**Mechanismen der Inhibierung von Wirtszellapoptose
durch *Toxoplasma gondii***

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

**vorgelegt von
Diana Hippe
aus Göttingen**

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. U. Groß

Koreferent: Prof. Dr. J. Stülke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2008

Danksagung

Ein ganz großes und herzliches Dankeschön geht an die Karl-Enigk-Stiftung, die mich die letzten zwei Jahre der Promotion gefördert hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Groß für die Übernahme des Referats, für das rege Interesse und die steten konstruktiven Beiträge während unserer Institutsseminare.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Stülke für die Übernahme des Koreferats und seine freundliche Unterstützung sowie den Mitgliedern der Prüfungskommission für die Bereitschaft, an dem Umlaufverfahren der Dissertation teilzunehmen.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD. Dr. Carsten Lüder für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit, an diesem interessanten Projekt arbeiten zu dürfen. Seine stete Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern möchte ich für ihre stete liebevolle Unterstützung und Geduld danken.

Meinen Kollegen danke ich für die nette Atmosphäre, die Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft, vor allem aber dafür, dass es eine sehr schöne Zeit im Labor gewesen ist.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Liste der Abkürzungen	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XIII
1. Einleitung	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 <i>T. gondii</i> : Taxonomie, Lebenszyklus und Verbreitung	1
1.1.2 Klinische Bedeutung einer <i>T. gondii</i> - Infektion	2
1.1.3 Parasit-Wirt-Interaktion	3
1.1.3.1 Intrazelluläre Lebensweise	3
1.1.3.2 Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	4
1.1.3.3 Immunevasionsmechanismen von <i>T. gondii</i>	6
1.2 Apoptose	7
1.2.1 Bedeutung des programmierten Zelltods innerhalb des Organismus und für das Immunsystem	7
1.2.2 Signalkaskaden des rezeptorvermittelten und des mitochondrialen Apoptosewegs	8
1.2.3 Inhibierung der Apoptose durch <i>T. gondii</i>	12
1.3 Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Zellkultur	14
2.1.1.1 Zellen	14
2.1.1.2 Medien, -Zusätze	14
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Oligonukleotide	16
2.1.4 Molekulargewichtsmarker	16
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.5.1 Antibiotika und Selektionsreagenzien	17
2.1.5.2 Inhibitoren	17

2.1.6 Enzyme	18
2.1.7 Kits	18
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.9 Geräte	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
2.2.1.1 Kultur und Isolierung von <i>T. gondii</i>	19
2.2.1.2 Kultivierung von Wirtszellen	19
2.2.1.2.1 L929	19
2.2.1.2.2 HeLaFas	20
2.2.1.2.3 Jurkat	20
2.2.1.2.4 HeLa-WT	20
2.2.1.2.5 HeLa-BimS	20
2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	20
2.2.1.4 Aussäen der Wirtszellen und Infektion mit <i>T. gondii</i>	21
2.2.2 Herstellung von Bax-YFP exprimierenden Zellen	22
2.2.2.1 Transformation in <i>E. coli</i>	22
2.2.2.2 Plasmidisolierung	22
2.2.2.2.1 Plasmidisolierung mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit	22
2.2.2.2.2 Plasmidisolierung ohne Kit	23
2.2.2.3 Plasmidaufreinigung	24
2.2.2.4 Restriktionsverdau von Bax-pEYFP-C1	24
2.2.2.5 Transfektion mit Bax-pEYFP-C1	25
2.2.3 Vorbehandlung von <i>T. gondii</i>	25
2.2.4 Vorbehandlung der Wirtszellen	26
2.2.5 Induktion der Apoptose	26
2.2.6 Hemmung der Caspase-Aktivität zum Inaktivieren der mitochondrialen Amplifikationsschleife	27
2.2.7 Proteinisolierung	27
2.2.7.1 Gesamtlysat	27
2.2.7.2 Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Proteinextrakte	28
2.2.7.3 Isolierung von Membranfraktionen ohne Membran-assoziierte Proteine	29
2.2.8 Crosslinking von Bax-Oligomeren mit EGS	29
2.2.9 SDS-PAGE	30
2.2.10 Western Blot	31
2.2.11 RNA-Isolierung	34

2.2.12 Reverse Transkription	35
2.2.13 PCR	35
2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.15 Morphologische Detektion der Apoptose durch Hoechst-Färbung	36
2.2.16 TUNEL-Färbung	37
2.2.17 Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.2.18 Caspase-Aktivitätstest	39
2.2.19 Intrazelluläre Färbungen und Durchflusszytometrie	40
2.2.20 Immunkopräzipitation	41
2.2.21 Statistische Analyse	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Inhibierung der Apoptose durch <i>T. gondii</i> nach Stimulation des rezeptorvermittelten Apoptosesignalweges	43
3.1.1 <i>T. gondii</i> inhibiert die Apoptose nach Fas-Ligation in Typ II-Zellen	43
3.1.2 Fas-Ligation aktiviert den mitochondrialen Apoptosesignalweg in Typ II HeLa-Fas-Zellen	45
3.1.3 Die Cytochrom c-Freisetzung nach Fas-Ligation in HeLa-Fas-Zellen ist in <i>T. gondii</i> -infizierten Zellen gehemmt	47
3.1.4 Die Proform der Initiatorcaspase 8 ist in <i>T. gondii</i> -infizierten HeLa-Fas-Zellen herunterreguliert	48
3.1.5 <i>T. gondii</i> verhindert die Fas-induzierte Apoptose in Typ II-Zellen hauptsächlich durch Hemmung des mitochondrialen Amplifikationsloops	50
3.2 Inhibierung der Apoptose durch <i>T. gondii</i> nach Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskaden	53
3.2.1 <i>T. gondii</i> interferiert mit der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade zwischen BimS-Expression und der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien	53
3.2.2 <i>T. gondii</i> inhibiert die Aktivierung der Caspasen 8, -9, und -3 nach induzierbarer Expression von BimS	57
3.2.3 Die Inhibierung des mitochondrialen Apoptoseweges durch <i>T. gondii</i> beruht weder auf einer Degradierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak noch auf einer Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie	59
3.2.4 <i>T. gondii</i> verhindert die Aktivierung von Bax und Bak nach proapoptotischen Stimuli	65

3.2.5 Die Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran ist in <i>T. gondii</i> -infizierten Zellen gehemmt	69
3.2.6 Die Oligomerisierung von Bax nach proapoptotischen Stimuli in <i>T. gondii</i> -infizierten Zellen ist stark vermindert	74
3.2.7 Interaktionen von Proteinen der Bcl-2-Familie und <i>T. gondii</i>	76
3.3 Voraussetzungen der Hemmung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade durch <i>T. gondii</i>	79
3.3.1 Kinetik der Apoptosehemmung	79
3.3.2 Voraussetzungen des Parasiten für die Apoptosehemmung	80
3.3.3 Hsp70 als mögliches Effektormolekül der Apoptosehemmung	83
4. Diskussion	86
4.1 <i>T. gondii</i> inhibiert die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II HeLa-Fas-Zellen hauptsächlich durch Interferenz mit dem mitochondrialen Amplifikationsloop	86
4.2 <i>T. gondii</i> interferiert mit dem intrinsischen Apoptose-Signalweg durch eine direkte Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie	91
4.2.1 Mechanismen der Bax/Bak-Aktivierung durch BH3-only Proteine unabhängig von einer <i>T. gondii</i> -Infektion	91
4.2.2 Modulation der intrinsischen Signalkaskade durch <i>T. gondii</i> oberhalb der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien	93
4.3 Voraussetzungen des Parasiten für die Hemmung des intrinsischen Apoptose-signalweges	98
4.4 In vivo-Bedeutung der Apoptose und therapeutische Ansätze	102
5. Literatur	106
Publikationen	120
Fachartikel	120
Kongressbeiträge	120
Lebenslauf	122

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signaltransduktion des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweges	10
Abb. 2: Inhibierung von Fas/CD95-vermittelter Apoptose durch <i>T. gondii</i> in Typ II-Zellen	44
Abb. 3: Eine Invasion von <i>T. gondii</i> in Typ II-Zellen inhibiert die Fas/CD95-vermittelte Apoptose	45
Abb. 4: Die Aktivitäten der Caspasen 8, -9, -3 sowie die Spaltung von Bid nach Fas/CD95-vermittelter Apoptose sind in <i>T. gondii</i> -infizierten Typ II-Zellen gehemmt	46
Abb. 5: <i>T. gondii</i> blockiert die Cytochrom c- Freisetzung in HeLa-Fas-Zellen während der Fas/CD95-induzierten Apoptose	48
Abb. 6: Spaltung von Caspase 8 während Fas/CD95-vermittelter Apoptose und alternative Spaltung in <i>T. gondii</i> - infizierten Wirtszellen	49
Abb. 7: Die Aktivierung der Caspase 3/7 nach Fas/CD95-Stimulation in HeLa-Fas-Zellen ist abhängig von der Aktivierung der Caspase 9	50
Abb. 8: <i>T. gondii</i> verhindert die Fas-induzierte Apoptose in Typ II-Zellen hauptsächlich durch Hemmung des mitochondrialen Amplifikationsloops	51
Abb. 9: <i>T. gondii</i> - infizierte Zellen werden nach intrinsischen proapoptotischen Stimuli vor dem Zelltod bewahrt	54
Abb. 10: <i>T. gondii</i> inhibiert die Cytochrom c-Freisetzung nach induzierter BimS-Expression in HeLa-BimS-Zellen	55
Abb. 11: Die Hemmung der Cytochrom c- Freisetzung in <i>T. gondii</i> -infizierten HeLa-BimS-Zellen nach induzierter BimS-Expression ist unabhängig von Caspase-abhängigen Feedbackmechanismen	56
Abb. 12: <i>T. gondii</i> inhibiert die enzymatische Aktivität der Caspasen 9 und -3/7 nach induzierter BimS-Expression durch Tetrazyklin-Behandlung	57
Abb. 13: <i>T. gondii</i> interferiert mit der proteolytischen Spaltung der Caspasen 8, -9 und -3 nach induzierter BimS-Expression	58
Abb. 14: <i>T. gondii</i> interferiert nicht mit der Tetrazyklin-induzierten Expression von BimS	59
Abb. 15: Die Proteinlevel der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x und A1 sind nach Infektion mit <i>T. gondii</i> unverändert	60
Abb. 16: Die Proteinlevel der Multidomänenproteine Bax und Bak sind unverändert in <i>T. gondii</i> - infizierten Zellen	61
Abb. 17: Proteinlevel der BH3-only Proteine nach Infektion mit <i>T. gondii</i>	62
Abb. 18: Die Hemmung der Cytochrom c- Freisetzung durch <i>T. gondii</i> ist unabhängig von der Wirtszelltranskription	63

Abb. 19:	Die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch <i>T. gondii</i> nach pro-apoptotischen Stimuli ist nicht durch eine Modulation der PI 3-Kinase-abhängigen Signalkaskade bedingt	65
Abb. 20:	Die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran ist in <i>T. gondii</i> -infizierten Wirtszellen unverändert	66
Abb. 21:	<i>T. gondii</i> verhindert die Aktivierung von Bax und Bak nach proapoptotischen Stimuli	67
Abb. 22:	Intrazelluläre <i>T. gondii</i> verhindern die Aktivierung von Bax nach Tetrazyklin-induzierter BimS-Expression	69
Abb. 23:	Eine Infektion mit <i>T. gondii</i> verhindert die Translokation von Bax in HeLa-WT-Zellen nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin	70
Abb. 24:	Plasmidkontrolle von pEYFP-C1-Bax	71
Abb. 25A:	Intrazelluläre <i>T. gondii</i> verhindern die Translokation von Bax-YFP nach Tetrazyklin- induzierter Expression von BimS	72
Abb. 25B:	Intrazelluläre <i>T. gondii</i> verhindern die Translokation von Bax-YFP nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin	73
Abb. 26:	<i>T. gondii</i> verhindert die Oligomerisierung von Bax nach proapoptotischen Stimuli	75
Abb. 27:	Immunpräzipitation von Bim aus Proteinlysaten von <i>T. gondii</i> - infizierten und nicht-infizierten HeLa-BimS-Zellen	77
Abb. 28:	Kinetik der Caspase 3/7- Inhibierung durch <i>T. gondii</i>	80
Abb. 29:	Wirtszellinvasion und intrazelluläre Entwicklung von unterschiedlich vorbehandelten <i>T. gondii</i>	81
Abb. 30:	Voraussetzungen von <i>T. gondii</i> für die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität	82
Abb. 31:	Die Induktion bzw. die Hemmung von Hsp70 als mögliches Effektormolekül von <i>T. gondii</i> haben keinen Effekt auf die Apoptosehemmung	84
Abb. 32:	<i>T. gondii</i> interferiert mit Apoptosesignalkaskaden seiner Wirtszelle durch mehrere Prozesse	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verdünnungen der Primärantikörper für Immunfärbung	33
Tabelle 2: PCR-Programme	36
Tabelle 3: Antikörper und deren Verdünnung für die Immunfluoreszenz	39
Tabelle 4: Antikörper für FACS-Färbung	41

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
mAk	Monoklonaler Antikörper
pAk	Polyklonaler Antikörper
Act D	Actinomycin D
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
Akt/PkB	Serin/Threonin-Kinase Akt, auch Protein Kinase B
ANT	Adenin-Nuclear-Translocase
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	B-cell lymphoma
bp	Basenpaare
BH-Domäne	Bcl-2 Homologie-Domäne
Bok	Bcl-related Ovarian Killer
CHX	Cycloheximid
COX	Cytochrom c Oxidase
Cyto D	Cytochalasin D
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
DEVD-AMC	Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin
DISC	Death Inducing Signaling Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacidic-Acid
EGS	Ethylenglycolbis(sulfosuccinimidyl)succinate
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
h	Stunden (hours)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonacid
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsp	Heat Shock Protein

IAP	Inhibitors of Apoptosis
IETC-AMC	Ile-Glu-Thr-Cys-Aminomethylcoumarin
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunoglobulin Isotyp G
IL-12	Interleukin 12
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LEHD-AMC	Leu-Glu-His-Asp-Aminomethylcoumarin
LEHD-FMK	Leu-Glu-His-Asp-Fluoromethyl-Keton
MAP	Mitogen Activated Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF- κ B	Nuklearer Faktor κ B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
SEM	Standard Error Mean
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Stau	Staurosporin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tet	Tetrazyklin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling
U	Unit
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage Dependet Anion Channel
WT	Wildtyp
YFP	Yellow Fluorescent Protein
zVAD-FMK	z-Val-Ala-Asp-Fluoromethyl-Keton

Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit des Phylums Apikomplexa, der durch sein breites Wirtsspektrum und die lebenslange Persistenz in seinem Wirt zu einem der erfolgreichsten Parasiten gehört. Eine Infektion verläuft bei immunkompetenten Personen meist symptomlos, bei Föten oder immungeschwächten Patienten kann sie jedoch zur Toxoplasmose mit schweren Schädigungen, vor allem des zentralen Nervensystems, führen. *T. gondii* hat unterschiedliche Strategien entwickelt, dem Immunsystem seines Wirtes zu entgehen und sein intrazelluläres Überleben zu erleichtern. Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Erreger dar. So können intrinsische Stresssignale oder zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen Apoptose in infizierten Zellen auslösen. Die Vermehrung intrazellulärer Pathogene kann durch den Zelltod infizierter Zellen verhindert und nach Phagozytose apoptotischer infizierter Zellen die Antigenpräsentation stimuliert werden. *T. gondii* ist jedoch in der Lage, die Apoptose nach unterschiedlichen pro-apoptotischen Stimuli zu inhibieren. Die molekularen und zellulären Mechanismen der Apoptosehemmung durch *Toxoplasma* sind bisher jedoch nicht ausreichend aufgeklärt. In dieser Studie sollten daher die Inhibierungsmechanismen von *T. gondii* in Zellen, in denen Apoptose durch Ligation von Fas/CD95 oder Aktivierung des intrinsischen Signalweges ausgelöst wurde, identifiziert und charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der extrinsisch ausgelösten Apoptose in Fas/CD95-transfizierten HeLa-Zellen, sogenannten Typ II-Zellen, nach Infektion mit *T. gondii* untersucht. In diesen Zellen wird nach Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges zusätzlich die mitochondriale Amplifikationsschleife aktiviert. Eine Infektion mit *T. gondii* verhinderte in diesen Typ II-Zellen effektiv die Apoptose nach Fas/CD95-Ligation. *T. gondii* reduzierte außerdem dosisabhängig die Fas/CD95-vermittelte Aktivität von Caspase 8, -9 und 3/7 sowie die Spaltung von Bid. Die Ligation von Fas/CD95 führte zu einer starken Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges, wie anhand der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien und einer deutlichen Aktivierung der Caspase 9 nachgewiesen wurde. Die Verwendung von Caspase 9-Inhibitoren und Caspase 9-defizienten Zellen zeigte weiterhin, dass die Exekution der Apoptose in Typ II-Zellen wesentlich von der Aktivierung des mitochondrialen Amplifikationsloops und Feedback-mechanismen der Effektorcaspasen abhing. Nach Infektion mit *T. gondii* waren die Cytochrom c-Ausschüttung ins Wirtszellcytosol sowie die Aktivierung der Caspase 9 deutlich gehemmt. Die Hemmung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in Typ II-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* beruhte dabei zum Teil auf der Hemmung der Caspase 8-Aktivität. Ähnlich wie bereits für Typ I-Zellen nachgewiesen, induzierte *T. gondii* in HeLa-Fas-Zellen eine alternative Spaltung der Caspase 8, die eine Degradierung der Caspase 8 zur Folge hatte

und die proteolytische Spaltung von Caspase 8 in aktive Untereinheiten nach Fas/CD95-Ligation verhinderte. Untersuchungen an Caspase 9-defizienten Jurkat-Zellen und Caspase 9-exprimierenden Revertanten zeigten jedoch deutlich, dass dieser Inhibierungsmechanismus nur geringfügig zu der Hemmung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in Typ II-Zellen beitrug. Eine effektive Hemmung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose beruhte dagegen im Wesentlichen auf der Interferenz von *T. gondii* mit dem mitochondrialen Amplifikationsloop. Dabei dürfte die in dieser Arbeit gezeigte Modulation der Bcl-2-Proteine eine wichtige Rolle spielen. Allerdings kann eine zusätzliche Inhibierung durch Verhinderung der Apoptosombildung nicht komplett ausgeschlossen werden.

Wie *T. gondii* die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien des intrinsischen Apoptosesignalweges verhindert, konnte in früheren Arbeiten nicht detailliert geklärt werden. In dieser Studie wurde nun gezeigt, dass nach induzierter Expression des BH3-only Proteins BimS eine Infektion mit *Toxoplasma* die Apoptose sehr effektiv hemmte und dabei die Aktivitäten der Caspasen 9, -3/7, und -8 dosisabhängig reduzierte. Nach Hemmung der Feedback-Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges durch Effektorcaspasen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass *T. gondii* mit der Signalkaskade zwischen Expression von BimS und der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien interferierte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass *T. gondii* die Aktivierung, jedoch nicht die Proteinexpression der zentralen pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak blockierte und dadurch die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach pro-apoptotischen Stimuli hemmte. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Translokation von Bax in *T. gondii*-infizierten Zellen an die Mitochondrien und die darauffolgende Oligomerisierung in der Mitochondrienmembran verhindert wurde. Neben der Hemmung der Bax- und Bak-Aktivierung könnte die *T. gondii*-vermittelte Degradierung des zusätzlichen Multidomänenproteins Bok in HeLa-abgeleiteten Zellen zelltyp-spezifisch zu der Apoptosehemmung beitragen. Die Daten dieser Arbeit belegen deutlich, dass die Aktivierung von Bax und Bak unabhängig von einer verstärkten Expression anti-apoptotischer BH4-Proteine und verminderter Expression pro-apoptotischer BH3-only-Proteine durch *T. gondii* gehemmt wurde. Für eine effektive *T. gondii*-vermittelte Inhibierung der Cytochrom c-Freisetzung war eine Invasion des Parasiten in die Wirtszelle notwendig. Da die Inhibierung nicht auf einer induzierten Transkription anti-apoptotischer Moleküle beruhte, dürfte die Interferenz von *T. gondii* mit Bcl-2-Proteinen aus einer direkten Interaktion von Parasit und Wirtszelle resultieren. Eine mögliche Sekretion von parasitären anti-apoptotischen Effektormolekülen in die Wirtszelle wurde auch durch den Zeitverlauf der Hemmung des intrinsischen Apoptosesignalweges unterstützt, der zeigte, dass das Inhibierungspotential nach Infektion mit der Zeit zunahm und nach 9-12 Stunden eine fast vollständige Hemmung der Effektorcaspasen 3/7 erreicht war. In dieser Arbeit wurde damit ein bisher unbekannter

Mechanismus der Interferenz von *T. gondii* mit der Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine nachgewiesen, der wesentlich zur Hemmung des intrinsischen Apoptoseweges in *Toxoplasma*-infizierten Zellen beitragen dürfte.

Zusammenfassend hat *T. gondii* unterschiedliche Strategien entwickelt, je nach Zelltyp und Apoptoseinduktion den Zelltod seiner Wirtszelle effektiv zu verhindern. Die Inhibierung der Apoptose durch *T. gondii* erleichtert die intrazelluläre Vermehrung des Parasiten und dürfte die Verbreitung des Parasiten im Organismus wesentlich begünstigen.

Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular apicomplexan parasite. Due to its broad spectrum of hosts and its lifelong persistence in the host it is one of the most successful parasites. Infection of immunocompetent individuals is mostly asymptomatic, but infection of fetuses or immunocompromised patients can induce life-threatening toxoplasmosis with severe symptoms, particularly in the central nervous system. *T. gondii* has evolved different strategies to evade the immune system of its host and to facilitate its own intracellular survival. Apoptosis is a common form of programmed cell death and represents an important defense mechanism against intracellular pathogens. Apoptosis in infected cells can be induced by intrinsic signals, e.g. cellular stress or by cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells that bind to surface death receptors on the infected cell. Apoptosis of infected cells counteracts replication of intracellular pathogens and facilitates antigen presentation after phagocytosis of infected apoptotic cells. However, *T. gondii* is able to inhibit apoptosis that was induced in its host cell by different pro-apoptotic stimuli. So far, the molecular and cellular mechanisms of this inhibition have not yet been fully elucidated. The aim of this study was to identify and characterise the inhibitory mechanisms employed by *T. gondii* to prevent apoptosis after ligation of Fas/CD95 or after activation of the intrinsic signaling cascade in its host.

In the present study, the inhibition of the extrinsic signaling pathway was investigated in Fas-transfected HeLa-cells, representing so called type II-cells, after infection with *T. gondii*. In this type of cells, apoptosis induced by activation of the extrinsic signaling pathway depends on the activation of the mitochondrial amplification loop. *T. gondii* was able to efficiently block apoptosis after ligation of Fas/CD95 in these type II-cells. Additionally, Fas-induced activity of caspase 8, -9 and -3/7 and also cleavage of Bid were dose-dependently reduced after infection with increasing amounts of *T. gondii*. Ligation of Fas/CD95 led to a strong activation of the mitochondrial apoptotic signaling pathway as revealed by detection of cytochrome c-release out of the mitochondria and strong activation of caspase 9. Furthermore, treatment with caspase 9-inhibitors and caspase 9-deficient cells showed that execution of apoptosis in type II-cells was critically dependent on positive feedback-mechanisms of effector caspases. However, Fas/CD95-induced cytochrome c-release into the host cell cytosol and activation of caspase 9 were clearly inhibited after infection with *T. gondii*. The inhibition of Fas/CD95-mediated apoptosis by *T. gondii* partially depended on the inhibition of caspase 8 activity. As it has been already shown in type I-cells, *T. gondii* induced an aberrant cleavage of caspase 8 which was followed by its degradation and the inhibition of proteolytic cleavage of caspase 8 after ligation of Fas/CD95 into active subunits. However, experiments using caspase 9-deficient Jurkat cells and caspase 9-expressing revertant cells unambiguously showed that this inhibitory mechanism contributed only to a minor extent to the total inhibition

of Fas/CD95-mediated apoptosis in type II-cells. An effective inhibition of Fas/CD95-mediated apoptosis was indeed mainly based upon interference of *T. gondii* with the mitochondrial amplification loop. The modulation of Bcl-2-proteins which has been also shown in this study to be altered after *T. gondii*-infection may play a major role during the inhibition of the mitochondrial amplification loop by *T. gondii*. However, interference with apoptosome formation as described earlier cannot be completely excluded as an additional inhibitory mechanism.

In previous studies, it could not be elucidated in detail how *T. gondii* interferes with cytochrome c-release out of mitochondria after induction of the intrinsic signaling pathway. This study now provides clear evidence that infection with *T. gondii* efficiently inhibited apoptosis after inducible expression of the BH3-only protein BimS. Furthermore the activities of caspase 9, -3/7 and -8 were dose-dependently reduced after parasitic infection. Importantly, the present study provides clear evidence that *T. gondii* interferes with the apoptotic signaling cascade between the inducible expression of BimS and cytochrome c-release out of mitochondria. Such interference by *T. gondii* was also confirmed after inhibition of effector caspases, thereby, ruling out the involvement of positive feedback mechanisms during inhibition of the mitochondrial apoptotic pathway by the parasite. Most importantly, it has been shown for the first time that *T. gondii* blocks activation, but not protein expression of the pivotal pro-apoptotic proteins Bax and Bak, thereby inhibiting cytochrome c-release out of mitochondria after intrinsic pro-apoptotic stimuli. Furthermore, translocation of Bax to the mitochondria and subsequent oligomerisation within the mitochondrial membrane was clearly decreased by infection with *T. gondii*. In addition to the inhibition of Bax- and Bak-activation, the degradation of the additional cell-type specific pro-apoptotic protein Bok in HeLa-derived cells could contribute to the parasite-imposed inhibition of apoptosis in a cell type-dependent manner. Nevertheless, data of this study proved that activation of Bax and Bak in *T. gondii*-infected cells was inhibited independent of an increased expression of anti-apoptotic BH4-proteins and reduced expression of pro-apoptotic BH3-only proteins by *T. gondii*. An invasion of the parasite into the host cell was required for *T. gondii*-mediated inhibition of cytochrome c release. Additionally, the inhibition of apoptosis was not due to an induced transcription of anti-apoptotic molecules after infection, suggesting that the interference of *T. gondii* with Bcl-2-proteins may result from a direct interaction between the parasite and its host cell. A putative secretion of parasitic anti-apoptotic effector molecules into the host cell by *T. gondii* was supported by the kinetics of the inhibition of the intrinsic apoptotic pathway. They showed that the inhibitory potential increased early after infection and almost completely inhibited effector caspases 3/7 after 9 to 12 hours of infection. Thus, the present study revealed an hitherto unknown mechanism of interference of *T. gondii* with activation of pro-apoptotic Bcl-2-proteins. This mechanism may

considerably contribute to the inhibition of the intrinsic apoptotic pathway in *T. gondii*-infected cells.

In conclusion, *T. gondii* has evolved different strategies to efficiently prevent cell death of its host cell, partially depending on cell type and apoptosis induction. The inhibition of apoptosis by *T. gondii* facilitates the intracellular replication of the parasite and may promote dissemination of the parasite in its host organism.

1. Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 *T. gondii*: Taxonomie, Lebenszyklus und Verbreitung

Toxoplasma gondii wurde 1908 von Nicolle und Manceaux in Geweben des nordafrikanischen Nagetiers *Ctenodactylus gondii* entdeckt (Nicolle und Manceaux, 1909). *T. gondii* gehört dem Phylum Apikomplexa an, das eine Gruppe obligat intrazellulärer Parasiten umfasst, zu denen u. a. wichtige humanpathogene Arten der Gattungen *Plasmodium*, *Isospora*, *Cryptosporidium* und *Sarcocystis* sowie tierpathogene Arten der Gattungen *Theileria*, *Eimeria*, *Neospora*, *Isospora* und *Sarcocystis* gehören. Diese Organismen kennzeichnet die aktive Invasion in Wirtszellen mit Hilfe des Apikalkomplexes, der aus Polringen, Rhoptrien, Dichten Granula, Mikronemen und bei einigen Arten einem auffälligen Conoid besteht.

T. gondii zeichnet sich wie andere Vertreter der Apikomplexa durch einen Generationswechsel aus. Die sexuelle Vermehrung findet ausschließlich im Dünndarmepithel der Katze und anderer Katzenartigen (*Felidae*) statt. Der Parasit vermehrt sich in seinem Endwirt durch multiple Teilung (Schizogonie) und der Verschmelzung von Gameten (Gamogonie). Mit dem Kot ausgeschiedene Oozysten sporulieren zu infektiösen Sporozoiten (Sporogonie), die durch orale Aufnahme in einen Zwischenwirt gelangen können. Für den Generationswechsel von *T. gondii* nimmt die Familie der Felidae als alleinige Endwirte eine zentrale Stellung ein. Andere Säugetiere wie die Maus, das Schaf oder der Mensch stellen Zwischenwirte dar, in denen ausschließlich eine asexuelle Vermehrung stattfindet (Gross, 1994). Im Dünndarmepithel des Zwischenwirtes differenzieren sich die Sporozoiten zu Tachyzoiten, die sich durch innere Sprossung asexuell vermehren. Die Teilungen finden intrazellulär innerhalb einer parasitophoren Vakuole statt. Nach ca. fünf Teilungen bricht die Wirtszelle auf, die Tachyzoiten können über das Blut oder die Lymphe im Körper disseminieren und weitere Zellen infizieren. Vor allem in der Leber, den Lymphknoten und der Lunge findet eine schnelle Vermehrung der Tachyzoiten statt (Frenkel, 1988). Im Zuge einer adäquaten Immunabwehr des Wirtes nach einer akuten Infektion wandeln sich die Tachyzoiten in ruhende Bradyzoiten um, die innerhalb von Zysten vornehmlich im Muskelgewebe und im Zentralen Nervensystem persistieren (Gross, 1994). Durch den Verzehr zystenhaltigen Fleisches gelangt der Erreger in neue Zwischen- bzw. Endwirte. Mit der Aufnahme von Gewebezysten durch einen Endwirt schließt sich der Lebenszyklus.

