bei Tuberkulose (Flynn et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die chronische *T. gondii*-Infektion bei Mäusen zu einer verstärkten Rekrutierung von pro-inflammatorischen Monozyten über die Stimulation des Toll-like-Rezeptors TLR11 durch den Parasiten führt und damit die Abwehrlage gegenüber einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* verbessert wird (Neal und Knoll 2014).

Möglich wäre somit, dass auch endogen erhöhte IL-12-Spiegel beim Menschen, wie z. B. die von *T. gondii*-seropositiven Individuen, diese Vorteile mit sich bringen könnten. Ob eine leichte, wie in dieser Arbeit beschriebene Erhöhung ausreicht, um signifikante Immuneffekte nachzuweisen, müssen weitere Studien zu Infektionserkrankungen bei seropositiven Probanden zeigen.

Die verstärkte IL-12-mRNA-Bildung bei Chronisch-Infizierten könnte jedoch auch mit einem Nachteil für den Organismus verbunden sein. Geht man von einer permanenten geringfügigen Aktivierung des Immunsystems durch konstant mehr IL-12 aus, könnte dies auf Dauer zu Schäden durch die chronische Inflammation führen. So eine chronische Entzündung bei chronischer Infektion ist in neueren Studien bei längerfristig antiretroviral-behandelten HIV-Patienten beschrieben worden, bei denen insbesondere ein vorzeitiges Altern bei persistierend hohen pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegeln beobachtet wurde. Kardiovaskuläre und andere Erkrankungen, die normalerweise eher ältere Menschen betreffen, führten die Autoren bei den vergleichsweise jungen Patienten auf diese „Inflammations-induzierte, vorzeitige Alterung“ zurück (Nasi et al. 2016).

Kontakt mit IL-12 leitet bei naiven T-Zellen eine Differenzierung zu T-Helferzellen vom Th1-Typ ein und fördert damit die Zell-vermittelte Immunantwort (Wolf et al. 1994). Th1-Zellen sind insbesondere an der Abwehr intrazellulärer Erreger beteiligt und führen zu einer Steigerung der mikrobiellen Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen (Zhu und Paul 2008). Eine Überfunktion der Th1-Zellen kann jedoch auch zu unerwünschten Immunreaktionen führen, wie z. B. der Hypersensibilitätsreaktion vom Spättyp (Typ 4 Allergie) oder der Psoriasis (Biedermann et al. 2004). Untersuchungen bezüglich des Auftretens von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit *T.gondii*-spezifischen Antikörpern zeigten bereits Hinweise auf eine Verbindung zwischen chronischer Toxoplasmose und z. B. rheumatoider Arthritis, jedoch wurde dies nicht auf zellulärer Ebene weiterverfolgt (Shapira et al. 2012; Fischer et al. 2013). Ob ein Zusammenhang zwischen unerwünschten Immunerkrankungen und erhöhten IL-12-mRNA-Mengen bei seropositiven Individuen besteht und ob die T-Zell-Differenzierung dabei eine Rolle spielt, bleibt daher zurzeit spekulativ. Untersuchungen, die in Abhängigkeit vom *T.gondii*-Serostatus die Th1-Zellzahl und -Aktivität sowie die Ausbildung unerwünschter Immunreaktionen bestimmen, könnten diese These untermauern. Ähnliches wurde in einer Studie aus dem Jahr 2016 bei akuter Toxoplasmose gemacht. Dabei konnten die Autoren eine persistierend erniedrigte Zahl naiver CD4-positiver T-Zellen bei gleichzeitig vorübergehend mehr aktivierten Th1-Zellen feststellen. Diese Verschiebung führte zu längerfristigen Veränderungen des Immunsystems und begünstigte die Persistenz des Parasiten (Kugler et al. 2016). Ob dieser Effekt, wie die chronische *T.gondii*-Infektion selbst, andauert und ob neben einer Schwächung des Immunsystems auch andere unerwünschte Immunphänomene auftreten können, müssten weitere Studien zeigen.

Fasst man zusammen, so könnten erhöhte IL-12-Spiegel bei *T.gondii*-seropositiven Menschen durch die gesteigerte „Alarmbereitschaft“ des Immunsystems zu einer effizienteren Vernichtung von Erregern führen, aber auch gleichzeitig zu einer vorzeitigen Alterung mit entsprechend Alters-assozierten Erkrankungen führen. Da IL-12 die T-Zell-Differenzierung beeinflusst, könnten Th1-Zellen auch das Auftreten von Autoimmunerkrankungen fördern. Ob die hier beschriebene verstärkte Expression von IL-12 bei chronisch-infizierten *T.gondii*-Patienten für diese Folgen ausreicht, müssen zusätzliche Studien klären.

4.5 ***In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* verändert die Expression von Oberflächenantigenen auf humanen Monozyten drastisch und führt zu veränderten Monozytensubpopulationen**

Aus Buffy Coats von Blutspendern isolierte Monozyten-angereicherte PBMCs wurden nicht nur direkt *ex vivo* durchflusszytometrisch analysiert, sondern auch *in vitro* in den Parasit-Wirtszellverhältnissen 3:1 und 6:1 mit *Toxoplasma gondii* für 24 Stunden infiziert. Dadurch sollte der Effekt einer direkten Infektion mit *T. gondii* auf die Monozyten chronisch-infizierter Toxoplasmose-Patienten bzw. seronegativer Kontrollen untersucht werden. Eine weitere Probe verblieb für diese Zeit nicht-infiziert. Analog zu den *Ex-vivo*-Analysen wurden auch hier anschließend die Expression der Oberflächenantigene CD14, CD16, CD62L, CD64, CCR2, HLA-A,B,C sowie HLA-DR,DP,DQ durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde die Fluoreszenz-Intensität der Antigene der Monozyten und der Anteil der für ein Antigen positiven Monozyten ermittelt. In der Auswertung wurde zwischen seropositiven und -negativen Proben unterschieden, jedoch waren die Ergebnisse zwischen diesen beiden Gruppen meist ähnlich (3.3).

Bei der Auswertung fiel auf, dass nicht nur eine *In-vitro*-Infektion, sondern auch die *In-vitro*-Inkubation in Abwesenheit von *T. gondii* humane Monozyten in der Oberflächenexpression stark beeinflusste. So wurde die Expression der Antigene CD14, CD16, HLA-A,B,C und HLA-DR,DP,DQ durch Inkubation zum Teil hochsignifikant hochreguliert, die von CD64 und CCR2 wurde runterreguliert. Dabei war die Expression von CD14 und HLA-DR,DP,DQ nach Inkubation ohne Parasiten bei seropositiven Spendern im Vergleich zu Kontrollgruppe niedriger, auf CD16 und HLA-A,B,C hatte der Serostatus dabei keinen Einfluss. In Bezug auf die Monozytensubpopulationen führte die Inkubation in Medium zu einer hochsignifikanten Expansion der CD14⁺CD16⁺ Zellen zu Lasten der CD14⁺CD16⁻ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten. Ebenso nahm nach *In-vitro*-Inkubation der Anteil CD64-positiver Monozyten hochsignifikant ab und der Anteil CCR2-positiver Monozyten nahm signifikant ab. Dies könnte auf die Dauer der Inkubation von 48 Stunden oder auf das verwendete PBMC-Medium (2.1.2.1) zurückzuführen sein. Andere Studien zur Kultivierung humaner Monozyten zeigten jedoch, dass selbst bei Kultivierung von mehr als sieben Tagen und der Nutzung von Medium mit 10% FCS, so wie es hier ebenfalls verwendet wurde, weder starke Veränderungen in Bezug auf die Expression von CD14 noch eine erhöhte Differenzierung zu Makrophagen nachzuweisen waren. Jedoch wurden die Zellen in dieser Studie nicht durchflusszytometrisch, sondern immunhistochemisch und per Western Blot untersucht, sodass die Ergebnisse mit denen dieser Arbeit nicht direkt vergleichbar sind (Safi et al. 2016). Ebenso könnte die Plastikoberfläche der Zellkulturschalen, an der die Zellen adhärten, bestimmte Veränderungen der Oberflächenantigenexpression hervorrufen. So zeigte eine Studie aus dem Jahr 2005, dass Monozyten nach Stimulation und Differenzierung zu dendritischen Zellen deutlich mehr

Zytokine produzieren, wenn sie durch Adhärenz und nicht durch *magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert wurden (Elkord et al. 2005). Dies gibt einen Hinweis, dass die Oberfläche oder die Adhärenz an sich einen Stimulus für die Monozyten darstellt und somit auch zu Expressionsänderungen der Oberflächenantigene führen könnte. Auf jeden Fall zeigen diese Ergebnisse, dass *In-vitro*-Kultivierung von primären Monozyten die Oberflächenexpression verschiedener Markerproteine gegenüber der direkt *ex vivo* gemessenen Expression sehr deutlich verändert.