Durch sein breites Wirtsspektrum und die Fähigkeit im Wirt zu persistieren, ist *T. gondii* einer der häufigsten, weltweit verbreiteten Parasiten. Es wird geschätzt, dass etwa 30% der Weltbevölkerung infiziert sind (McGavin et al., 1996). In Europa ist die Seroprävalenz vor allem in südlichen Gebieten hoch und erreicht beispielsweise in Frankreich Werte von 54% (Baril et al., 1999), mit steigendem Breitengrad nimmt sie jedoch ab. Im nördlichen Schweden und Norwegen liegt die Seroprävalenz bei etwa 5-10% (Evengard et al., 2001; Jenum et al., 1998).

T. gondii kann in drei grundlegende Genotypen unterteilt werden (Sibley und Boothroyd 1992; Grigg et al., 2001), die teilweise für unterschiedliche Pathogenitäten während der Infektion verantwortlich sein dürften. In Mäusen ist eine Infektion mit nur einem Parasiten des Typ I lethal, während die lethale Dosis von Typ II und Typ III 100-1000fach höher ist (Boothroyd und Grigg, 2002).

1.1.2 Klinische Bedeutung einer *T. gondii*-Infektion

1923 wurden von einem tschechischen Augenarzt erstmals okuläre Manifestationen durch eine Infektion mit *T. gondii* beschrieben (Janku, 1923).

Für den Menschen mögliche Infektionsquellen sind (i) der Verzehr zystenhaltigen Fleisches, das ungenügend gegart wurde, (ii) orale Aufnahme von Oozysten mit Katzenkot aus kontaminiertem Erdreich oder kontaminierten Nahrungsmitteln (Ockert, 1994), (iii) tachyzoitenhaltige Bluttransfusionen oder Transplantate mit Gewebezysten (Britt et al., 1981) oder (iv) der diaplazentale Transfer von Tachyzoiten auf den Fötus bei einer Erstinfektion oder Reaktivierung von Gewebezysten während der Schwangerschaft.

Eine akute Infektion mit *T. gondii* von immunkompetenten Personen verläuft meist symptomlos oder mit leichten Grippeerscheinungen (Gross, 1994). Allerdings können auch bei immungesunden Personen klinische Manifestationen einer okulären Toxoplasmose durch eine postnatal erworbene Toxoplasmose teilweise vorkommen (Glasner et al, 1992; Montoya et al., 1996). Diese führen zu einer Beeinträchtigung der Sehkraft, einer Entzündung der Retina oder des Choroids.

Außerdem ist *T. gondii* ein wichtiges opportunistisches Pathogen bei immunsupprimierten Patienten. Bei einer deutlichen Schwächung der zellulären Immunabwehr kann es zu einer Reaktivierung von Gewebezysten kommen. Ursachen dafür können zum einen Krankheiten sein, die eine Lymphozytopenie verursachen, wie z.B. das Non-Hodgkin-Lymphom oder eine HIV-Infektion (Luft und Remington, 1992; Luft et al., 1993), zum anderen kann eine therapeutische Immunsuppression nach Transplantation oder durch Chemotherapie eine Reaktivierung latenter Parasitenstadien hervorrufen (Israelski und Remington, 1993; Pöhle, 1994). Intrazerebrale Entzündungsherde können Symptome wie Fieber, Wesens-

veränderungen, Kopfschmerzen, Krampfanfälle, Gleichgewichtsstörungen, Lähmungserscheinungen und Augenhintergrundsveränderungen zur Folge haben und unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod führen.

Eine besondere klinische Bedeutung hat die konnatale Toxoplasmose bei Erstinfektion während der Schwangerschaft. *T. gondii* kann während einer Schwangerschaft diaplazentar von der Mutter auf den Fötus übertragen werden (Remington et al., 1976) oder auch seltener bei Reaktivierung von persistierenden Ruhestadien (Friese, 1994). Die Rate der transplazentaren Übertragung steigt mit der Dauer der Schwangerschaft, das Ausmaß der Schädigung des Fötus nimmt jedoch mit der Dauer ab (Roux et al., 1974). Während eine Infektion zu Beginn der Schwangerschaft zum Abort führen kann, ist eine Übertragung auf den Fötus nach Abschluss der Organogenese zum Teil mit einem Hirnbefall mit späterem Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und einer Chorioretinitis verbunden. Kurz vor der Geburt infizierte Kinder können Symptome der Gelbsucht (Ikterus), einer Vergrößerung der Leber und Milz (Hepatosplenomegalie) und einer Zyanose zeigen. In vielen Fällen sind diaplazentar infizierte Neugeborene zum Zeitpunkt der Geburt klinisch unauffällig. Eine konnatale Toxoplasmose kann jedoch noch Monate oder Jahre später Folgeerscheinungen bewirken, zu denen psychomotorische Retardierung, Krampfanfälle, Hör- und Sehstörungen gehören (Wilson et al., 1980; Koppe et al., 1986).

T. gondii hat nicht nur klinische Bedeutung für den Menschen, sondern spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Viehzucht. Neben *Neospora caninum* und *Sarcocystis spp.* gilt *T. gondii* als bedeutender Erreger in Schweinen, Schafen und Ziegen. *T. gondii* wird als Hauptursache von Aborten in Schafen und Ziegen betrachtet. Durch Verluste in der Viehzucht stellt *T. gondii* somit ein großes ökonomisches Problem dar (Dubey und Rommel, 1992; Owen, 1988; Buxton, 1998).

1.1.3 Parasit-Wirt-Interaktion

1.1.3.1 Intrazelluläre Lebensweise

Die hohe Prävalenz, weltweite Verbreitung und die Fähigkeit, im Organismus trotz eines hochentwickelten Immunsystems zu persistieren, zeugen davon, dass *T. gondii* an das Leben innerhalb seines Wirtes sehr gut angepasst ist. Tatsächlich schaffen u.a. die Entwicklung innerhalb einer parasitophoren Vakuole (PV), die strukturelle Veränderung der infizierten Wirtszelle und Modifikationen von Signalwegen der Wirtszelle durch *T. gondii* optimale Bedingungen für die intrazelluläre Vermehrung des Parasiten. Während der aktiven Invasion in die Wirtszelle wird durch Invagination der Wirtszellmembran eine PV gebildet, in der die Tachyzoiten sich vermehren (Carruthers, 2002, Carruthers und Sibley, 1997, Sibley, 2003). Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) enthält Poren, die möglicherweise durch

Proteine des Parasiten gebildet werden. Durch diese Poren können polare Moleküle bis zu 1300 Da, inklusive Aminosäuren und Nukleotide, in die PV diffundieren (Schwab et al., 1994). Des Weiteren werden Moleküle des Parasiten in die Vakuolenmembran eingebaut, die eine Rolle in Transportprozessen spielen könnten und auch die Physiologie der Wirtszelle modifizieren könnten (Smith, 1995).

Kurz vor der initialen Penetration der Wirtszelle erfolgt eine massive Sekretion von Rhoptrien und Mikronemen, wobei Proteine und Membranmaterial des Parasiten in die Wirtszelle sezerniert werden. Dieses Material wurde Evakuole genannt, für „empty vacuole“, da sie keine Parasiten enthält (Hakansson et al., 2001; Dubremetz et al., 1993). Die Funktion der Evakuolen ist unbekannt, möglicherweise könnte sie als Vehikel für Effektormoleküle des Parasiten dienen, die zu Beginn der Infektion mit Komponenten der Wirtszelle interagieren (Fouts und Boothroyd, 2007).

Eine Infektion mit *T. gondii* bewirkt ultrastrukturelle Veränderungen innerhalb der Wirtszelle. Diese beinhalten die Umverteilung von Vimentin, Mikrotubuli und Wirtszellorganellen. Das Intermediärfilament Vimentin, das mit dem intrazellulären Transport zwischen Nukleus und Plasmamembran assoziiert wird, tritt in einer infizierten Zelle gehäuft zwischen Wirtszellnukleus und der PVM auf (Halonen und Weidner, 1994). Ähnlich der Verteilung von Vimentin formieren Wirtszellmikrotubuli einen aktiv umgeformten Ring um den Parasiten (Melo et al., 2001). Mikrotubuli sind möglicherweise bedeutend für den Transport von Proteinen des Parasiten in die Wirtszelle und für die Versorgung des Parasiten mit Cholesterol (Sehgal et al., 2005). Eine weitere bedeutende Modifikation der Wirtszellstruktur beinhaltet das Rearrangement von Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (ER). Die PVM und die Evakuole assoziieren mit dem ER und den Mitochondrien der Wirtszelle (Hakansson et al., 2001). Mitochondrien und ER sind beteiligt an der Energiesynthese und Lipidbiosynthese, außerdem werden extrazelluläre Nährstoffe über Vesikel in das ER transportiert. Die enge Assoziation der PV mit Wirtszellorganellen dürfte es dem Parasiten erleichtern, Nährstoffe in die PV zu transferieren. Mitochondrien sind außerdem wichtige Komponenten des apoptotischen Zelltods. Eine Infektion mit *T. gondii* bewahrt die Zelle vor apoptotischen Zelltod nach unterschiedlichen proapoptotischen Stimuli durch die Modulation mehrerer pro-apoptotischer Signalwege (Nash et al., 1998). Die Tatsache, dass bis zu 90% der Wirtszellmitochondrien die PVM flankieren können (Nakaar et al., 2003), würde eine Modulation intrinsischer Apoptosesignalkaskaden durch *T. gondii* erleichtern.

1.1.3.2 Immunabwehr gegen *T. gondii*

Das Immunsystem wird nach Infektion mit *T. gondii* effektiv aktiviert (Alexander und Hunter, 1998; Denkers und Gazzinelli, 1998). *T. gondii* löst CD4⁺- und CD8⁺- T-Zell-Antworten aus,

die von zytoplasmatischem und endozytotischem Transport von Antigenen für die MHC-Klasse I- und II- Präsentation abhängen (Lüder und Seeber, 2001). Wie es zur Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse I-Molekülen für CD8⁺-Zellen kommt, ist nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit besteht darin, dass inaktivierte oder opsonisierte Tachyzoiten phagozytiert werden und durch Verschmelzung von ER-Membran und Phagosom eine MHCI-vermittelte Kreuzpräsentation exogener Antigene an CD8⁺-Zellen erfolgt (Ackerman und Cresswell, 2004). Eine weitere Möglichkeit für die Stimulation der Immunantwort ist, dass Proteine, die *T. gondii* aus der parasitophoren Vakuole in das Wirtszellzytosol sekretiert, von der Wirtszelle für die MHC-Klasse I-abhängige Präsentation für CD8⁺-Zellen prozessiert werden können (Gubbels et al., 2005).

Eine Infektion mit *T. gondii* bewirkt die Induktion von IL-12 in Dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten (Sher et al., 2003). Die Freisetzung von IL-12 führt zur Sekretion von IFN- γ durch Natürliche Killerzellen, durch T_H1-T-Lymphozyten und durch zytolytische CD8⁺-T-Zellen (Denkers et al., 1997, Gazzinelli et al., 1991, Scharon-Kersten et al., 1996, Suzuki et al., 1988). CD8⁺-Zellen können parasit-infizierte Zellen lysieren (Hakim et al., 1991; Subauste et al., 1991). Sie tragen aber vor allem zur Immunabwehr bei, indem sie IFN- γ produzieren (Suzuki und Remington, 1988; Denkers et al., 1997). Durch die Produktion von IL-12 wird die Differenzierung der CD4⁺-Zellen in T_H1- Zellen gefördert (Scott, 1993; Sher et al., 1993). Dennoch kommt es während einer Toxoplasmose zu einer deutlichen Expansion des B-Zell-Kompartiments, diese Zellen produzieren hohe Level an *T. gondii*- spezifischen IgM und IgG, die zur Unterscheidung einer akuten und einer chronischen Infektion herangezogen werden können (Montoya und Liesenfeld, 2004). Antikörper opsonisieren extrazelluläre Parasiten, die daraufhin phagozytiert werden und durch Makrophagen getötet werden (Sibley et al., 1985) oder aktivieren das Komplementsystem und führen zur Lyse der Parasiten.

NK-Zellen werden durch Parasiten-Antigene aktiviert (Hauser et al., 1982; Sharma et al., 1986), produzieren IFN- γ (Cerwenka und Lanier, 2001) und lysieren infizierte Zellen (Subauste et al., 1992). Wie NK-Zellen infizierte Zellen erkennen, ist dabei unklar.

In immunkompetenten Organismen sind die Transkriptlevel der Zytokine IFN- γ , IL-1, IL-6 und TNF- α erhöht (Hunter und Remington, 1994). Dem Zytokin IFN- γ kommt eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr gegen *T. gondii* zu; IFN- γ -produzierende CD8⁺-, CD4⁺- und NK-Zellen stimulieren die anti-parasitäre Aktivität infizierter Makrophagen und anderer Wirtszellen. Durch die Stimulierung von Makrophagen werden die intrazelluläre Vermehrung des Parasiten innerhalb von Makrophagen durch den Abbau von Tryptophan gehemmt (Pfefferkorn et al., 1986) und der Parasitenstoffwechsel durch die Produktion von Stickstoffmonoxid geschädigt (Langermans et al., 1992).

Eine Infektion mit *T. gondii* aktiviert alle vorhandenen Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, der Schwerpunkt der Immunantwort liegt jedoch bei der T_H1-vermittelten Immunantwort. Die Immunantwort reicht allerdings nicht aus, den Parasiten vollständig zu eliminieren, so dass eine Persistenz des Erregers durch die Ausbildung bradyzoitenhaltiger Zysten nicht verhindert wird (Gross, 1994).

1.1.3.3 Immunevasionsmechanismen von *T. gondii*

Die Fähigkeit von *Toxoplasma gondii*, asymptomatische, lang anhaltende Infektionen in etwa 2 Milliarden Menschen hervorzurufen, zeugt vom Erfolg des Parasiten, dem Immunsystem soweit zu entgehen, um im Wirt dauerhaft zu persistieren. Tatsächlich sind zahlreiche Immunevasionsmechanismen des Parasiten beschrieben worden.