Die starken Veränderungen der Antigenexpression auf humanen Monozyten durch *In-vitro*-Inkubation in Medium wurden deutlich, zum Teil sogar hochsignifikant durch Infektion mit dem Parasiten aufgehoben oder verstärkt. So wurde die Fluoreszenz-Intensität von CD14, CD16 und CCR2 durch eine *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* teils stark inhibiert, die von CD64 wurde induziert. Bei der prozentualen Verteilung der Subtypen führte sie trotz der geringeren Expression von CD14 interessanterweise zu einem hochsignifikanten Anstieg der „klassischen Monozyten“ (CD14⁺CD16⁻) zu Lasten der beiden anderen Subpopulationen. Ebenso war nach *In-vitro*-Infektion die Expression von CD14 und CD16 bei seropositiven Personen geringer als bei seronegativen. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der Monozytensubpopulationen, die Werte waren in beiden Serogruppen sehr ähnlich. CCR2-positive Monozyten waren nach Infektion in beiden Gruppen kaum noch zu finden.

Kontakt oder *In-vitro*-Infektion von PBMCs mit *T. gondii* dürfte eine inflammatorische Reaktion dieser Zellen auf den infektiösen Stimulus auslösen. Denkbar ist die Differenzierung bzw. Aktivierung ruhender Zellen oder eine pro-inflammatorisch veränderte Zytokinproduktion. Verschiebungen zwischen den Subtypen humaner Monozyten gehen *in vivo* mit Änderungen der Oberflächenantigenstruktur einher, die im Idealfall die monozytäre Immunantwort optimieren und anpassen (Yang et al. 2014). *In vitro* sollten unversehrte Monozyten analog reagieren (Hammerstrom 1979), sodass die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Reaktion im Menschen übertragen werden können. Zunächst sollen die in dieser Arbeit beobachteten mit den zu erwartenden Veränderungen verglichen und diskutiert werden.

Bemerkenswert ist die ausgeprägte Dominanz der CD14⁺CD16⁻ Monozyten nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* mit einem Anteil von über 90% der gesamten Monozyten. Nach Inkubation der Zellen in Medium, aber Abwesenheit von *T. gondii* lag ihr Anteil bei knapp 20%, sodass die Anwesenheit des Parasiten den Phänotyp der Monozyten hochsignifikant und Dosis-abhängig veränderte. Entsprechend nahmen die prozentualen Anteile der CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten im Vergleich zur Inkubationskontrolle nach Infektion stark ab. Gleichzeitig reduzierte die *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* jedoch die Expression von CD14, sodass im Endeffekt mehr „klassische Monozyten“ mit weniger starker Expression von CD14 vorhanden waren. Der Anteil CD14⁺CD16⁻ „klassischer Monozyten“ war nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* sogar größer als der Anteil *ex vivo* und

dem in der Literatur angegeben Wert von ca. 85% (Wong et al. 2012). Analog zu den Ergebnissen der *Ex-vivo*-Analysen (3.2) war auch nach *In-vitro*-Infektion die Expression von CD14 und CD16 bei chronisch-infizierten stärker gehemmt als bei seronegativen Personen, sodass auch bei erneuter Infektion mit dem Parasiten die Auswirkungen der erstmaligen Infektion festzustellen waren. Dies unterstreicht möglicherweise die nachhaltige Modulation, die *T. gondii* auf das Immunsystem des Wirtes ausübt, die bereits in 4.1. diskutiert wurde. Bei Infektionen mit anderen humanpathogenen Erregern ließen sich ebenfalls spezifische Veränderungen der Monozytensubtypen beobachten. So sind bei bakterieller Sepsis, Hautinfektionen mit *Leishmania braziliensis*, HIV-Infektionen und dem Erysipel erhöhte Anteile „nicht-klassischer Monozyten“ beschrieben worden, jedoch wurde in diesen Studien nur nach zwei Subtypen („klassische“ CD14⁺CD16⁻ vs. „nicht-klassische“ CD16⁺ Monozyten) unterschieden (Fingerle et al. 1993; Thieblemont et al. 1995; Horelt et al. 2002; Soares et al. 2006). In der nachträglichen Beurteilung und unter Berücksichtigung der heute weit verbreiteten Nomenklatur der humanen Monozyten mit drei Subtypen, war dies auf Expansionen der „intermediären“ und / oder der „nicht-klassischen Monozyten“ zurückzuführen. Diese Ergebnisse deuten auf die Expansion der Monozyten mit proinflammatorischer Funktion während akuter bakterieller oder intrazellulärer Infektion hin, um den Erreger möglichst effektiv bekämpfen zu können (Wong et al. 2012). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, bei denen eine Abnahme des Pools CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten durch *T.-gondii*-Anwesenheit beobachtet wurde. Ebenso sind die in der Literatur beschriebenen Hauptfunktionen der nach *In-vitro*-Infektion dominierenden „klassischen Monozyten“ eher die Phagozytose von Detritus, wie z. B. abgestorbene neutrophile Granulozyten und nicht primär die Infektionserreger-Abwehr (Chimma et al. 2009; Wong et al. 2012). Somit stellt sich die Frage, warum die *In-vitro*-Infektion mit Toxoplasmen zu gegensätzlichen Ergebnissen bezüglich der Monozyten-Polarisation im Vergleich zu anderen akuten Infektionen führt. Eine mögliche Erklärung könnten Immunevasionsmechanismen des Parasiten sein (Lang et al. 2006), um im Wirt persistierende Infektionen induzieren zu können.

In dieser Arbeit wurden bereits einige Immunevasionsmechanismen von *Toxoplasma gondii* beschrieben (1.3.3). So kann der Parasit die Wirtszell-Apoptose manipulieren (Lüder und Gross 2005; Hippe et al. 2009) und durch Reduktion von MHC-Molekülen der Klasse II die Antigenpräsentation an T-Lymphozyten hemmen (Lüder et al. 2001; Lüder und Seeber 2001). Eine solche Reduktion von HLA-DR,DP,DQ konnte in *In-vitro*-Versuchen für primäre und permanente humane Monozyten bestätigt werden (Stalling 2013). Da insbesondere „intermediäre Monozyten“ HLA-DR exprimieren (Wong et al. 2012), könnte dieser Effekt auch durch einen niedrigeren Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten erklärt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bei der ebenfalls durch *In-vitro*-Infektion verkleinerte Populationen „intermediärer“ und „nicht-klassischer Monozyten“ nachgewiesen wurden. Möglicherweise handelt es sich dabei also um einen Immunevasionsmechanismus, mit dessen Hilfe *T. gondii* die phänotypische Anpassung der

Monozyten beeinflusst, sodass weniger Zellen entstehen, die T-Zellen aktivieren oder Sauerstoffradikale produzieren können (Wong et al. 2012). Stattdessen dominieren die „klassischen Monozyten“, die in Bezug auf die Erregerabwehr weniger effektiv sind. Betrachtet man dazu die Verteilung nach alleiniger Inkubation der adhären PBMCs in Medium ohne Parasiten, wird die Stärke des Effekts durch *T. gondii* noch deutlicher. Eine solche Inkubation steigerte den Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten deutlich, was für eine Aktivierung der Zellen durch die Adhärenz an der Plastikoberfläche während der 48-stündigen Inkubation sprechen könnte (s.o.). Diesem Stimulus wurde durch die Infektion also zusätzlich entgegengewirkt. Dass auch andere intrazellulär-lebende Parasiten nach Befall von Zellen des Immunsystems diese in ihrer Reaktion beeinflussen, zeigen Studien zu *Leishmania chagasi*. Dabei wurde eine Inhibition von MHC-Molekülen der Klassen I und II und von CD11b (ein Oberflächenmolekül, das bei der LPS-induzierten IL-12-Sekretion eine Rolle spielt) auf humanen Monozyten durch eine Infektion dokumentiert, was von den Autoren als Immunevasion gedeutet wurde (Almeida et al. 2003). Neuere Studien sprechen sogar von einer zumindest partiellen „Hyporeaktivität“ von bereits infizierten Monozyten bei einer anschließenden erneuten Infektion mit Leishmanien (Ben-Othman et al. 2008).

Zusammenfassend konnten sowohl durch *In-vitro*-Inkubation als auch durch -Infektion für 24 Stunden mit *T. gondii* deutliche Veränderungen der Oberflächenantigenexpression von CD14 und CD16 auf humanen Monozyten beobachtet werden. Da bei den meisten Infektionserkrankungen der Anteil CD14⁺CD16⁺ und CD16⁺CD14^{dim} Monozyten erhöht wird, könnte die hier beobachtete Umverteilung der Subtypen von „intermediären“ und „nicht-klassischen“ hin zu mehr „klassischen Monozyten“ ein Immunevasionsmechanismus des Parasiten sein. Da durch diesen Mechanismus weniger für die Erregerabwehr spezifische Monozyten zur Verfügung stehen, wird die monozytäre Immunantwort auf die parasitäre Infektion möglicherweise abgeschwächt. Dies deckt sich mit Ergebnissen vorheriger Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bei denen nach *In-vitro*-Infektion weniger MHC-Moleküle der Klasse II dokumentiert wurden. Da insbesondere „intermediäre Monozyten“ das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR exprimieren, könnte deren verminderte Expression auf eine Reduktion dieser Population durch den Parasiten hinweisen. Gleichzeitig wurde auch der andauernde Einfluss einer chronischen Infektion deutlich, da bei erneuter Infektion mit dem Parasiten die Expression von CD14 und CD16 im Vergleich zu *T. gondii*-Naiven abgeschwächt wurde. *Ex vivo* wurden diese Antigene ebenfalls schwächer von humanen Monozyten Chronisch-Infizierter exprimiert. Im Folgenden sollen weitere Veränderungen der Monozyten durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* diskutiert werden.

4.6 Eine *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* hemmt die Expression von CCR2 auf humanen Monozyten

Neben den oben diskutierten Veränderungen von CD14 und CD16 veränderte die *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* die Expression von CCR2 am stärksten. Schon die Inkubation der Monozyten für 48 Stunden *in vitro* ohne Parasiten führte zu zum Teil deutlich weniger CCR2-positiven Monozyten. Die Infektion zeigte jedoch einen noch stärkeren inhibitorischen Einfluss auf die Anteile CCR2-positiver Monozyten. Sowohl bei *Toxoplasma*-infizierten als auch bei seronegativen Personen waren nach Infektion weniger als 5% der Monozyten positiv für CCR2, während nach Isolation über 80% CCR2-positiv waren. Weiterhin wurde auch in beiden Spendergruppen die Expression dieses Oberflächenmoleküls in Anwesenheit des Parasiten stark inhibiert. So sank zum Beispiel die CCR2-Fluoreszenzintensität bei seronegativen Spendern durch die *In-vitro*-Infektion annähernd um Faktor acht.

CCR2 ist ein Rezeptor für das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) auf der Oberfläche humaner Monozyten. Er wird typischerweise von „klassischen Monozyten“ exprimiert und spielt eine Rolle bei der Chemotaxis von Monozyten bei entzündlichen Prozessen (Han et al. 1999; Wong et al. 2012). Im vorherigen Abschnitt wurde die Expansion von „klassischen Monozyten“ nach *In-vitro*-Infektion diskutiert und als möglicher Immunevasionsmechanismus vorgestellt (4.5). Da auch CCR2 als Marker für CD14⁺CD16⁻ Monozyten gilt (Wong et al. 2012), wäre zu erwarten gewesen, dass dieser Rezeptor ebenfalls während der Infektion hochreguliert wird. Genau Gegenteiliges wurde jedoch in dieser Arbeit nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* nachgewiesen. Die starke Inhibition während der Infektion ist auf eine physiologische Reaktion der Monozyten zurückzuführen. Experimente dieser Arbeit mit *in-vitro*-infizierten PBMCs haben gezeigt, dass durch *T. gondii* insbesondere die mRNA-Menge von pro-inflammatorischem IL-12 hoch- und die von anti-inflammatorischem IL-10 runterreguliert wird (3.4.1). Studien aus dem Jahr 1997 zeigten, dass die Expression von CCR2 in Anwesenheit inflammatorischer Zytokine auf humanen Monozyten stark und schnell inhibiert wird. Die Autoren vermuteten, dass dadurch eine erneute Migration von einmal zu einem Entzündungsherd rekrutierten Monozyten zu anderen Entzündungsherden verhindert wird (Tangirala et al. 1997). Die starke Expression von IL-12 nach *In-vitro*-Infektion humaner Monozyten mit *T. gondii* ist daher wahrscheinlich der Grund für die niedrige Expression und den geringen Anteil CCR2-positiver Monozyten. Somit konnten nach Infektion zwar mehr CD14⁺CD16⁻ „klassische Monozyten“ detektiert werden, die jedoch kaum noch das für sie typische Antigen CCR2 exprimierten. Dies zeigt, dass die Einteilung von Monozyten in drei Subtypen nicht als starres Konzept gesehen werden darf, sondern dass Monozyten durchaus Zwischenformen annehmen können, um sich an das Umgebungsmilieu anzupassen (Mosser und Edwards 2008).

Eine weitere Möglichkeit für die Expressionshemmung von CCR2 könnte der Parasit selbst sein. So wäre eine eingeschränkte Chemotaxis-Funktion von Monozyten zu Beginn einer Infektion vermutlich ein Überlebensvorteil für *T. gondii*, mit dessen Hilfe eine frühe Immunantwort durch das angeborene Immunsystem abgeschwächt werden könnte. Die Folge wäre, dass sich der Parasit schnell stark vermehren kann. Dies hätte erhebliche Auswirkungen auf den Wirtsorganismus. So zeigen CCR2-Knock-out-Mäuse niedrigere IL-12-Spiegel bei einer Infektion mit *T. gondii* und sind nicht in der Lage, den Erreger zu kontrollieren. Dies führt zu einer erhöhten Mortalität und verdeutlicht den hohen Stellenwert dieses Rezeptors bei der Immunantwort gegen den Parasiten (Dunay et al. 2008; Serbina et al. 2008). Sollte die in dieser Arbeit beobachtete deutliche Runterregulation von CCR2 nach *In-vitro*-Infektion *in vivo* ebenso ausgeprägt sein, wäre dies auf den Lebenszyklus des Parasiten bezogen eher ein Nachteil, da seine unkontrollierte Vermehrung möglicherweise auch beim Menschen mit einer höheren Mortalität verbunden wäre. Zwar gibt der Mensch *T. gondii* praktisch nur diaplazentar weiter und ist selbst nicht die Beute von Felidae und somit für den Parasiten evolutionsbiologisch wenig relevant. Jedoch gilt generell, dass mit dem Tod des „Wirtsorganismus“ der Zyklus von *T. gondii* beendet und eine mögliche Weitergabe des Erregers damit ausgeschlossen ist. Deswegen ist eher zu vermuten, dass das pro-inflammatorische Milieu während der *In-vitro*-Infektion zu einer Zytokin-induzierten Expressionshemmung von CCR2 geführt hat und es sich dabei nicht um einen Immunevasionsmechanismus handelt.