Durch die obligat intrazelluläre Vermehrung schützt sich der Parasit weitgehend vor humoralen Abwehrmechanismen (Gross, 1994). Des Weiteren wird durch die Stadienkonversion von den stark proinflammatorisch wirkenden Tachyzoiten zu den persistierenden Zysten mit kaum stoffwechselaktiven Bradyzoiten eine Entzündungsreaktionen im chronischen Stadium vermieden (Gross, 1994). Die Stadienkonversion von schnell replizierenden Tachyzoiten zu Zystenbildenden Bradyzoiten wird von einer grundlegenden Veränderung im Antigen-Expressionsprofil des Parasiten begleitet (Lyons et al., 2002). Antigen shift ist eine weit verbreitete Strategie von mikrobiellen Pathogenen für die Persistenz (Kyes et al., 2001, van der Woude und Baumler, 2004).

Die PVM wird während der Invasion in die Wirtszelle im Bereich von „moving junctions“ an den Kontaktstellen von Parasit und Wirtszelle unter Beteiligung der dichten Granula und der Rhoptrien modifiziert (Mordue et al., 1999; Lingelbach und Joiner, 1998). Der Ausschluß von Membranproteinen der Wirtszelle in der PVM während des Invaginationsprozesses führt zu einer Vakuole, die nicht mit den Lysosomen der Wirtszelle fusioniert, so dass *T. gondii* dem lysosomalen Verdau effektiv entgeht (Joiner et al., 1990; Mordue und Sibley, 1997).

T. gondii vermag sich nicht nur vor den Immunmechanismen des Wirts zu verbergen, der Parasit beeinflusst außerdem physiologische Eigenschaften der Wirtszelle. Die T-Zell-vermittelte Immunität beruht auf der Präsentation von Antigenen im Kontext von MHC-I- und MHC-II-Molekülen. *T. gondii* ist in der Lage, die Expression von MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche von murinen Makrophagen deutlich zu inhibieren (Lüder et al., 1998; 2001; Lang et al., 2006).

Des Weiteren werden unreife Dendritische Zellen durch eine Infektion mit *T. gondii* funktionell inaktiviert und sind unfähig, TNF- α oder IL-12 nach LPS-Stimulation zu sekretieren oder naive CD4+-Lymphozyten zu aktivieren (McKee et al., 2004).

In aktivierten Makrophagen ist die Produktion von Stickstoffmonoxid ein wichtiger Mechanismus, intrazelluläre Erreger in Makrophagen abzutöten. Durch den Einfluss von *T. gondii* ist die Aktivität der NO-Synthase (NOS) reduziert, bedingt durch die Herunterregulation der induzierbaren (i)NOS. Eine Abnahme der Produktion von NO begünstigt dabei das intrazelluläre Überleben des Parasiten (Lüder et al., 2003).

NF- κ B und MAP-Kinasekaskaden spielen zudem eine wichtige Rolle in der Immunität des Wirtes, in der Induktion von TNF- α , IL-12 und anderen Mediatoren, die während einer *Toxoplasma*-Infektion unterdrückt werden. Beide Signalwege sind Ziele der Modifikation durch *T. gondii*.

Auch die Apoptose als Form des programmierten Zelltods ist ein wichtiger Effektormechanismus des Immunsystems, um der Vermehrung intrazellulärer Pathogene entgegenzuwirken (siehe 1.2.1). Dabei kann die Apoptose durch unterschiedliche Wege induziert werden. *T. gondii* ist in der Lage, jeden Apoptosesignalweg zu inhibieren, wodurch ein Überleben in der Wirtszelle erleichtert wird (siehe 1.2.3).

1.2 Apoptose

1.2.1 Bedeutung des programmierten Zelltods innerhalb des Organismus und für das Immunsystem

Apoptose ist neben Autophagy, Pyroptose und Oncose eine Form des programmierten Zelltods. Bei dem apoptotischen Zelltod wird im Gegensatz zur Nekrose der Inhalt der Zelle durch einen aktiv gesteuerten Prozeß abgebaut, während die Zellmembran weiterhin intakt bleibt. Ein Auslaufen von zellulären Komponenten mit einer darauffolgenden Entzündungsreaktion wird dadurch verhindert. Morphologische Charakteristika der Apoptose sind die starke Reduktion des Cytoplasmas und die Kondensation des Chromatins (Ahrends und Wyllie, 1991; Kerr et al, 1972), die Clusterbildung von Zellorganellen, eine kristalline Anordnung von Ribosomen und eine Bildung von ER-abgeleiteten Vakuolen (Clarke 1990; Wyllie, 1985). Der kondensierte Nukleus und degradierte Zellinhalte werden in membranumschlossene, sogenannte apoptotische Vesikel abgeschnürt (Ahrends und Wyllie, 1991; Kerr et al, 1972), die Phosphatidyl auf der Membranoberfläche exponieren. Dieses stellt ein sehr effektives Phagozytosesignal für Makrophagen dar, die apoptotische Vesikel aufnehmen und gewebeschonend entsorgen (Savill et al., 1993 und 1990).

Die Apoptose als Form des programmierten Zelltods ist essentiell für die Entwicklung von mehrzelligen Organismen. Sie ist auch für die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase in Mehrzellern verantwortlich (Vaux und Korsmeyer, 1999), z.B. für den Abbau von

Granulozyten und Neutrophilen im Blut, die stetig im Knochenmark neu gebildet werden. Die Apoptose ist außerdem von zentraler Bedeutung für das Immunsystem. Zum einen können Abweichungen von Gensequenzen, die für pro- und anti-apoptotische Proteine kodieren, zu einer fehlerhaften Regulation der T- und B-Zell-Entwicklung führen und dadurch schwerwiegende Erkrankungen wie Immundefizienz, Autoimmunität und Krebs initiieren (Thompson, 1995). Zum anderen ist die Apoptose ein wichtiger Mechanismus zur Eliminierung von entarteten Zellen oder von intrazellulären Pathogenen. Zytotoxische CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen erkennen infizierte Zellen und induzieren die Apoptose durch die gezielte Freisetzung von Perforin und Granzym B, oder sie binden an Oberflächenrezeptoren der Tumornekrosefamilie und lösen dadurch die rezeptorvermittelte Apoptosesignalkaskade aus. Unabhängig von Zellen des Immunsystems können aber auch intrazelluläre Stresssignale in jeglichen infizierten Zellen die Apoptose nach Infektion mit intrazellulären Pathogenen auslösen (Weinrauch und Zychlinsky, 1999; Shen und Shenk, 1995; DosReis und Barcinski, 2001; James und Green, 2004). Durch Apoptose Pathogen-infizierter Zellen wird die Vermehrung vieler obligat intrazellulärer Krankheitserreger verhindert, außerdem werden Pathogene durch Phagozytose apoptotischer Zellen von Makrophagen eliminiert und durch Präsentation von Antigenen die zelluläre Immunantwort stimuliert. Somit ist der apoptotische Zelltod ein wichtiger Mechanismus für die angeborene und adaptive Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern (Williams 1994).

1.2.2 Signalkaskaden des rezeptorvermittelten und des mitochondrialen Apoptosewegs

Es werden drei klassische Signalkaskaden unterschieden, die Apoptose einer Zelle auslösen: den rezeptorvermittelten oder extrinsischen Apoptosesignalweg, den mitochondrialen oder intrinsischen Apoptosesignalweg und den Perforin/Granzym B-vermittelten Apoptoseweg. Innerhalb der Apoptosesignaltransduktion sind die Cystein-Proteasen mit einer Spezifität für Aspartatreste, den sogenannten Caspasen, von zentraler Bedeutung (Martins und Earnshaw, 1997; Alnemri et al., 1996). Initiatorcaspasen sind durch eine N-terminale Pro-Domäne gekennzeichnet, die mit bestimmten Adapterproteinen interagiert und dadurch die Clusterbildung mehrerer Initiatorcaspasen verursacht (Kumar und Colussi, 1999). Durch die Akkumulation werden die Initiatorcaspasen autokatalytisch in aktive Untereinheiten gespalten (Earnshaw et al., 1999; Nicolson, 1999). Diese aktivieren anschließend die Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung nach Aspartatresten und amplifizieren dadurch das proapoptotische Signal. Eine Verhinderung der Apoptose nach Aktivierung der Effektorcaspasen ist nicht mehr möglich.

Extrinsischer Apoptosesignalweg

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch Bindung von Liganden (Fas/CD95-Ligand aktivierter T-Lymphozyten oder Natürlicher Killerzellen, TNF- α) an Rezeptoren der TNF-Superfamilie aktiviert (Abb. 1). Durch Aggregation mehrerer Rezeptoren binden unterschiedliche Adapterproteine an die Domäne an der Membraninnenseite des Rezeptors und bilden den Death-Inducing-Signalling-Complex (DISC)-Komplex (Kischkel et al., 1995), der die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 auslöst. Nach autokatalytischer Spaltung der Caspase 8 spalten deren aktive Untereinheiten die Effektorcaspasen 3, -6 und -7. Nach Spaltung der inaktiven Proformen in aktive Untereinheiten spalten die aktivierten Effektorcaspasen 3, -6 und -7 Strukturproteine der Zelle und initiieren die Fragmentierung des Nukleus. In sogenannten Typ I-Zellen werden bei der Formierung des DISC große Mengen an Caspase 8 aktiviert, gefolgt von einer direkten Spaltung der Effektorcaspase 3/7 (Scaffidi et al., 1998). In Typ II-Zellen reichen die Mengen aktiver Caspase 8 allein jedoch nicht aus, um die Effektorcaspasen effektiv zu aktivieren. Die Caspase-Kaskade ist daher von der Amplifikation durch den mitochondrialen Weg der Apoptosesignalkaskade abhängig. Die Caspase 8 spaltet dabei das BH3-only Protein Bid, das den mitochondrialen Apoptoseweg über die Regulation von Proteinen der Bcl-2-Familie aktiviert (Luo et al., 1998; Li et al., 1998).

Intrinsischer Apoptosesignalweg

Der intrinsische oder auch mitochondriale Apoptosesignalweg wird neben zellulärem Stress durch intrazelluläre Pathogene u.a. auch durch irreparable DNA-Schädigung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Toxine ausgelöst (Hasnain et al., 2003; Hung und Chow, 2004; Spierings et al., 2005). Dabei führen unterschiedliche Signalwege wie der Akt/PkB-Signalweg, der Jun-Kinase-Signalweg und die Aktivierung von p53 oder ERK zu der Aktivierung von BH3-only Proteinen (Abb. 1). Es sind mindestens 8 BH3-only Proteine bekannt, die durch unterschiedliche Regulation wie Phosphorylierung, transkriptionelle Regulierung, Freisetzung vom Cytoskelett oder noch unbekannte Regulationsmechanismen aktiviert werden. Die BH3-only Proteine Bim, Puma, Bad, Noxa, Bmf, Bid, Bik und Hrk bilden eine strukturelle und funktionale Untergruppe der Bcl-2-Proteinfamilie. Von den vier alpha-

Abb.1: Signaltransduktion des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweges. Die Ligation von Rezeptoren der TNF-Familie führt über die Bildung des Death-Inducing-Signaling-Complex (DISC) zur Aktivierung der Initiatorcaspase 8, die direkt Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert (Typ I-Zellen) oder zusätzlich durch Spaltung von Bid die mitochondriale Amplifikationschleife aktiviert (Typ II-Zellen). Intrinsische Stresssignale aktivieren BH3-only Proteine, die durch Interaktion mit anti-apoptotischen BH4-Proteinen Bax und Bak aktivieren. Bax und Bak bilden poren-ähnliche Oligomere in der äußeren Mitochondrienmembran, die die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol bewirken. Cytochrom c bildet mit APAF-1, ATP und Initiatorcaspase 9 das Apoptosom, woraufhin Caspase 9 aktiviert wird. Aktive Caspase 9 aktiviert Effektorcaspasen, die eine Spaltung von Strukturproteinen und die Fragmentierung der DNA vermitteln.

helikalen Bcl-2-Homologie-Domänen besitzen die BH3-only Proteine lediglich die BH3-Domäne, die die Interaktion mit anderen Bcl-2-Proteinen vermittelt. BH3-only Proteine aktivieren die Multidomänenproteine Bak und Bax, die die Bcl-2-Homologie-Domänen 1-3 besitzen (Boullet und Strasser, 2002; Puthalakh und Strasser, 2002; Willis und Adams, 2005; Labi et al., 2006).

Sämtliche proapoptotischen Signale innerhalb des mitochondrialen Apoptosesignalweges konvergieren bei der Aktivierung von Bax und Bak, die damit einen obligaten Engpaß der Apoptosesignalkaskade darstellen. Bax und Bak können die Funktion des jeweils anderen ersetzen, mindestens ein Multidomänenprotein ist allerdings essentiell für die Weiterleitung der Apoptosesignalkaskade (Wei et al., 2001). Ein drittes Multidomänenprotein, Bok, wird nur begrenzt exprimiert und wurde bisher nicht intensiv untersucht (Inohara et al., 1998; Häcker und Weber, 2006).

Bax und Bak werden in vitalen Zellen durch die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-x_L, Bcl-w und Bcl-x_L gehemmt. Diese sind durch Sequenzhomologie in vier alpha-helikalen Domänen gekennzeichnet, die BH1-4 genannt wurden. Die Struktur der Domänen BH1-3 bildet eine Tasche, die an die BH3-Domänen anderer Bcl-2-Proteine binden (Gross et al., 1999). Die BH4-Proteine sind Inhibitoren der Apoptose, da sie nicht nur Bax und Bak, sondern auch pro-apoptotische BH3-Proteine binden und dadurch inaktivieren. So führt die Überexpression von Bcl-2 zu einer Resistenz gegen apoptotische Stimuli (Takahashi et al., 1999; Métrailler-Ruchonnet et al., 2007).

Bak ist mit der Mitochondrienmembran assoziiert, während Bax vorwiegend im Cytosol lokalisiert ist (Willis et al., 2005; Suzuki et al., 2000). Nach pro-apoptotischen Stimuli aktivieren BH3-only Proteine Bax und Bak direkt oder über die Inaktivierung von BH4-Proteinen (Huang und Strasser, 2000; Bouillet und Strasser, 2002; Puthalakh und Strasser, 2002). Bei ihrer Aktivierung durchlaufen Bax und Bak eine Konformationsänderung, die eine Translokation von Bax zu den Mitochondrien vermittelt (Gross et al., 1998; Eskes et al., 2000) und die Oligomerisierung von Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran bewirkt (Wei et al., 2000; Desagher et al., 1999; Antonsson et al., 2001). Dadurch entstehen Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren wie Smac/Diablo und AIF aus dem Intermembranraum der Mitochondrien führen (Reed, 1998).