4.7 Die Expression von HLA-DR,DP,DQ wird abhängig vom Serostatus der Spender durch *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* hoch- bzw. runterreguliert

Bei den durchflusszytometrischen Analysen wurden humane Monozyten auch auf Expression von HLA-DR,DP,DQ untersucht. Während die prozentuale Verteilung der für diese MHC-Klasse-II-positiven Monozyten wegen großer Variabilität von Spender zu Spender keine eindeutigen Schlüsse zuließ, veränderte sich deren Expressionsstärke zwischen den Serogruppen nach *In-vitro*-Infektion gegensätzlich. Während die *In-vitro*-Inkubation ohne Parasiten die Expression in beiden Gruppen deutlich induzierte, reagierten Monozyten seronegativer Spender auf die Infektion mit *T. gondii* mit einer dosisabhängigen Inhibition, die Monozyten latent-Infizierter hingegen mit einer dosisabhängigen Induktion der MHC-Klasse-II-Expression. Interessanterweise war die Expression auch bei MHC-Klasse-II-Molekülen bei seropositiven Personen insgesamt niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zunächst bestätigt dieses Ergebnis die Erkenntnis, dass eine chronische Infektion mit *T. gondii* Einfluss auf das Expressionsprofil humaner Monozyten und eventuell auf deren Reaktion auf einen Erregerstimulus nehmen kann. Demnach reagieren Monozyten bei *In-vitro*-Infektion mit dem Parasiten anders, wenn die Person, aus der sie stammen, bereits Kontakt zu Toxoplasmen hatte. Die Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen bei seropositiven Spendern könnte auf eine verbesserte Antigenpräsentation an CD4+-T-Lymphozyten und eine dadurch beschleunigte adaptive Immunantwort hindeuten (Reeves und James 2017), denn das Immunsystem unterlag und unterliegt dem Selektionsdruck, möglichst effizient und schnell eindringende Erreger zu bekämpfen.

Dagegen hemmte der Parasit in Monozyten seronegativer Spender die MHC-Klasse-II-Expression. Frühere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten diese Inhibition bereits zeigen, die in dem Fall sogar unabhängig vom Serostatus der untersuchten Personen waren. Dies galt jedoch nur für vorab mit IFN- γ -stimulierte Zellen. Der Autor sah darin einen Immunevasionsmechanismus von *T. gondii*, mit dessen Hilfe die Präsentation parasitärer Antigene und somit die Reaktion des erworbenen Immunsystems verzögert wird (Stalling 2013). Angelehnt war dies an Beobachtungen im Mausmodell, in dem eine Expressionsminderung von MHC-II-Molekülen durch *T.-gondii*-Infektion gezeigt wurde, was zu einer Präsentationshemmung an T-Lymphozyten durch die infizierten Monozyten führte (Lüder et al. 1998; Lüder et al. 2001). Somit steht die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von HLA-DR,DP,DQ in Monozyten seropositiver Spender den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten gegenüber. Der Grund für die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse ist möglicherweise die von Stalling durchgeführte Monozyten-Stimulation mit IFN- γ vor der *In-vitro*-Infektion, die in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgte. In der nicht-stimulierten Kontrollgruppe in Stallings Arbeit führte zumindest die Infektion im geringeren Parasit-Wirtszellverhältnis bei seropositiven Spendern zu einer leichten Induktion von HLA-DR,DP,DQ. Zumindest dieses Ergebnis stimmt mit dem der vorliegenden Arbeit überein.

Eine Möglichkeit ist, dass die Antigensuppression über parasitäre Botenstoffe gesteuert wird, auf die die Monozyten seropositiver Spender bei erneutem Kontakt nicht mehr so deutlich oder auch gar nicht reagieren wie die *Toxoplasma*-naiver Personen. Ein solcher Botenstoff, der den IFN- γ -abhängigen STAT1-Signalweg zumindest bei Mäusen inhibiert, ist TgIST (*T.-gondii*-Inhibitor des STAT1-Signalweges, Gay et al. 2016). Unter anderem führt die Aktivierung dieses Signalweges zu einer verstärkten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, die dementsprechend durch Anwesenheit von *T. gondii* reduziert wird (Debierre-Grockiego et al. 2009). Ein unterschiedlicher Einfluss parasitärer Effektorproteine auf die Wirtszellmodulation in Abhängigkeit von einem vorherigen Kontakt mit demselben Effektor ist bisher aber weder beschrieben noch mechanistisch plausibel. Weiterhin ist die Expression von HLA-DR,DP,DQ bei seropositiven Personen nach *In-vitro*-Inkubation und -Infektion deutlich niedriger als die von *Toxoplasma*-naiven Spendern. Vergleicht man also die Expression nach der Infektion mit der höheren

Parasitendosis, so war diese trotz eines Anstieges bei seropositiven Spendern immer noch geringer als die von seronegativen Spendern, bei denen eine Inhibition durch den Parasiten vorlag. Außerdem waren die Ergebnisse der Infektionsversuche nur bei der höheren Infektionsdosis knapp signifikant, bei der niedrigeren hingegen nicht. Gleichzeitig variierten die Werte der prozentualen Verteilung MHC-II-positiver Monozyten seropositiver Personen stark (3.3). Somit müssten weiterführende Arbeiten mit einem größeren Probenumfang validere Ergebnisse zu der Expression von HLA-DR,DP,DQ nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* bei seropositiven Individuen hervorbringen, um klarere Aussagen treffen zu können.

4.8 Nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* produzieren PBMCs mehr pro- und weniger anti-inflammatorische Zytokine

Neben durchflusszytometrischen Analysen von Monozyten wurden Monozyten-angereicherte PBMCs der Blutspender *ex vivo* sowie nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* zusätzlich bezüglich ihrer Transkriptmengen für die Zytokine IL-10, IL-12 und TNF- α per RT-qPCR untersucht (2.2.5). Dabei reagierten PBMCs seropositiver Spender geringfügig stärker auf die Infektion als die PBMCs seronegativer Spender, insgesamt waren die Ergebnisse dieser beiden Gruppen jedoch ähnlich. Im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen waren bei den *T. gondii*-infizierten Proben die mRNA-Menge des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 in beiden Spendergruppen ca. fünffach erhöht, gleichzeitig war die mRNA-Menge des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 sechs- bzw. zehnfach (seronegativ bzw. -positiv) erniedrigt. Die Transkriptmengen von TNF- α wurden durch *In-vitro*-Infektion kaum beeinflusst (3.4.1). Unterschiede zwischen den beiden Serogruppen *ex vivo* wurden bereits diskutiert (4.4).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu Zytokintranskripten nach *T. gondii*-Infektion von Monozyten-angereicherten PBMCs stehen weitgehend im Einklang mit früheren Erkenntnissen zur Reaktivität von Zellen des Immunsystems auf einen Erregerstimulus. So initiieren die mononukleären Zellen eine Entzündungsreaktion durch die Hochregulation von IL-12 und die Runterregulation von IL-10, was in dieser Arbeit indirekt über mehr bzw. weniger mRNA der untersuchten Zytokine gezeigt wurde. Pro-inflammatorisches IL-12 stößt weiterführende Immunreaktionen wie die T-Zell-Differenzierung, die IFN- γ -Synthese und die zytotoxische Aktivität von T- und NK-Zellen an (Wolf et al. 1994). Anti-inflammatorisches IL-10 hingegen hemmt die Aktivierung von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen und reguliert die Differenzierung von B-Zellen und regulatorischen T-Zellen, zu deren Aufgaben unter anderem die Induktion von Immuntoleranz gehört. Somit ist die Hauptaufgabe von IL-10 entzündliche Immunreaktionen zu limitieren (Moore et al.

2001). Bei *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* ist das Gleichgewicht deutlich zu Seiten der Inflammation verschoben. In der Literatur wurde eine starke Immunantwort von gesunden Personen auf eine Parasitämie mit Toxoplasmen insbesondere durch die Hochregulation von IL-12 beschrieben (Gazzinelli et al. 1993; Fukao et al. 2001). In der Regel wird durch diese starke Reaktion die akute Toxoplasmose beendet und es verbleiben wenige Parasiten in Form von Bradyzoiten in Gewebssystemen zurück (Bohne et al. 1999). Man würde davon ausgehen, dass *in vivo* die Spiegel der hier untersuchten Zytokine nach der akuten Infektion wieder zu ihren Ausgangswerten zurückkehren, jedoch ist es eher so, dass sie sich an diese annähern. Zumindest deuteten Analysen aus dieser Arbeit zu *Ex-vivo*-Spiegeln chronisch-infizierter Individuen dies an (3.4.1). Außerdem war bei Latent-Infizierten im Vergleich zu *Toxoplasma*-Naiven die Reaktion mit pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen insgesamt stärker ausgeprägt. Möglicherweise reagiert das Immunsystem bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger schneller oder stärker, was die leichten Unterschiede zwischen seropositiven und -negativen Personen erklären würde. Diese Unterschiede sind jedoch insgesamt nur geringfügig und nicht signifikant. In diesem Zusammenhang sei auch das aktuell viel diskutierte Konzept der *trained immunity* angesprochen. Neuere Studien legen nahe, dass auch das angeborene Immunsystem, das bisher als starr und unspezifisch in seiner Reaktion gegenüber Erregern gesehen wurde, in der Lage ist, nach Kontakt zu bestimmten Erregern seine Effizienz bei anderen Infektionen zu verbessern. So konnte gezeigt werden, dass zwei Wochen nach einer Impfung mit dem BCG-Tuberkuloseimpfstoff (*Bacillus Calmette-Guerin*) die Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion mit *Candida albicans* hochreguliert wurde, da deutlich erhöhte Spiegel des von Monozyten produzierten Interleukins 1 β nachgewiesen werden konnten (Netea und van der Meer 2017). Möglicherweise führt auch eine akute Infektion mit *T. gondii* zu ähnlichen Veränderungen der Immunantwort des angeborenen Immunsystems. Um dies nachzuweisen sind jedoch weitere experimentelle Arbeiten notwendig.

Um Schäden am befallenen Organismus durch überschießende Entzündungsreaktionen zu vermeiden, laufen gleichzeitig anti-inflammatorische Prozesse ab (Raes et al. 2007). Tatsächlich führt das Fehlen von IL-10 zu einer überschießenden, teilweise letalen Immunreaktion mit einer Überproduktion von IL-12 und IFN- γ bei Mäusen (Gazzinelli et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte parallel zu den stark erhöhten IL-12-mRNA-Mengen nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* auch eine stark erniedrigte IL-10-mRNA-Menge nachgewiesen werden. Dies zeigt deutlich, dass nach *In-vitro*-Infektion von PBMCs seropositiver und seronegativer Spendern ein stark entzündliches Milieu vorherrscht.

Zusammenfassend ist in der vorliegenden Arbeit auf der Ebene der Zytokinexpression eine deutlich pro-inflammatorische Reaktion von PBMCs auf eine *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* beobachtet worden. Dieses zu Seiten der Inflammation verschobene Gleichgewicht zwischen IL-10 und IL-12 dürfte für die Hemmung des Chemotaxis-Rezeptors CCR2 verantwortlich sein. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen physiologischen

Prozess, mit dessen Hilfe Monozyten an einen Ort der Entzündung gebunden werden. Entgegen früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte in dieser Arbeit eine verstärkte Expression von HLA-DR,DP,DQ bei seropositiven Individuen nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* dokumentiert werden. Die Gründe für die unterschiedliche Expression von HLA-DR,DP,DQ chronisch-infizierter Toxoplasmose-Patienten in dieser und früheren Arbeiten ist zurzeit unklar. Eine Inhibition von MHC-Molekülen der Klasse II konnte in dieser Arbeit dagegen, wie in früheren Arbeiten auch, bei seronegativen Spendern beobachtet werden.

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine chronische Infektion mit dem einzelligen Parasiten *Toxoplasma gondii* zu keiner deutlichen Dominanz einer der bisher beim Menschen näher definierten Monozyten-Subpopulation führt. Es zeigten sich jedoch Hinweise für einen phänotypischen Shift hin zu mehr „intermediären“ und „nicht-klassischen“ und weniger „klassischen Monozyten“ bei seropositiven im Vergleich zu -negativen Individuen. Verbunden war dies erstaunlicherweise mit einer hochsignifikanten Expressionshemmung von CD16, was typischerweise von den beiden erstgenannten Monozyten-Subtypen exprimiert wird (3.2).

Ob diese Veränderungen durch einen konstanten Reiz der vermutlich lebenslang persistierenden Gewebszysten oder durch eine nachhaltige Veränderung im Sinne einer „Narbe“ nach einer akuten Infektion mit dem Parasiten zu erklären sind, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht unterscheiden. Möglicherweise sind parasitäre Exosomen an diesen Veränderungen beteiligt. Dies und die Frage, ob sich die phänotypischen Veränderungen auf Reaktionen gegenüber anderen humanpathogenen Erregern auswirken, bleibt Forschungsgegenstand zukünftiger Arbeiten. Leicht erhöhte Level des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 bei latenter *T.gondii*-Infektion könnten jedoch auf eine insgesamt erhöhte Immunreaktivität hindeuten (3.4.1).

Die *In-vitro*-Infektionsversuche haben ebenfalls Ergebnisse hervorgebracht, die weitergehender Forschung bedürfen. So führte der Kontakt von Monozyten mit dem Parasiten zu einer ausgeprägten Expansion der „klassischen“ Subpopulation, ebenfalls verbunden mit einer Expressionsminderung der Monozyten-typischen Antigene (3.3). Diese Anteilszunahme von weniger auf Erreger-Eradikation ausgerichteten Zellen, trotz Zunahme des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 (3.4.1), kann als Immunevasionsmechanismus während der akuten Infektion mit *T. gondii* gedeutet werden. Tierexperimentelle Studien könnten Hinweise darauf geben, ob man diese Veränderungen während einer akuten Infektion *in vivo* ebenfalls beobachten kann.

5 Zusammenfassung

Der weltweit vorkommende Parasit *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulär lebendes Protozoon und Infektionserreger der Toxoplasmose von Mensch und Tier. Der Mensch infiziert sich meist über unzureichend gegartes Fleisch chronisch-infizierter Zwischenwirte oder durch Aufnahme von Oozysten aus der Umwelt oder dem Trinkwasser. Beim Immungesunden verläuft die akute Toxoplasmose meist asymptomatisch oder mit leichten Allgemeinsymptomen. Durch die zellvermittelte Immunantwort wird die Parasitämie in der Regel beendet und wenige Parasiten verbleiben als sich langsam-teilende Bradyzoiten in Gewebszysten im Wirt zurück, was als chronische Toxoplasmose bezeichnet wird. Die Balance zwischen der Immunreaktion auf den Parasiten und seinen Immunevasionsmechanismen ermöglicht die andauernde Persistenz von *T. gondii* in seinen Wirten. Beeinträchtigungen des Immunsystems können zu einer Reaktivierung der Bradyzoiten mit möglicherweise letalem Ausgang führen. Eine Erstinfektion während der Schwangerschaft stellt ein hohes Risiko für das ungeborene Kind dar und ist deshalb von besonderem medizinischem Interesse.