Cytosolisches Cytochrom c lagert sich mit der Procaspase 9, dem Apoptotischen Protease Aktivierenden Faktor 1 (APAF-1) und Adenosintriphosphat (ATP) zu dem sogenannten Apoptosom zusammen (Li et al., 1997; Rodriguez und Lazebnik, 1999). Durch Dimerisierung der Caspase 9 wird diese autokatalytisch prozessiert, wobei von der Procaspase eine aktive Untereinheit abgespalten wird (Srinivasula et al., 1998). Die aktive Caspase 9-Untereinheit aktiviert die Effektorcaspasen 3 und -7, die eine weitreichende Proteolyse von

regulatorischen und strukturellen Zielproteinen initiieren und die DNase CAD/DFF40 aktivieren, die für die Spaltung des Chromatins verantwortlich ist (Enari et al., 1998; Slee et al., 1999; Thornberry und Lazebnik 1998).

1.2.3 Inhibierung der Apoptose durch *T. gondii*

Die Apoptose von infizierten Zellen ist ein wichtiger Abwehrmechanismus von Organismen gegen intrazelluläre Pathogene (siehe 1.2.1). Zahlreiche Parasiten (Schaumburg et al., 2006), Bakterien (Häcker, 2002) und Viren (Benedict et al., 2002) haben daher Mechanismen entwickelt, die Apoptose der Wirtszelle zu inhibieren. *T. gondii* ist in der Lage, die Apoptose seiner Wirtszelle nach unterschiedlichen pro-apoptotischen Stimuli zu inhibieren (Nash et al., 1998; Goebel et al., 1998, 2001; Payne et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* mit der Aktivierung der Caspase-Kaskade interferiert (Goebel et al., 2001, Payne et al., 2003). Die Hemmung der Caspase-Kaskade geht mit einer Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in *T. gondii*-infizierten Zellen einher (Goebel et al., 2001). Auch wurden erhöhte Proteinlevel der anti-apoptotischen Proteine A1 und Mcl-1 in bestimmten Zelltypen beschrieben (Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003), die eine reduzierte Aktivität von Bax, Bak und Bok für die Cytochrom c-Freisetzung zur Folge haben könnten (Adams und Cory 1998; Kaufmann und Hengartner 2001), allerdings wurde die funktionelle Bedeutung dieser Wirtszellmodifikation nicht weitergehend untersucht.

Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch *T. gondii* wurde von einer Arbeitsgruppe als notwendig für die Apoptosehemmung beschrieben (Payne et al., 2003), konnte jedoch von anderen Gruppen nicht bestätigt werden (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2002). Somit bleibt eine Aktivierung von NF- κ B und die Hochregulation von Bcl-2-Proteinen und IAPs für die Inhibierung der Apoptose durch *Toxoplasma* fraglich (Goebel et al., 2001; Shapira et al., 2002). Die Inhibierung der Apoptose wurde außerdem mit der Aktivierung der PI3-Kinase assoziiert, die die Aktivierung der Akt/PkB-, ERK1/2 und p38 MAP-Kinase-Signalwege bedingt (Kim und Denkers, 2006). Eine Modulation von Apoptosesignalkaskaden oberhalb der Mitochondrien durch *T. gondii* wurde demnach durch verschiedene Arbeitsgruppen erwiesen, jedoch konnte nicht detailliert geklärt werden, wie *T. gondii* mit Apoptose-regulierenden Signalkaskaden seiner Wirtszelle interferiert. Für die Apoptose-Signalkaskade unterhalb der Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* mit der Apoptosombildung interferiert, was in einer Hemmung der Caspase 9-Aktivierung resultierte (Keller et al., 2006; Schaumburg und Lüder, nicht veröffentlichte Daten).

Kürzlich wurde des Weiteren nachgewiesen, dass *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ I-SKW6.4-Zellen hemmen kann. Es wurde gezeigt, dass *T. gondii* die

Aktivierung der Caspase 8 verhindert und außerdem eine Degradierung der Initiatorcaspase 8 bewirkt. Dies wurde durch eine alternative Spaltung der Caspase 8 in *T. gondii*-infizierten Zellen erklärt (Vutova et al., 2006). Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass die Modulation von Apoptosesignalkaskaden durch *T. gondii* ein multifaktorieller Prozeß ist.

1.3 Ziel der Arbeit

Die letzten Jahre haben bedeutende Fortschritte in der Aufklärung Apoptose-regulierender Signalwege hervorgebracht (Hengartner, 2000). Durch Behandlung mit synthetischen Peptiden oder chemischen Agenzien ist es teilweise gelungen, gezielt in Zellen Apoptose zu induzieren, in denen Apoptosesignalkaskaden blockiert waren (Oltsdorf et al., 2005; Huang und Sinicrope, 2008). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die *T. gondii* die Apoptose seiner Wirtszelle inhibiert, könnte daher dazu beitragen, Therapien zu entwickeln, die eine ungehinderte intrazelluläre Vermehrung der Parasiten verhindern würde.

Ziele dieser Arbeit waren, die molekularen Mechanismen der Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii* genauer zu charakterisieren. Es sollte untersucht werden, ob *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen inhibieren kann, die sich in der Signaltransduktion nach Fas/CD95-Stimulierung von Typ I-Zellen deutlich unterscheiden (siehe 1.2.2). So sollte geklärt werden, ob in Typ II-Zellen die gleichen Mechanismen zur Hemmung der Wirtszellapoptose führen wie in Typ I-Zellen oder ob möglicherweise unterschiedliche Mechanismen eine Apoptoseinhibierung bedingen könnten.

Bisherige Studien zu den Inhibierungsmechanismen von *T. gondii* innerhalb des intrinsischen Apoptosesignalweges wurden mit pro-apoptotischen Stimuli durchgeführt, die innerhalb der Signalkaskaden relativ unspezifisch und weit upstream der Bcl-2-Proteinfamilie die Apoptose induzierten. Dies führte dazu, dass lediglich Konsens darüber erzielt wurde, dass *Toxoplasma* oberhalb der Freisetzung von Cytochrom c mit der intrinsischen Apoptosesignalkaskade der Wirtszelle interferiert. Der molekulare Mechanismus der Apoptosehemmung durch *T. gondii* sollte in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden. Dazu wurden unter anderem transfizierte Zellen verwendet, in denen die Apoptose gezielt auf der Ebene der BH3-only Proteine induziert wurde. Es sollte untersucht werden, ob eine Interferenz von *T. gondii* mit der Bcl-2-Proteinfamilie für die Apoptosehemmung verantwortlich ist. Neben der genaueren Aufklärung der Modulation innerhalb der Signalkaskaden der Wirtszelle sollten außerdem die Voraussetzungen von *T. gondii* für die Apoptoseinhibierung charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Zellen

Murine L929-Fibroblasten

Humane Jurkat T-Lymphomzellen

Humane HeLa-Zervikalkarzinomzellen

Fas/CD95-transfizierte HeLa-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Wajant, Würzburg)

BimS-transfizierte HeLa-Zellen, Klon A2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Häcker, München)

Toxoplasma gondii, maus-avirulenter Stamm NTE

Escherichia coli, Stamm DH5 α , Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.2 Medien und Additive

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die Zellkulturmedien, Zellkultur-Reagenzien und Additive von Biochrom (Berlin).

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

Instantpulver (Instamed T 121-10) mit 300 mg/l L-Glutamin, ergänzt mit 2000 mg/l NaHCO₃, eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert

DMEM (Dulbecco's MEM)

Instantpulver (Instamed T 043-10) mit 4,5 g/l Glucose, 580 mg/l L-Glutamin, ergänzt mit 3700 mg/l NaCO₃, eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert

Medienzusätze

Penicillin/Streptomycin, 10000 U/10000 μ g/ml

EDTA, 1%

Trypsin, 0.25%

HEPES, 1M

Natriumpyruvat, 100 mM

Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x

FCS (Fötales Kälberserum)

Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS), Instamed 9.55 g/l

Bestimmung der Zellvitalität

Trypanblau, 0.5% in PBS

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper:

Agonistischer anti-human Fas/CD95 IgM Antikörper, Klon CH11; Upstate Biotechnology, New York, USA

Maus mAk IgG₁ anti-Caspase 8, Klon 1C12; spezifisch für ein Epitop innerhalb des p18-Fragments, Cell Signaling Technology, Beverly, USA

Maus mAk IgG_{2b} anti-Caspase 8, Klon 12F5, spezifisch für ein Epitop innerhalb des p18-Fragments, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I. Schmitz (Düsseldorf; Wesselborg et. al, 1999)

Kaninchen pAk Ig anti-Caspase 9, gegen das p35-Fragment gerichtet, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Ziege pAk Ig anti-Caspase 3, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Kaninchen pAk Ig anti-Bid, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG anti-Aktin, Klon C4; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Lessard, Cincinnati, USA

Maus mAk IgG_{2b} anti humanes Cytochrom c, Klon 7H8.2C12, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti-humanes Cytochrom c, Klon 6H2.B4, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG_{2a} anti-bovine Cytochrom c-Oxidase (COX), Untereinheit IV, Klon 20E8-C12, Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Maus mAk IgG₁ anti humanes Bax, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti humanes Bax, Klon 6A7, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti humanes Bak, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG_{2a} anti-humanes Bak, Calbiochem, Darmstadt

Kaninchen pAk Ig anti humanes Bim, BD Pharmingen, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti-human Phospho-Bad, Klon 7E11, Cell Signaling, Boston, MA, USA

Kaninchen pAk IgG anti-humanes Bad, Cell Signaling, Boston, MA, USA

Kaninchen pAk IgG anti-human Bmf, Cell Signaling, Boston, MA, USA

Kaninchen pAk IgG anti-human Bok, Cell Signaling, Boston, MA, USA

Kaninchen pAk IgG anti-human Puma, Cell Signaling, Boston, MA, USA

Kaninchen pAk IgG anti-human Mcl-1, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti-human Bcl-2, Klon 4D7, BD Pharmingen, Heidelberg

Kaninchen pAk IgG anti-A1/Bfl-1, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Maus mAk IgG₁ anti-Bcl-x, BD Pharmingen, Heidelberg

Kaninchen Ig anti-*Toxoplasma*-Serum, Eigenherstellung

Maus Ig anti-*Toxoplasma*-Serum, Eigenherstellung

Sekundärantikörper und Konjugate:

Alle Sekundärantikörper und Konjugate wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

Cy2-konjugiertes F(ab')₂ Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)

Cy3-konjugiertes F(ab')₂ Fragment Esel anti-Maus IgG (H+L)

Cy5-konjugiertes F(ab')₂ Fragment Esel anti-Maus IgG (H+L)

Meerettich-Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)

Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel anti-Ziege IgG (H+L)

Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)

Phycoerythrin (PE)- konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)

Phycoerythrin (PE)- konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Sigma, München bezogen.

human Bax forward: 5'-CCCAAGCTTCGATGGACGGGTCCGGGGAG-3'

human Bax reverse: 5'-GGAATTCAGCCCATCTTCTTCCAGATG-3'

human IL-2 forward: 5'-CTCTGGAGGAAGTGCTAAA-3'

human IL-2 reverse: 5'-TTGGGATAAATAAGTGAAACC-3'

human β-Aktin forward: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

human β-Aktin reverse: 5'-TTGGGATAAATAAGTGAAACC-3'

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

DNA-Molekulargewichtsmarker:

100 bp-DNA Leiter: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 kb; MBI

Fermentas, St. Leon-Rot

1 kb-DNA-Leiter: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 6000, 8000,

10000 kb; MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Protein-Molekulargewichtsmarker:

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

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Standardchemikalien und -reagenzien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim) oder Sigma (München).

Ac-IETC- amino-4-methyl-coumarin (Ac-IETC-AMC), Caspase 8-spezifisch, Alexis, Grünberg
Ac-LEHD- amino-4-methyl-coumarin (Ac-LEHD-AMC), Caspase 9-spezifisch, Bachem, Heidelberg

Ac-DEVD- amino-4-methyl-coumarin (Ac-DEVD-AMC), Caspase 3/7-spezifisch, Bachem, Heidelberg

Hoechst-Farbstoff 33258, Sigma, München

Propidiumiodid, Sigma, München

Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat), Pierce, Rockford, IL, USA

Mowiol, Calbiochem, München

Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt

Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma, München

Phytohämagglutinin, Sigma, München

Protease Inhibitor Cocktail, Complete Mini EDTA-free, Roche, Mannheim

2.1.5.1 Antibiotika und Selektionsreagenzien

Blasticidin, Invitrogen, Karlsruhe

Zeocin, Invitrogen, Karlsruhe

Kanamycin, Sigma, München

Penicillin/Streptomycin (siehe Zellkultur), Biochrom, Berlin

Tetrazyklin, Sigma, München

2.1.5.2 Inhibitoren

Caspase 9-Inhibitor z-LEHD-FMK, BD Pharmingen, Heidelberg

Genereller Caspase-Inhibitor z-VAD-FMK, BD Pharmingen, Heidelberg

Actinomycin D (*Streptomyces sp.*), Calbiochem, Darmstadt

Staurosporin, Sigma, München

Cycloheximid, Sigma, München
Cytochalasin D, Sigma, München
Wortmannin, Calbiochem, Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail, Mini EDTA-free, Roche, Mannheim
RNase Inhibitor, Sigma, München

2.1.6 Enzyme

Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus*, Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI, New England Biolabs, Frankfurt
Deoxyribonuklease I, Sigma, München
RNase A, Sigma, München

2.1.7 Kits

RNA-Isolierung: GenElute Mammalian Total RNA Kit, Sigma, München
Reverse Transkription: Omniscript reverse transcriptase, Qiagen, Hilden
Plasmidpräparation: GenElute Plasmid Miniprep Kit, Sigma, München
Transfektion: FuGene HD Transfection Reagent, Roche, Mannheim
Mycoplasmentest: VenorGem, Mycoplasma PCR detection kit, Minerva Biolabs, Berlin
TUNEL-Test: In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche, Braunschweig

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Materialien für die Zellkultur wurden von Nunc (Wiesbaden), Falcon (Heidelberg), Corning Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhäusen) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.9 Geräte

Leica TCS SP2 konfokales Laserscanmikroskop, Leica, Heidelberg
Victor Multilabel Counter, Perkin Elmer, Boston, USA
FACS-Calibur, BD Biosciences, Heidelberg
Thermocycler, Modell T3, Biometra, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Laminar-Flow-Sicherheitswerkbänken unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank inkubiert. Permanente Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontaminationen mit Mycoplasmen durch PCR entsprechend der Angabe des Herstellers (VenorGeM, Minerva Biolabs) untersucht und waren stets kontaminationsfrei.