Der Einfluss von chronischen *Toxoplasma*-Infektionen auf Zellen des angeborenen Immunsystems des Menschen ist weitgehend unbekannt. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Monozyten chronisch-infizierter Personen mehr HLA-DR im Vergleich zu seronegativen Kontrollen exprimierten. Dahinter vermutete der Autor eine Umverteilung zwischen den Monozytensubpopulationen während chronischer *T. gondii*-Infektionen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp humaner Monozyten in Abhängigkeit vom *T. gondii*-Serostatus und nach *In-vitro*-Infektion mit dem Parasiten untersucht. Humane Monozyten wurden nach der geläufigen Nomenklatur in „klassische“ (CD14⁺CD16⁻), „intermediäre“ (CD14⁺CD16⁺) und „nicht-klassische Monozyten“ (CD16⁺CD14^{dim}) eingeteilt, und weitere für die einzelnen Subpopulationen typische Antigene wurden durchflusszytometrisch analysiert. Außerdem wurde das Transkriptmuster ausgewählter Zytokine durch RT-qPCR untersucht.

T. gondii-Seropositive exprimierten *ex vivo* auf der Oberfläche ihrer Monozyten im Vergleich zu seronegativen Personen hochsignifikant weniger CD16 und weniger CD14, CD62L, CCR2 und HLA-A,B,C. Gleichzeitig waren bei Chronisch-Infizierten deutlich weniger Monozyten CD62L-positiv, jedoch mehr CD64-positiv. Damit konnte keine Dominanz einer bestimmten Monozytensubpopulation während einer chronischen Toxoplasmose nachgewiesen werden, jedoch gab es Hinweise, dass die „intermediären“ und / oder „nicht-klassischen“ CD64-positiven zu Lasten der „klassischen“ CD62L-positiven Monozyten expandierten. Auf Zytokin-Transkriptebene wiesen chronisch-infizierte Individuen mehr mRNA des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 auf, was eventuell auf eine erhöhte

Inflammationsbereitschaft in dieser Serogruppe hinweist. Nach *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* wurde IL-12-mRNA bei *Toxoplasma*-seropositiven Spendern im Vergleich zu -seronegativen Personen ebenfalls geringfügig stärker hochreguliert. Die Expression der Oberflächenantigene CD14, CD16 und HLA-DR,DP,DQ war bei ihnen, verglichen mit der Kontrollgruppe, nach der Infektion geringer, sodass analog zu den Ergebnissen der *Ex-vivo*-Analysen auch hier von einer Hemmung der Expression dieser Markerproteine auszugehen ist. Die *In-vitro*-Infektion mit Toxoplasmen führte überraschenderweise zu einer starken Expansion der „klassischen Monozyten“, obwohl gleichzeitig die Expression von CD14 durch die Infektion inhibiert wurde. Dementsprechend waren die Anteile der anderen beiden Subtypen sowie die Expression von CD16 deutlich reduziert. Dies könnte einen weiteren Immunevasionsmechanismus des Parasiten darstellen, um die für die Erregerabwehr effektiven Monozyten zu verringern. Die gleichzeitige Abnahme der „intermediären Monozyten“ deckt sich mit der Abnahme der HLA-DR,DP,DQ-Expression in Anwesenheit des Parasiten aus vorangegangenen Arbeiten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest bei seronegativen Personen beobachtet werden. Nach *In-vitro*-Infektion von adhärennten PPMCs mit *T. gondii* verschob sich wie erwartet das Gleichgewicht zwischen anti-inflammatorischem IL-10 und pro-inflammatorischem IL-12 sowohl bei seropositiven als auch seronegativen Individuen deutlich zu Seiten der Inflammation. Dies ging insbesondere mit einer stark verminderten Expression des Chemotaxis-Rezeptors CCR2 einher, die während der pro-inflammatorischen Reaktion fast vollständig aufgehoben war. Generell fanden die untersuchten Immunreaktionen auf eine *In-vitro*-Infektion mit *T. gondii* meist unabhängig vom Serostatus der Individuen statt.

Die Ergebnisse geben einen Einblick in die möglichen Folgen einer chronischen *Toxoplasma*-Infektion für den Menschen und werfen wichtige Fragen zur Funktionalität des Immunsystems in Abhängigkeit einer Infektion mit einem der häufigsten Parasiten des Menschen auf.

6 Literaturverzeichnis

- Almeida MC de, Cardoso SA, Barral-Netto M (2003): *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* **33**, 153–162
- Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves, Cristiane CF, Oréface F, Addiss DG (2003): Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* **9**, 55–62
- Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K (2008): *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling in macrophages. *Mol Immunol* **45**, 3222–3229
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW (2000): Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* **267**, 1591–1594
- Bernal Sierra YA, Mukherjee S, Fernandez Lahore RG, Tharmalingam T (2018): Fachkurs der Experimentellen Biophysik/Zellbiophysik. Einführung in Methoden der tierischen Zellkultur. <https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/expbp/teaching/zellkultur-2018>, abgerufen am: 24.09.2018
- Biedermann T, Röcken M, Carballido JM (2004): TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell–Mediated Immune Responses of the Skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* **9**, 5–14
- Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O (1991): High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest* **31**, 182–184
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**, 749–795
- Bohne W, Holpert M, Gross U (1999): Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* **201**, 248–254
- Bonnet F, Lewden C, May T, Heripret L, Jouglu E, Bevilacqua S, Costagliola D, Salmon D, Chêne G, Morlat P et al. (2005): Opportunistic infections as causes of death in HIV-infected patients in the HAART era in France. *Scand J Infect Dis* **37**, 482–487
- Butcher BA, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY (2005): IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* **174**, 3148–3152
- Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F, Herbert D'BR, Bzik DJ, Denkers EY (2011): *Toxoplasma gondii* rho-trypanin kinase ROP16 activates STAT3

and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog* **7**, e1002236

Chacin-Bonilla L, Sanchez-Chavez Y, Monsalve F, Estevez J (2001): Seroepidemiology of toxoplasmosis in amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 131–135

Chimma P, Roussillon C, Sratongno P, Ruangveerayuth R, Pattanapanyasat K, Pérignon J-L, Roberts DJ, Druilhe P (2009): A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* **5**, e1000631

Clarkson SB, Bussel JB, Kimberly RP, Valinsky JE, Nachman RL, Unkeless JC (1986): Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody. *N Engl J Med* **314**, 1236–1239

Contini C (2008): Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient. *Parassitologia* **50**, 45–50

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT (2000): Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* **321**, 142–147

Debierre-Grockiego F, Molitor N, Schwarz RT, Lüder CGK (2009): *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols up-regulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. *Innate Immun* **15**, 25–32

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre J-L, Aznar C et al. (2007): Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* **45**, e88–95

Denkers EY, Schneider AG, Cohen SB, Butcher BA (2012): Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge. *PLoS Pathog* **8**, e1002794

Derouin F, Pelloux H (2008): Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect* **14**, 1089–1101

Dlugonska H, Gatkowska J (2016): Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* - host communication. *Ann Parasitol* **62**, 169–174

Dobrowolski JM, Sibley LD (1996): *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84**, 933–939

Doesch AO, Ammon K, Konstandin M, Celik S, Kristen A, Frankenstein L, Müller S, Sack F-U, Katus HA, Dengler TJ (2010): Negative pretransplant serostatus for *Toxoplasma*

- gondii* is associated with impaired survival after heart transplantation. *Transpl Int* **23**, 382–389
- Dubey JP (1997): Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* **44**, 592–602
- Dubey JP (1998): Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **28**, 1019–1024
- Dubey JP (2005): Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. *Vet Parasitol* **133**, 289–298
- Dubey JP: The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K (Hrsg.): *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan - Perspectives and methods. 2. Auflage; Academic Press/Elsevier, London 2014, 2-19
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998): Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **11**, 267–299
- Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MCB, Miska K et al. (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* **91**, 1082–1093
- Dunay IR, Sibley LD (2010): Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol* **22**, 461–466
- Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD (2008): Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **29**, 306–317
- Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW (2005): Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology* **114**, 204–212
- English D, Andersen BR (1974): Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* **5**, 249–252
- Ertug S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H (2005): Seroprevalence and risk factors for toxoplasma infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. *BMC Public Health* **5**, 66
- Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF et al. (2010): Phosphorylation of immunity-related

- GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 8, 484–495
- Ferguson DJP, Dubremetz J-F: The ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K (Hrsg.): *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan - Perspectives and methods. 2. Auflage; Academic Press/Elsevier, London 2014, 20-61
- Fernandes JS, Araujo MI, Lopes DM, Souza RdP de, Carvalho EM, Cardoso LS (2014): Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. *Mediators Inflamm* 2014, 703653
- Figiel M, Krepl M, Park S, Poznański J, Skowronek K, Gołąb A, Ha T, Šponer J, Nowotny M (2018): Mechanism of polypurine tract primer generation by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 293, 191–202
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Heitbrock HZ-W (1993): The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170–3176
- Fischer S, Agmon-Levin N, Shapira Y, Porat Katz B-S, Graell E, Cervera R, Stojanovich L, Gomez Puerta JA, Sanmarti R, Shoenfeld Y (2013): *Toxoplasma gondii*: bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 56, 287–292
- Flaherty MM, MacLachlan TK, Troutt M, Magee T, Tuailon N, Johnson S, Stein KE, Bonvini E, Garman R, Andrews L (2012): Nonclinical evaluation of GMA161--an antihuman CD16 (FcγRIII) monoclonal antibody for treatment of autoimmune disorders in CD16 transgenic mice. *Toxicol Sci* 125, 299–309
- Flegr J (2007): Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull* 33, 757–760
- Flegr J, Havlíček J (1999): Changes in the personality profile of young women with latent toxoplasmosis. *Folia Parasitol (Praha)* 46, 22–28
- Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR (1995): IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 155, 2515–2524
- Foulon W, Naessens A, Derde MP (1994): Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol* 11, 57–62
- Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M (1975): Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 24, 439–443
- Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S (2001): Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 166, 4446–4455
- Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Vollaire J, Jossierand V, Bertini R-L, Varesano A, Touquet B, Bock P-J de, Coute Y et al. (2016): *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host

- chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. *J Exp Med* 213, 1779–1798
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A (1993): Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6115–6119
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A (1996): In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157, 798–805
- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964
- Gross U (2004): Prävalenz und Public-Health-Aspekte der Toxoplasmose. *Bundesgesundheitsbl* 47, 692–697
- Gross U, Müller WA, Knapp S, Heesemann J (1991): Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect Immun* 59, 4511–4516
- Gross U, Bohne W, Windeck T, Heesemann J (1992): Neue Aspekte zur Pathogenese und Diagnostik der Toxoplasmose. *Immun Infekt* 20, 151–155
- Grütz G (2005): New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77, 3–15
- Guo S, DiPietro L (2010): Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* 89, 219–229
- Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS (1999): How do Jains get toxoplasma infection? *Lancet* 354, 486–487
- Hammerstrom J (1979): Human macrophage differentiation in vivo and in vitro. A comparison of human peritoneal macrophages and monocytes. *Acta Pathol Microbiol Scand C* 87C, 113–120
- Hamza T, Barnett JB, Li B (2010): Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci* 11, 789–806
- Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O (1998): Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1983–1991
- Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O (1999): Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res* 40, 1053–1063

-
- Happe S, Fischer A, Heese C, Reichelt D, Grüneberg U, Freund M, Kloska S, Evers S, Husstedt I-W (2002): HIV-assozierte zerebrale Toxoplasmose. Übersicht und retrospektive Analyse von 36 Patienten. *Nervenarzt* 73, 1174–1178
- Havelaar AH, Kemmeren JM, Kortbeek LM (2007): Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 44, 1467–1474
- Hehlgans T, Pfeffer K (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20
- Hermanns B, Brunn A, Schwarz ER, Sachweh JS, Seipelt I, Schröder JM, Vogel U, Schoendube FA, Buettner R (2001): Fulminant toxoplasmosis in a heart transplant recipient. *Pathol Res Pract* 197, 211–215
- Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M (2014): Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol* 192, 2252–2260
- Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S et al. (2005): Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106, 3725–3732
- Hill DE, Dubey JP (2002): *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8, 634–640
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP (2005): Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6, 41–61
- Hippe D, Weber A, Zhou L, Chang DC, Hacker G, Lüder CGK (2009): *Toxoplasma gondii* infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. *J Cell Sci* 122, 3511–3521
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M (1994): Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331, 695–699
- Horelt A, Belge K-U, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L (2002): The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 32, 1319–1327
- Howard JC, Hunn JP, Steinfeldt T (2011): The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* 14, 414–421

- Hulett MD, Hogarth PM (1998): The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* 35, 989–996
- Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F et al. (2010): Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-e19
- Innes EA, Vermeulen AN (2006): Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology* 133 Suppl S2, 145-68
- Iqbal J, Khalid N (2007): Detection of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. *J Med Microbiol* 56, 1495–1499
- Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin GS, Ong CS, Fung CP, Shokeir MO, Dubey JP (1998): Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 64, 2278–2280
- Jambo KC, Banda DH, Kankwatira AM, Sukumar N, Allain TJ, Heyderman RS, Russell DG, Mwandumba HC (2014): Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol* 7, 1116–1126
- Jensen KDC, Wang Y, Wojno EDT, Shastri AJ, Hu K, Cornel L, Boedec E, Ong Y-C, Chien Y-h, Hunter CA et al. (2011): *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* 9, 472–483
- Joiner KA, Beckers CJ, Bermudes D, Ossorio PN, Schwab JC, Dubremetz JF (1994): Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*. *Ann N Y Acad Sci* 730, 1–6
- Julvez J, Magnaval JF, Meynard D, Perie C, Baixench MT (1996): Séro-épidémiologie de la toxoplasmose à Niamey, Niger. *Med Trop (Mars)* 56, 48–50
- Kankova S, Holan V, Zajicova A, Kodym P, Flegr J (2010): Modulation of immunity in mice with latent toxoplasmosis--the experimental support for the immunosuppression hypothesis of *Toxoplasma*-induced changes in reproduction of mice and humans. *Parasitol Res* 107, 1421–1427
- Karaman U, Celik T, Kiran TR, Colak C, Daldal NU (2008): Malondialdehyde, glutathione, and nitric oxide levels in *Toxoplasma gondii* seropositive patients. *Korean J Parasitol* 46, 293–295
- Kasper LH (1989): Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 57, 668–672
- Kugler DG, Flomerfelt FA, Costa DL, Laky K, Kamenyeva O, Mittelstadt PR, Gress RE, Rosshart SP, Rehmann B, Ashwell JD et al. (2016): Systemic toxoplasma infection