2.2.1.1 Kultur und Isolierung von *Toxoplasma gondii*

Für sämtliche Untersuchungen wurde der Maus-avirulente Stamm NTE (Gross et al., 1991) verwendet. Die Toxoplasmen wurden als Tachyzoiten kultiviert, als Nährmedium diente RPMI 1640-Medium mit 1% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultur erfolgte in 12-Lochplatten, in die in unterschiedlichen Verhältnissen L929-Zellsuspension (3-5 Tropfen) und Toxoplasmensuspension (2-6 Tropfen) getropft wurden. Die Vertiefungen der Platte wurden mit 1,5 ml Medium aufgefüllt. Die Wirtszellen und Toxoplasmen wurden so lange inkubiert, bis die Mehrzahl der L929-Zellen lysiert waren, die Toxoplasmen aber noch ihre bogenförmige Gestalt besaßen. Dann wurden die Toxoplasmen durch Resuspendierung und Aufnahme mit einer Pipette isoliert. Für Infektionsversuche wurden in der Regel Toxoplasmen verwendet, die für zehn Tage mit frischen L929-Zellen kokultiviert worden waren. Zur Isolierung der Toxoplasmen wurden die L929-Zellen durch Zentrifugation bei 35 x g für 5 min sedimentiert und der Toxoplasmen-haltige Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die Toxoplasmen wurden danach zweimal bei 1300 x g für 10 min zentrifugiert und in Nährmedium gewaschen. Anschließend wurden sie in 2-5 ml Jurkat- bzw. HeLa-Fas- oder HeLa-WT- Medium aufgenommen und die Anzahl der isolierten Toxoplasmen mit einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Die Menge der isolierten Parasiten wurde durch Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl pro Großquadrat mit dem Suspensionsvolumen, dem Verdünnungsfaktor und der Konstanten 10⁴ berechnet.

2.2.1.2 Kultivierung von Wirtszellen

2.2.1.2.1 L929

Die Mausfibroblasten dienten als Wirtszellen für die Passagierung der Toxoplasmen. L929-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit 5 ml DMEM-Medium mit 1% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 x nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert.

Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit einem Zellkulturspatel vom Boden der Lochplatte gelöst und in Medium resuspendiert. In jeder Vertiefung der 6-Lochplatte wurden 6-8 Tropfen der Zellsuspension mit frischem Medium gemischt. Die übrige Zellsuspension wurde für die Kokultur mit Toxoplasmen verwendet (siehe oben).

2.2.1.2.2 HeLa-Fas

Fas/CD95-transfizierte HeLa-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde das Medium zunächst aus der Zellkulturflasche entfernt, die Zellen mit EDTA gespült und anschließend mit Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400 x g für 5 min sedimentiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 ausgesät.

2.2.1.2.3 Jurkat/ Jurkat-JMR/ Jurkat-F9

Jurkat-T-Zellen wurden wie HeLa-Fas-Zellen in 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zur Passagierung dieser Suspensionszellen wurden vier Fünftel der Zellsuspension abgenommen und die Zellkulturflasche mit frischem Medium auf das vorherige Volumen aufgefüllt. Die Zellen wurden 2-3 Mal pro Woche subkultiviert.

2.2.1.2.4 HeLa-WT-Zellen

HeLa-WT-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1% Natriumpyruvat und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 subkultiviert. Die Zellen wurden dazu durch EDTA/Trypsin-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, durch Zentrifugation bei 400 x g für 5 min sedimentiert und nach Resuspension in frischem Kulturmedium erneut ausgesät.

2.2.1.2.5 HeLa-BimS-Zellen

BimS-transfizierte HeLa-Zellen wurden in HeLa-WT-Medium mit 125 µg/ml Zeocin und 5 µg/ml Blastocidin zur Selektion transgener Zellen kultiviert. Die Zellen wurden mit EDTA und Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, bei 400 x g für 5 min sedimentiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und je nach Dichte der Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 erneut ausgesät. Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren und Auftauen von Zellen erfolgte nach der von Peters und Baumgarten (1990) sowie von Lindl und Bauer (1994) beschriebenen Methode. Die einzufrierenden Zellen sollten

sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine möglichst hohe Vitalität besitzen. Nach Isolierung der Zellen aus der Zellkulturflasche wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Zahl der vitalen Zellen bestimmt und mit dem entsprechenden Kulturmedium auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Das Einfriermedium, das sich aus 40% des Zellkulturmediums, 40% hitzeinaktiviertem FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammensetzte, wurde in gleichem Volumen der Zellsuspension zugesetzt und das Gemisch in Kryoröhrchen überführt. Um den toxischen Effekt des DMSO auf stoffwechselaktive Zellen zu reduzieren, wurden sie sofort eingefroren. Für ein schonendes Einfrieren wurden die Kryoröhrchen zunächst über Nacht bei -80°C im Styroporblock gelagert und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zellen wurden möglichst rasch aufgetaut, um die schädigende Wirkung des DMSO zu minimieren. Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension am Rand des Kryoröhrchens so weit aufgetaut war, dass sich die Zellsuspension aus dem Kryoröhrchen lösen ließ. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die Röhrchen unter der Sterilbank außen mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Inhalt des Röhrchens wurde in 40 ml Zellkulturmedium überführt und bei $400 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und ausgesät.

2.2.1.4 Aussäen der Wirtszellen und Infektion mit *T. gondii*

Für Versuche wurden die Jurkat-Zellen durch Resuspendierung, HeLa-Zellen und die daraus abgeleiteten Transfektanten durch Behandlung mit EDTA und Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und bei $400 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, die Anzahl der vitalen Zellen nach Trypanblaufärbung mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die benötigte Zellzahl ausgesät.

Für FACS-Analysen, Caspaseaktivitätstests, sowie für RNA- und Gesamtproteinisolierungen wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Für Fraktionierungen in mitochondriale und cytosolische Extrakte wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Zellkulturschalen ($\varnothing = 9$ cm) ausgesät. Für Immunpräzipitationen wurden jeweils 1×10^7 Zellen eingesetzt. Immunfluoreszenztests wurde in Platten mit 24 Vertiefungen angesetzt, in denen jeweils 1×10^5 HeLa-WT-, HeLa-Fas-Zellen oder $1,2 \times 10^5$ HeLa-BimS-Zellen auf Glasplättchen ($\varnothing = 13$ mm) ausgesät wurden.

Nach 24 Stunden, in denen die Zellen am Boden der Zellkulturplatten adhärirten und sich etwa einmal teilten, wurden HeLa-WT-Zellen und die daraus abgeleiteten Transfektanten im Parasit-

Wirtszellverhältnis 10:1 und 20:1 infiziert. Jurkat-Suspensionszellen benötigten eine höhere Infektionsdosis von 30:1, um eine effiziente Infektionsrate zu erreichen. Die Isolierung der Toxoplasmen erfolgte entsprechend 2.2.1. Für jeden Versuch wurden nicht-infizierte Zellen parallel mit infizierten Proben inkubiert.

2.2.2 Herstellung von Bax-YFP-exprimierenden Zellen

2.2.2.1 Transformation von *E. coli*

Zur Vermehrung von Bax-pEYFP-C1-Plasmid-DNA (Dr. Lying Zhou, Hongkong) wurde *E. coli* transformiert. Einhundert µl Zellsuspension des *E. coli* Stammes DH5α wurden für 5 min auf Eis aufgetaut. Ein halber µl DNA (200-330 ng/µl), entsprechend 100-165 ng DNA, wurde mit den kompetenten Zellen vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension für 90 sec bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt, dann mit 500 µl Luria Broth (LB)-Medium versetzt und für 2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf Petrischalen mit LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert, die über Nacht umgekehrt bei 37°C inkubiert wurden. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin über Nacht angezogen.

LB-Medium

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Trypton

5 g/l NaCl

LB-Agar

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Trypton

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

2.2.2.2 Plasmidisolierung

2.2.2.2.1 Plasmidisolierung mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit

Zur Überprüfung der Transformanten wurden Plasmide mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Zwei ml aus einer *E. coli*-Vorkultur wurden bei 12000 x g und RT für 1 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das

Bakterienpellet wurde dann in 200 µl Resuspensionslösung mit RNase A homogenisiert. Der Zellsuspension wurden 200 µl Lysierungslösung zugegeben und das Reaktionsgefäß 6-8 Mal invertiert, bis die Lösung klar wurde. Zelltrümmer, Proteine, Lipide, SDS und genomische DNA wurden durch Zugabe von 350 µl Neutralisierungslösung gefällt und durch Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min pelletiert. Für die Vorbereitung der Bindungssäule im Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 500 µl Säulen-Präparations-Lösung auf jede Miniprep-Säule gegeben, bei 12000 x g und RT für 1 min zentrifugiert und anschließend verworfen. Das Bakterienlysate wurde nun auf die Säule gegeben und bei 12000 x g für 1 min zentrifugiert. Danach wurden 750 µl Waschlösung, der zuvor Ethanol hinzugefügt worden war, auf die Säule gegeben und bei 12000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde erneut für 2 min zentrifugiert, um den Ethanol vollständig von der Säule zu entfernen. Nachdem die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt worden war, wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl Elutionslösung und Zentrifugation bei 12000 x g für 1 min eluiert und anschließend bei -20°C gelagert. Die Konzentration und die Reinheit des Plasmids wurden durch spektrophotometrische Analyse bestimmt. Von positiven Klonen wurde aus dem restlichen Volumen der Vorkultur ein Glycerinstock aus 500 µl Vorkultur und 500 µl Glycerin angesetzt, der bei -80°C gelagert wurde.

2.2.2.2.2 Plasmidisolierung ohne Kit

Um für die Transfektion von HeLa-Zellen ausreichende Mengen an Bax-pEYFP-C1 zu isolieren, wurde aus 1 ml der ersten *E. coli*-Vorkultur eine zweite ÜN-Kultur mit 300 ml Volumen in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angesetzt. Nachdem die Bakterien eine entsprechende Dichte in der Kultur erreicht hatten, wurden sie bei 4000 x g für 15 min pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer 1 (siehe unten) resuspendiert. Puffer 1 war zuvor 1 µg/ml RNase frisch zugegeben worden. Nach gleichmäßiger Suspension der Kultur in Puffer 1 wurde für die alkalische Lyse der Bakterien und zur Denaturierung von DNA und Proteinen 10 ml Puffer 2 dazugegeben und das Zentrifugenröhrchen bis zu 5 min mehrfach vorsichtig invertiert. Fünf min wurden dabei nicht überschritten, um eine spätere Kontamination der Plasmid-DNA mit genomischer DNA zu vermeiden. Zum Ausfällen von SDS, Proteinen und genomischer DNA wurden 10 ml Puffer 3 zugegeben und wieder vorsichtig invertiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde nun für 15 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 30 ml Isopropanol versetzt, intensiv gevortext und in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Plasmide wurden bei 18000 x g für 10 min in der UZ pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 5 ml 70-prozentigem Ethanol wurde erneut für 10 min bei 18000 x g

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit der Plasmidpräparation bei RT getrocknet und anschließend in 1 ml H₂O gelöst.

Puffer 1:

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

1 mg/ml RNase A

Puffer 2:

0,2 N NaOH

1% SDS

Puffer 3:

5 M Kaliumacetat

2.2.2.3 Plasmidaufreinigung

Durch eine Phenol-Chloroform-Fällung wurden aus Plasmidpräparationen eventuelle Kontaminationen mit bakteriellen Proteinen ausgewaschen. Dazu wurde 1 ml Plasmidlösung in H₂O mit 0,5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) im Mischungsverhältnis 25:24:1 gemischt und kräftig gevortext. Das Gemisch wurde bei 15600 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Schraubdeckelröhrchen überführt und mit Chloroform-Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 24:1 versetzt. Nach Zentrifugation bei 15600 x g und RT für 10 min wurde die obere Phase abgenommen und der letzte Schritt einmal wiederholt. Anschließend wurde das Plasmid mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Das Plasmid wurde bei 20000 x g für 10 min pelletiert, getrocknet und erneut in H₂O aufgenommen.

2.2.2.4 Restriktionsverdau von Bax-pEYFP-C1

Das Plasmid für die Transfektion von HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen wurde durch Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des Bax-Inserts überprüft. Während der Klonierung waren zusätzlich zur Insertion der Bax-Sequenz die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI flankierend an die Bax-Sequenz eingefügt worden. Bax-pEYFP-C1 wurde daher durch Restriktionsverdau mit HindIII oder EcoRI linearisiert. Durch gleichzeitigen Restriktionsverdau mit beiden Enzymen wurde das Bax-Insert aus dem pEYFP-C1-Vektor herausgeschnitten. Der Restriktionsverdau wurde nach folgendem Schema angesetzt:

Einfacher Restriktionsverdau:

1 µl Hind III / EcoRI (20 U/µl)
1 µl 10x Puffer 2, NEB
5 µl Plasmid
3 µl H₂O

Doppelter Restriktionsverdau:

1 µl HindIII (20 U/µl)
1 µl EcoRI (20 U/µl)
1 µl 10x Puffer 2, NEB
5 µl Plasmid
2 µl H₂O

2.2.2.5 Transfektion mit Bax-pEYFP-C1

Die intrazelluläre Lokalisierung von YFP-Bax wurde durch konfokale Laserscanmikroskopie untersucht. Dazu wurden $0,8 \times 10^5$ HeLa-WT-Zellen bzw. $1,2 \times 10^5$ BimS-Zellen auf Glasdeckplättchen ($\varnothing = 13$ mm) in 24-Lochplatten ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen wurde am folgenden Tag das Kulturmedium gegen 300 µl Kulturmedium mit 3% FCS ausgetauscht, da hohe FCS-Konzentrationen die Transfektion stören könnten. Für die Vorinkubation des Transfektionsansatzes wurden zunächst pro Probe 3 µl Plasmid-DNA, entsprechend 2 µg Bax-pEYFP-C1 in 92,5 µl serumfreien Kulturmedium verdünnt. Dann wurden 4,5 µl FuGene HD DNA Transfektionsreagenz pro Probe zu der Plasmidlösung gegeben und zur Bildung des Transfektionskomplexes für 15 min bei RT inkubiert. Einhundert µl der Lösung mit dem Transfektionskomplex wurden anschließend auf die Zellen getropft und die 24-Lochplatte vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden mit dem Transfektionskomplex für 4 h inkubiert. Danach wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium mit 10% FCS ausgetauscht. Etwa 30-40 h später wurden die Zellen im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 20:1 infiziert. Einundzwanzig Stunden nach Infektion wurde entweder mit 1 µM Staurosporin oder mit 1 µM Tetrazyklin für 3 h Apoptose induziert. Danach wurden die Zellen für 1 h mit 4% PFA fixiert und nach 2.2.15 für die Konfokalmikroskopie gefärbt.

2.2.3 Vorbehandlung von *T. gondii*: UV, Hitzeinaktivierung, Cytochalasin D, Hitzeschock, Quercetin, Cycloheximid

Um die Voraussetzungen von *Toxoplasma* für die Inhibierung des mitochondrialen Apoptoseweges zu untersuchen, wurden Parasiten unterschiedlich vorbehandelt. Zur Abtötung der Parasiten wurden 1×10^7 frisch isolierte *T. gondii* pro ml Zellkulturmedium für 30 min bei 60°C inkubiert (Sibley et al., 1985). Um die Replikation des Parasiten zu hemmen, wurden 1×10^7 *T. gondii* pro ml für eine Minute aus 20 cm Entfernung mit UV-Licht (UV-Lampe, K. Brenda, Wiesloch) der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Endo et al., 1981). Um eine

aktive Invasion des Parasiten in die Wirtszelle nach Adhäsion und gleichzeitiger Injektion der Evakuole zu verhindern, wurden die Parasiten eine Stunde mit 2 µg/ml Cytochalasin D vorbehandelt (Hakansson et al., 2001). Während der anschließenden Kokultur der Parasiten mit den Wirtszellen wurde mit der gleichen Konzentration Cytochalasin D weiterbehandelt. Um die Wirkung von UV-Bestrahlung, Hitzeinaktivierung und der Cytochalasin D-Behandlung auf die Parasiten zu kontrollieren, wurde die Wirtszellinvasion und die Replikation von *T. gondii* in HeLa-WT-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe 2.2.17). Zur Hemmung der Proteinsynthese des Parasiten wurden 1×10^7 *T. gondii* pro ml mit 5 µg/ml Cycloheximid für 30 min inkubiert. Während der Inkubation der so vorbehandelten *T. gondii* mit den Wirtszellen wurde ebenfalls mit 5 µg/ml Cycloheximid weiterinkubiert. Die Rolle von *Toxoplasma*-spezifischem Hsp70 (Stankiewicz et al., 2005) wurde durch Hitzeschock-Vorbehandlung der Parasiten bei 43°C für 1 h und durch Inhibierung der Hsp70-Proteinsynthese mit Quercetin untersucht. Die Behandlung mit 500 µM Quercetin wurde 1 h vor Infektion begonnen und nach Infektion in gleicher Konzentration fortgesetzt.

2.2.4 Vorbehandlung der Wirtszellen: Wortmannin, ActD

Um die Abhängigkeit der Apoptosehemmung durch *T. gondii* von der Wirtszelltranskription zu untersuchen, wurden Wirtszellen 1 h vor Infektion mit *T. gondii* mit 20 µg/ml Actinomycin D (Sobell, 1985) vorbehandelt. Während der Inkubation mit *T. gondii* wurde mit 20 µg/ml Actinomycin D weiterbehandelt. Um nachzuweisen, dass die Anwesenheit des Transkriptionsinhibitors keinen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit des Parasiten hatte, wurde in einem parallelen Ansatz die Infektionsrate mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Um zu bestätigen, dass die Transkription in Actinomycin D-behandelten Zellen gehemmt war, wurde in Jurkat-Zellen die Phorbolmyristolat/Phytohämagglutinin-induzierte Transkription des IL-2-Gens mittels PCR überprüft (siehe 2.2.13). Zur Untersuchung der Bedeutung des PI 3-Kinase-Signalweges für die Apoptosehemmung durch *T. gondii* wurden die PI 3-Kinase und ERK 1/2 in den Wirtszellen durch Behandlung mit 20 µM Wortmannin gehemmt. Der irreversible Inhibitor wurde 1 h vor Infektion zu den Wirtszellen gegeben und kurz vor Infektion gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht.

2.2.5 Induktion der Apoptose

Um die Veränderung von Apoptosesignalwegen durch *T. gondii* nach Aktivierung des rezeptorvermittelten Apoptosewegs zu untersuchen, wurde in Fas/CD95-transfizierten HeLa-Zellen Apoptose durch 0,25 µg/ml agonistischen anti-Fas/CD95-Antikörper induziert. Der mitochondriale Apoptosesignalweg wurde in Jurkat- und HeLa-WT-Zellen durch Behandlung

mit 1 μM Staurosporin ausgelöst. Durch Behandlung mit 1 μM Tetrazyklin wurde in HeLa-BimS-Zellen die Expression von BimS induziert und dadurch die Apoptosesignalkaskade abwärts des BH3-only Proteins BimS aktiviert. Wenn nicht anders angegeben, wurde Fas/CD95 18 h nach Infektion für 6 h mit anti-Fas/CD95 stimuliert. Zur Induktion des mitochondrialen Apoptose-signalweges wurde Staurosporin oder Tetrazyklin nach 21 h Infektionszeit zu den Zellen gegeben und für weitere 3 h inkubiert.

2.2.6 Hemmung der Caspase-Aktivität zum Inaktivieren der mitochondrialen Amplifikationsschleife

Die Bedeutung des mitochondrialen Amplifikationsloops in HeLa-Fas-Zellen nach Stimulation von Fas wurde durch Hemmung der Caspase 9 untersucht. Dabei wurde die Caspase 9 spezifisch durch den Caspase 9-Inhibitor z-LEHD-FMK gehemmt. Eine Stunde vor Stimulation mit anti-Fas/CD95 wurde ein Teil der Proben mit 20 μM z-LEHD-FMK vorbehandelt, die anderen Proben wurden unbehandelt belassen. Nach 6 h Stimulation mit anti-Fas/CD95 wurden die Zellen mit NP-40-Puffer lysiert und die Caspase 8, -9 und -3 Aktivitäten fluorimetrisch gemessen (siehe 2.2.18).

Die Bedeutung von Caspasen für die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung durch *Toxoplasma* in HeLa-WT oder HeLa-BimS-Zellen wurde mit Hilfe des generellen Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK untersucht. Dazu wurde infizierten Zellen und nicht-infizierten Kontrollzellen eine Stunde vor Apoptose-Induktion 20 μM z-VAD-FMK in das Kulturmedium gegeben und damit bis zur Isolierung der Proben inkubiert. Nach 3 h Inkubation mit 1 μM Staurosporin oder 1 μM Tetrazyklin wurden die Proben in mitochondriale und cytosolische Fraktionen extrahiert. Durch Western Blot und Immunfärbung wurde die Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien in Anwesenheit des generellen Caspase-Inhibitors z-VAD-FMK untersucht. Außerdem wurden gleiche Proben mit NP-40-Puffer lysiert und die Caspase 3- Aktivität fluorimetrisch gemessen, um die Hemmung der Caspasen durch z-VAD-FMK zu kontrollieren.

2.2.7 Proteinisolierung

2.2.7.1 Gesamtlysat

Um die Proteinlevel der Bcl-2-Familie und anderer Proteine der Apoptose-signal-kaskade mittels SDS-PAGE und Western Blot zu untersuchen, wurden die gesamten in der Zelle enthaltenen löslichen Proteine isoliert. Infizierte Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 24 Stunden nach Infektion wie in 2.2.1 beschrieben aus den Zellkulturflaschen in

Zentrifugenröhrchen überführt und bei 400 x g für 5 min sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben mehrmals gevortext. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden anschließend bei 15000 x g für 5 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Lysepuffer

Triton X-100	1 %
NaCl	150 mM
Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
NaF	50 mM
Natriumpyrophosphat	5 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM
Leupeptin	10 µM
Aprotinin	5 µg/ml
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	1 mM
Pepstatin	5 µg/ml
EDTA, pH 8,0	1 mM
	in H ₂ O bidest.

2.2.7.2 Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Proteinextrakte

Jurkat-, HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen wurden zu je 2x10⁶ Zellen in 9 cm Ø Zellkulturschalen ausgesät. Nach Infektion der Zellen und Induktion der Apoptose wurden die Zellen durch Trypsinisierung bzw. Suspension geerntet, bei 400 x g zentrifugiert und mit PBS einmal gewaschen. Die Zellen wurden in 30 µl PBS resuspendiert und daraufhin mit dem gleichen Volumen Digitonin in Saccharose gemischt. Nach 1 min auf Eis wurden Zellorganellen und die schwere Membranfraktion für 60 sec bei 14000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde als cytosolischer Zellextrakt in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet mit den Zellorganellen und den Membranbestandteilen wurde bei Jurkat-Zellen in 50 µl RIPA-Puffer, bei HeLaWT-, HeLaFas- und BimS-Zellen in 150 µl RIPA-Puffer aufgenommen und nach 1 min auf Eis für 60 sec bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit löslichen Proteinen aus Zellorganellen und Membranfraktion, der u. a. mitochondriale Proteine enthielt, wurde abgenommen und zusammen mit der cytosolischen Fraktion bei -80°C gelagert oder im Anschluss mit 2 x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 99°C erhitzt und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Digitonin in Saccharose:

150 µg/ml Digitonin in
500 mM Saccharose

RIPA-Puffer:

0,05 M Tris/HCl pH 7,4
0,15 M NaCl
1 % Triton X-100
0,5 % NaDOC
0,1 % SDS
174 µg/ml PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Pepstatin
1 mM Na-orthovanadat

2.2.7.3 Isolierung von Membranfraktionen ohne Membran-assoziierte Proteine

Um die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran nach Tetrazyklin-induzierter Expression von BimS zu untersuchen, wurden 2×10^6 HeLa-BimS-Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Nach Infektion der Zellen und Induktion der Apoptose durch Tetrazyklin-Behandlung wurden die Zellen durch Trypsinisierung geerntet, bei 400 x g zentrifugiert und mit PBS einmal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS resuspendiert und daraufhin mit dem gleichen Volumen Digitonin in Saccharose gemischt (siehe 2.2.7.2). Nach 1 min auf Eis wurden die Zellorganellen und schwere Membrananteile durch Zentrifugation bei 14000 x g für 60 sec pelletiert und der Überstand mit der cytosolischen Fraktion verworfen. Das Pellet wurde für 30 min mit 100 mM NaCO_3 behandelt, um Membran-assoziierte Proteine von der Membran zu lösen. Nach Zentrifugation bei 20000 x g für 20 min wurde der Überstand mit den Membran-assoziierten Proteinen verworfen, das Pellet wurde in 2x SDS-Puffer aufgenommen, für 5 min bei 99°C erhitzt und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.8 Crosslinking von Bax-Oligomeren mit EGS

Zum Nachweis der Oligomerisierung wurden multimere Proteine durch den Crosslinker Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat) kovalent miteinander verknüpft, so dass die Quartärstruktur nach SDS-PAGE, Western-Blot und Immunfärbung weiterhin nachweisbar war. 1×10^6 HeLa-WT- bzw. BimS-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und nach 24 h im Parasit-Wirt-Verhältnis von 20:1 infiziert. Einundzwanzig Stunden nach Infektion wurde in HeLa-WT-Zellen mit 1 µM Staurosporin, in HeLa-BimS-Zellen mit 1 µM Tetrazyklin für 3 h Apoptose induziert. Die Zellen wurden danach durch Trypsinisierung und Zentrifugation bei

400 x g und RT für 5 min isoliert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Proben in je 70 µl CHAPS-Lysepuffer (siehe unten) für 30 min auf Eis lysiert. Schwere Membrankomplexe wurden bei 15000 x g für 5 min bei 4°C pelletiert und verworfen. Für die kovalente Verbindung von multimeren Proteinen wurde EGS frisch in DMSO gelöst, da EGS in Lösung nicht dauerhaft stabil ist. Der Überstand des Zellextrakts wurde mit EGS in einer Endkonzentration von 1 mM für 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von Tris/HCl, pH 7,4 zu einer Endkonzentration von 20 mM wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen von 5x SDS-Probenpuffer gemixt, für 5 min bei 99°C auf dem Thermomixer erhitzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

CHAPS-Lysepuffer

10 mM HEPES pH 7,4
137 mM NaCl
2 mM EDTA
2 % CHAPS
4% Protease Inhibitor Cocktail
1 mM Na₃VO₄

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in einer Vertikalelektrophoresekammer (Mini-ProteanIII; Biorad, München) durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden dabei durch SDS denaturiert und mit negativer Ladung versehen. Nach dem Auftragen der Proben auf ein Acrylamidgel wurden die Proteine im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Für das Gel wurde zuerst ein Trenngel mit 12 % Polyacrylamid in die Gießapparatur gegossen, mit Butanol überschichtet und über Nacht vollständig polymerisieren gelassen. Danach wurde das Butanol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Das Trenngel wurde mit einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid überschichtet, in das ein Probenkamm eingesetzt wurde. Das polymerisierte Gel wurde in eine Gelkammer eingebaut, die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Nach dem Entfernen des Probenkamms wurden die Geltaschen mit einer Mikroliterspritze gespült. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, zusammen mit den Markerproteinen für 5 min auf 100°C erhitzt und bei 10000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die SDS-PAGE bei 25 mA pro Gel durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande gerade aus dem Gel gelaufen war.

Trenngel (12% Acrylamid)

Stammlösung:	Menge:	Endkonzentration:
2 M Tris/HCl, pH 8,8	0,940 ml	0,375 M
10 % SDS	0,100 ml	0,2 %
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2 ml	12 %, 0,32 %
in H ₂ O bidest.	1,93 ml	
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	20 µl	0,04 %
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	0,02 %

Sammelgel (5% Acrylamid)

Stammlösung:	Menge:	Endkonzentration:
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,625 ml	0,125 M
10 % SDS	50 µl	0,2 %
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	0,420 ml	5 %, 0,13 %
in H ₂ O bidest.	1,380 ml	
Bromphenolblau, gesättigte Lösung	5 µl	
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	10 µl	0,04 %
TEMED	10 µl	0,04 %

1 x SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin, pH 8,3	192 mM
SDS	0,1 %
	in H ₂ O bidest.

2 x SDS-Probenpuffer

Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	4 %
Glycerin	20 %
Dithiothreitol (DTT)	65 mM
BPB	0,002 %
	in H ₂ O bidest.

2.2.10 Western Blot

Für den spezifischen Proteinnachweis im Anschluss an die SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (NC-

Membran) übertragen, um sie einem Nachweis mit Antikörpern zugänglich zu machen. Der Transfer der Proteine auf die NC-Membran erfolgte in einem Semi-dry Blotting Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984). Das Gel wurde nach der SDS-PAGE von den Glasplatten getrennt und auf eine NC-Membran (Hybond ECL, GE Healthcare) gelegt. Um den Stromfluss für den Proteintransfer zu gewährleisten, wurden die Membran und das Gel zwischen Puffer-getränkte Filterpapiere folgendermaßen eingebaut:

- Kathode
- 9 Schichten Filterpapier mit 40 mM Aminocaprinsäure, pH 7,6 und 20 % Methanol
- Polyacrylamidgel aus der SDS-PAGE
- NC-Membran
- 3 Schichten Filterpapier mit 25 mM Tris-HCl, pH 10,4 und 20 % Methanol
- 6 Schichten Filterpapier mit 0,3 M Tris-HCl, pH 10,4 und 20 % Methanol
- Anode

Der Proteintransfer wurde für 90 min bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche durchgeführt. Die auf der Membran sichtbaren vorgefärbten Molekulargewichtsstandards dienten als Kontrolle für eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran und zur Bestimmung der relativen Molekularmassen der aufgetrennten Proteine. Um die Auftrennung gleicher Proteinmengen in den verschiedenen Proben auf dem Gel zu kontrollieren, wurde die NC-Membran für 1 min in Ponceau-S-Lösung gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde anschließend durch dreimaliges Schwenken in destilliertem Wasser ausgewaschen.