- triggers a long-term defect in the generation and function of naive T lymphocytes. *J Exp Med* 213, 3041–3056
- Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Lore K, Barragan A (2009): The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun* 77, 1679–1688
- Lang C, Algner M, Beinert N, Gross U, Lüder CGK (2006): Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes Infect* 8, 1994–2005
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233–240
- Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ (2006): Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med* 10, 364–375
- Li X-Y, Wu L, Li S-W, Zhou W-B, Wang M-Y, Zuo G-Q, Liu C-A, Ding X (2016): Effect of CD16a, the surface receptor of Kupffer cells, on the growth of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med* 37, 1465–1474
- Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS (1997): False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol* 35, 174–178
- Lindová J, Novotná M, Havlíček J, Jozífková E, Skallová A, Kolbeková P, Hodný Z, Kodým P, Flegr J (2006): Gender differences in behavioural changes induced by latent toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 36, 1485–1492
- Lindsay DS, Dubey JP (2009): Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol* 95, 1019–1020
- Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT (2007): *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis* 11, 496–506
- Lüder CGK, Seeber F (2001): *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int J Parasitol* 31, 1355–1369
- Lüder CGK, Gross U (2005): Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 289, 219–237
- Lüder CGK, Lang T, Beuerle B, Gross U (1998): Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 112, 308–316

- Lüder CGK, Walter W, Beuerle B, Maeurer MJ, Gross U (2001): *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur J Immunol* 31, 1475–1484
- Lüder CGK, Algner M, Lang C, Bleicher N, Gross U (2003): Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int J Parasitol* 33, 833–844
- Luft BJ, Remington JS (1992): Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211–222
- Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, Aliberti J, Flick MJ, Jordan MB (2010): Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J Immunol* 184, 877–885
- Matsuo R, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F (1996): Interleukin-12 protects thermally injured mice from herpes simplex virus type 1 infection. *J Leukoc Biol* 59, 623–630
- Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Hazenbos WLW, Verbeek JS, Schmidt RE, Gessner JE (1998): FcγRIII (CD16)-Deficient Mice Show IgG Isotype-Dependent Protection to Experimental Autoimmune Hemolytic Anemia. *Blood* 92, 3997–4002
- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC (2009): The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39, 23–39
- Montoya JG (2002): Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 185 Suppl 1, S73-82
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976
- Montoya JG, Remington JS (2008): Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 47, 554–566
- Montoya JG, Lowe KE, Clayberger C, Moody D, Do D, Remington JS, Talib S, Subauste CS (1996): Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. *Infect Immun* 64, 176–181
- Moore KW, Waal Malefyt R de, Coffman RL, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683–765
- Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969
- Nasi M, Biasi S de, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, Guaraldi G, Mussini C, Pinti M, Cossarizza A (2016): Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 187 (1), 44-52

- Neal LM, Knoll LJ (2014): Toxoplasma gondii profilin promotes recruitment of Ly6Chi CCR2+ inflammatory monocytes that can confer resistance to bacterial infection. *PLoS Pathog* 10, e1004203
- Netea MG, van der Meer JWM (2017): Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe* 21, 297–300
- Nockher WA, Scherberich JE (1998): Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis. *Infect Immun* 66, 2782–2790
- Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, Benfield T, Evengård B (2006): Diagnosis of pulmonary infection with Toxoplasma gondii in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25, 401–404
- Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, Baetselier P de (2007): Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 19, 454–459
- Recalcati S, Gammella E, Buratti P, Doni A, Anselmo A, Locati M, Cairo G (2019): Macrophage ferroportin is essential for stromal cell proliferation in wound healing. *Haematologica* 104, 47-58
- Reeves E, James E (2017): Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology* 150, 16–24
- Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A (1997): In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819–1829
- Robert-Koch-Institut (2009): Toxoplasmose. RKI-Ratgeber für Ärzte. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmosis.html, abgerufen am: 27.09.2018
- Roghmann MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG (1999): Decreased seroprevalence for Toxoplasma gondii in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg* 60, 790–792
- Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KDC, Saeij JPJ (2011): Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein. *J Exp Med* 208, 195–212
- Rosol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U (2012): The CD14brightCD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheumatol* 64, 671–677
- Rougier S, Montoya JG, Peyron F (2017): Lifelong Persistence of Toxoplasma Cysts: A Questionable Dogma? *Trends Parasitol* 33, 93–101

- Ryan P, Hurley SF, Johnson AM, Salzberg M, Lee MW, North JB, McNeil JJ, McMichael AJ (1993): Tumours of the brain and presence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Int J Epidemiol* 22, 412–419
- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC (2001): HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology* 56, 257–260
- Safi W, Kuehnl A, Nüssler A, Eckstein H-H, Pelisek J (2016): Differentiation of human CD14⁺ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Exp Mol Med* 48, e227
- Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R (2018): Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol* 9, 1726
- Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A (1996): In the absence of endogenous IFN- γ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 157, 4045–4054
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA (1994): The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 509–513
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008): Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421–452
- Shapira Y, Agmon-Levin N, Selmi C, Petrikova J, Barzilai O, Ram M, Bizzaro N, Valentini G, Matucci-Cerinic M, Anaya JM et al. (2012): Prevalence of anti-*Toxoplasma* antibodies in patients with autoimmune diseases. *J Autoimmun* 39, 112–116
- Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, Fay MP, Liesenfeld O, Grigg ME (2013): *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 208, 1520–1528
- Skariah S, Bednarczyk RB, McIntyre MK, Taylor GA, Mordue DG (2012): Discovery of a novel *Toxoplasma gondii* conoid-associated protein important for parasite resistance to reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 188, 3404–3415
- Silva AJ da, Moser M (2002): Toxoplasmosis. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Library. <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=3421>, abgerufen am: 20.09.2018
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB (2000): Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 30, 1379–1393

- Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Netto M, van Weyenbergh J (2006): CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79, 36–39
- Stalling P: Expression von HLA-Molekülen in humanen Monozyten in Abhängigkeit von *Toxoplasma gondii*-Infektionen. Med. Diss. Göttingen 2013
- Steinfeldt T, Konen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD, Hunn JP, Howard JC (2010): Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* 8, e1000576
- Stepick-Biek P, Thulliez P, Araujo FG, Remington JS (1990): IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 162, 270–273
- Stern JL, Slobedman B (2008): Human cytomegalovirus latent infection of myeloid cells directs monocyte migration by up-regulating monocyte chemotactic protein-1. *J Immunol* 180, 6577–6585
- Suter BJ, Blatter S, Bittar M, Viollier EH (1999): Toxoplasmose-IgG-Avidität: Welchen Stellenwert hat sie in der Schwangerschaft? *Schweiz Med Wochenschr* 129, 1938-1941
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS (1988): Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516–518
- Tabor A, Alfircvic Z (2010): Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 27, 1–7
- Takeyama N, Yabuki T, Kumagai T, Takagi S, Takamoto S, Noguchi H (2007): Selective expansion of the CD14(+)/CD16(bright) subpopulation of circulating monocytes in patients with hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* 86, 787–792
- Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O (1997): Regulation of Expression of the Human Monocyte Chemotactic Protein-1 Receptor (hCCR2) by Cytokines. *J Biol Chem* 272, 8050–8056
- Tenter AM (2009): *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 364–369
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217–1258
- Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N (1995): CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25, 3418–3424
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171–176

- Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Pina C, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T et al. (2007a): Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol* 73, 5663–5666
- Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Essert T, Packham AE, Truong T, Lagunas-Solar M, Conrad PA (2007b): Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *J Parasitol* 93, 925–931
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F (2016): Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep* 6, 22551
- Wilson E: Apicomplexa: *Toxoplasma gondii*. In: Lamb TJ (Eds.): *Immunity to parasitic infection*. 1. Auflage; John Wiley & Sons, Hoboken 2012, 107-120
- Wolf SF, Sieburth D, Sypek J (1994): Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 12, 154–168
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC (2012): The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53, 41–57
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431–1433
- Xu H, Manivannan A, Crane I, Dawson R, Liversidge J (2008): Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. *Blood* 112, 1166–1174
- Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H (2014): Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2, 1
- Yap GS, Sher A (1999): Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201, 240–247
- Zhu J, Paul WE (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569
- Ziegler-Heitbrock L (2007): The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584–592
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-e80

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Carsten Lüder für seine Geduld und tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit. Weiterhin geht mein Dank an die (ehemaligen) Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Medizinischen Mikrobiologie der UMG, die mir bei allen kleinen Fragen und Problemen im Labor stets eine Hilfe waren.