Vor der Immunfärbung wurden unspezifische Proteinbindestellen durch Inkubation für 1 h in Blockierlösung abgesättigt. Sämtliche Inkubationen sowie Waschschrte wurden dabei auf dem Wippschüttler durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Blockieren 5 min in Waschlösung geschwenkt und anschließend mit einem Primärantikörper (Tabelle 2.1) in Inkubationsreagenz über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrten für jeweils 5 min wurde für 90 min mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in Inkubationsreagenz inkubiert. Je nach Herkunft des Primärantikörpers wurde mit folgenden Sekundärantikörpern 1:2000 verdünnt in Inkubationslösung inkubiert:

- (1) Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
- (2) Meerrettich Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel anti-Ziege IgG (H+L)
- (3) Meerrettich Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)

Zuletzt wurde die Membran einmal für 15 min und dreimal für 5 min in Waschlösung inkubiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Für die Detektion der Immunkomplexe wurde die Membran 1 min in ECL-Lösung (GE Healthcare, Freiburg) inkubiert. Das in der Lösung enthaltene Chemilumineszenz-Substrat Luminol wird durch die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase umgesetzt, wobei Licht emittiert wird. Die Lumineszenzsignale wurden

auf einem Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Freiburg) detektiert und der Film anschließend in der Dunkelkammer entwickelt. Die Expositionszeiten der einzelnen Antikörper aus Tabelle 2.1 variierten zwischen 10 sec und 45 min.

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver

0,2 % Tween-20

0,02 % NaN_3

in PBS, pH 7,4

Waschlösung

0,05 % Tween-20

in PBS, pH 7,4

Inkubationsreagenz

5 % Magermilchpulver

0,05 % Tween-20

in PBS, pH 7,4

Tabelle 1: Verdünnungen der Primärantikörper für Immunfärbung

Primärantikörper	Verdünnung
Maus mAk IgG ₁ anti-Caspase 8, Klon 1C12	1:1000
Maus mAk IgG _{2b} anti-Caspase 8, Klon 12F5	1:1000
Kaninchen pAk anti-Caspase 9 Ig	1:2000
Ziege pAk anti-Caspase 3 Ig	1:1000
Kaninchen pAk anti-Bid Ig	1:500
Maus mAk IgG _{2b} anti-humanen Cytochrom c, Klon 7H8.2C12	1:250
Maus mAk IgG _{2a} anti-bovine Cytochrom c-Oxidase (COX), Untereinheit IV, Klon 20E8-C12	1:250
Maus mAk IgG ₁ anti-humanen Bax	1:250
Maus mAk IgG ₁ anti-humanen Bak	1:250
Kaninchen pAk Ig anti-humanen Bim	1:1000
Kaninchen pAk anti-humanen Mcl-1	1:250
Maus mAk IgG ₁ anti-humanen Bcl-2, Klon 4D7	1:250
Kaninchen pAk Ig anti-A1/Bfl-1	1:100
Maus mAk IgG ₁ anti-Bcl-x	1:250
Maus mAk IgG ₁ anti-human Phospho-Bad, Klon 7E11	1:250

Kaninchen pAk anti-human Bad	1:250
Kaninchen pAk anti-human Bmf	1:250
Kaninchen pAk anti-human Bok	1:250
Kaninchen pAk anti-human Puma	1:250
Kaninchen Ig anti- <i>Toxoplasma</i> -Serum	1:2000
Maus Ig anti- <i>Toxoplasma</i> -Serum	1:2000
Maus IgG mAk anti-Aktin, Klon C4	1:10000

2.2.11.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit von Sigma entsprechend den Angaben des Herstellers nach dem Protokoll für tierische Zellen isoliert. Die Zellen wurden in den Vertiefungen der 6-Lochplatten mit 350 µl Guanidin-Isothiocyanat (GITC) – haltigen Puffer lysiert, wobei das denaturierend wirkende GITC eine schnelle Inaktivierung der RNasen bewirkte. Die Proben wurden auf Shredder-Säulen gegeben und bei 14000 x g für 2 min zentrifugiert. Die homogenisierten Proben wurden danach mit dem gleichen Volumen Ethanol vermischt und auf RNeasy-Spin-Säulen gegeben, an deren Silica-Gel-Membran RNA-Moleküle gebunden wurden. Das Ethanol optimierte dabei die Bindung an die Säulenmembran. Andere Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14000 x g für 15 s und anschließendem Waschen entfernt. Für die Elution der RNA wurde 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und bei 14000 x g für 1 min zentrifugiert. Mit dieser Methode werden RNA-Moleküle von mindestens 200 bp isoliert und die kleineren rRNAs und tRNAs mit den anderen Bestandteilen aus der Membran gewaschen. Um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde dem Eluat 5 µl DNase-Reaktionspuffer und 5 µl DNase I zugesetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der DNA-Verdau durch Zugabe von 5 µl Stopmix und Erhitzen der Proben auf 60°C für 5 min beendet. Die Konzentration der eluierten RNA wurde bestimmt (siehe unten) und die Proben bei –80°C gelagert.

Bestimmung der Konzentration der RNA

Die Konzentration der eluierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Absorption einer 1:10 Verdünnung wurde bei 260 nm in einem Spektrophotometer (Ultraspec 1000, GE Healthcare) gemessen. Eine Absorptionseinheit entsprach 40 µg RNA pro ml. Die Konzentration in µg/ml ergab sich aus der optischen Dichte multipliziert mit 40 und dem Faktor der Verdünnung:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot 40 [\mu\text{g/ml}] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.12 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde durch reverse Transkription (RT) mit Omniscript RT (Qiagen) in einzelsträngige, komplementäre cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptase ist ein retrovirales Enzym mit einer Polymerasedomäne und einer Ribonuklease-H-Domäne. Das Enzym katalysiert die RNA-abhängige DNA-Synthese, die RNA-Hydrolyse und die DNA-abhängige DNA-Synthese. Die DNA-Synthese und die RNA-Hydrolyse finden koordiniert statt, so dass die RNA entfernt wird, nachdem sie als Matrize gedient hat. Bei der RT lagern sich Oligo-dT-Primer an den Poly-A-Schwanz der mRNA an. Die Polymerasedomäne startet daraufhin die Verknüpfung der dNTPs mit dem RNA-Strang in 5' → 3' Richtung der DNA. Die RNase-H-Domäne der reversen Transkriptase baut spezifisch RNA ab, die als RNA:DNA-Hybridmolekül vorliegt. Dabei wird nur RNA abgebaut, die in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wurde. Die quantitativen Verhältnisse der mRNA werden dadurch theoretisch 1:1 in cDNA umgesetzt. Eine DNA-abhängige Polymerase-Reaktion findet bei der RT nicht statt, da die nötigen Primer fehlen. Die RT-Ansätze wurden auf Eis entsprechend dem Pipettierschema gemischt, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

	<u>Menge</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 x RT-Puffer	2 µl	1 x
dNTPs, 5 mM pro dNTP	2 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo-dT-Primer, 10 µM	0,4 µl	0,2 µM
RNase Inhibitor, 10 U/µl	1 µl	0,5 U/µl
Omniscript Reverse Transkriptase, 4 U/µl	1 µl	0,2 U/µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl	

2.2.13 PCR

Der pEYFP-C1-Vektor mit integriertem Bax-Insert wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein des Bax-Gens überprüft. Dazu wurde der Reaktionsansatz wie angegeben gemixt und die Bax-Sequenz im unten angegebenen Programm amplifiziert. Um eine effektive Hemmung der RNA-Synthese (siehe 2.2.19) durch Actinomycin D zu prüfen, wurde die durch PMA/PHA induzierte Transkription des IL-2-Gens in Jurkat-Zellen mittels PCR von IL-2-cDNA und β-Aktin kontrolliert. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm wurden wie unten angegeben durchgeführt.

PCR-Reaktionsansatz:

5 µl 10x Puffer

1 µl dNTPs (jedes Nukleotid 10 µM)

0,5 µl forward Primer (50 mM)

0,5 µl reverse Primer (50 mM)

0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

ad 50 µl H₂O_{bidest}**Tabelle 2: PCR-Programme**

Bax:	IL-2	β-Aktin:
1: 95°C Pause	1: 95°C Pause	1: 94°C Pause
2: 95°C 5 min	2: 95°C 5 min	2: 94°C 5 min
3: 95°C 1 min	3: 95°C 1 min	3: 94°C 1 min
4: 68°C 1 min	4: 50°C 1 min	4: 60°C 1 min
5: 72°C 1 min (35x zurück zu Schritt 3)	5: 72°C 40 sec (35x zurück zu Schritt 3)	5: 72°C 1 min (35x zurück zu Schritt 3)
6: 72°C 10 min	6: 72°C 10 min	6: 72°C 10 min
7: 4°C Pause	7: 4°C Pause	7: 4°C Pause

2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese in einem Agarosegel wurden die PCR-Produkte bzw. die Restriktionsansätze von Bax-pEYFP-C1 ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 10 µl der DNA mit 1 µl 10x Probenpuffer gemischt und auf ein 1% iges Agarosegel mit 1 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) pro 10 ml Gellösung aufgetragen. Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden in eine Geltasche jeweils ein 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker bzw. ein 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für ca. 30 min durchgeführt, anschließend wurde das Bandenmuster durch ultraviolettes (UV-) Licht sichtbar gemacht.

2.2.15 Morphologische Detektion der Apoptose durch Hoechst-Färbung

Die Hoechst-Färbung wurde dazu verwendet, die Chromatin-Kondensation als morphologischen Marker der Apoptose sichtbar zu machen. HeLa-Zellen und abgeleitete Transfektanten wurden wie in 2.2.1 beschrieben auf Glasdeckgläschen ausgesät und mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Die Apoptose wurde durch Zugabe von 0,25

µg/ml agonistischem anti-Fas/CD95, 1 µM Staurosporin oder 1 µM Tetrazyklin induziert. Drei Stunden später wurden die Zellen für 1 h in 4% PFA fixiert, einmal in PBS gewaschen und für 1 h in 0,1 mg/ml Saponin in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ng/ml Hoechst-Farbstoff (33258, Sigma, München) in PBS mit 0,1 mg/ml Saponin für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie dreimal in PBS gewaschen, in entmineralisiertem H₂O gespült und mit 10 µl Mowiol pro Glasdeckgläschen auf Objektträgern fixiert. Nach Polymerisierung des Mowiole wurden die Präparate durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.2.16 TUNEL-Färbung

DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen wurden mittels TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling)-Reaktion nachgewiesen. Dabei wurden durch eine Deoxynukleotidyltransferase Fluorescein-gekoppelte Nukleotide an freie 3'-OH DNA-Enden übertragen. Für den TUNEL-Test wurden HeLa-Fas/CD95-Zellen wie in 2.2.1 beschrieben auf Glasdeckgläschen ausgesät und mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Einundzwanzig Stunden nach Infektion wurden die Zellen für 3 h mit 0,5 µg/ml agonistischem anti-Fas/CD95 stimuliert. Für den TUNEL-Test bei gleichzeitiger *T. gondii*- und Propidiumiodid-Färbung wurden die Zellen zunächst für 1 h mit 4% PFA fixiert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 5 min wurden die Zellen 1 h in Inkubationslösung (siehe unten) permeabilisiert und unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Nach Waschen für 5 min in Waschlösung wurden die Glasdeckgläschen mit jeweils 30 µl Maus anti- *T. gondii* Serum (Tabelle 2.3) verdünnt in Inkubationslösung für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal in PBS mit Waschlösung gewaschen und anschließend für 1 h mit Cy5-gekoppeltem Esel anti-Maus (Tabelle 2.3) in Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (siehe oben) folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton-X in 0,1% Natriumcitrat für 2 min. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in einer feuchten, dunklen Kammer für 1 h mit 30 µl des TUNEL-Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) inkubiert. Dazu wurde die Enzymlösung mit der terminalen Deoxynukleotidyltransferase 1:10 in Reaktionspuffer mit dem enthaltenem Nukleotidmix verdünnt. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min in PBS gewaschen, für 30 sec in 5 µg/ml Propidiumiodid in PBS inkubiert und erneut dreimal in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen in entmineralisiertem H₂O gespült und mit Mowiol auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie ausgewertet.

Inkubationslösung

PBS mit 1% BSA und 0,1 mg/ml Saponin

Waschlösung

PBS mit 0,1 mg/ml Saponin

2.2.17 Immunfluoreszenzmikroskopie

Cytochrom c, aktives Bax, Bax sowie *T. gondii* wurden auf Einzelzelebene durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mittels spezifischer Primärantikörper und fluorchrommarkierter Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Fluorochrome Carbocyanin (Cy2), Indocarbocyanin (Cy3) und Indodicarbocyanin (Cy5) besitzen unterschiedliche Emmissionsspektren, so dass Cy2-, Cy3- und Cy5-markierte Strukturen durch verschiedene Photodetektoren gleichzeitig nachgewiesen werden können. Die konfokale Laserscanmikroskopie ermöglichte dabei eine hohe Auflösung der Strukturen ohne Streulicht. Für den Immunfluoreszenztest wurden die Zellen auf Deckgläschen in 24-Lochplatten kultiviert. Einen Tag nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 20:1 und Induktion der Apoptose mittels anti-Fas/CD95, Staurosporin oder Tetrazyklin wurden die Zellen und nicht-behandelte Kontrollen zweimal mit PBS gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur in Fixierungslösung fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 50 mM NH₄Cl in PBS inkubiert, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Nach fünfminütigen Waschen in PBS folgte die Permeabilisierung der Zellen und die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Inkubation in Inkubationslösung für 1 h. Die Zellen wurden anschließend für 10 min in 0,1 mg/ml Saponin in PBS gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur mit Antikörpern wie in Tabelle 2.3 angegeben inkubiert. Dazu wurden die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten in einen 30 µl-Tropfen der Antikörper in Inkubationspuffer auf Parafilm gelegt. Danach wurden die Zellen dreimal für 10 min in 0,1 mg/ml Saponin in PBS gewaschen, bevor sie für 1 h mit Fluorchrom-markierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 2.3) wie oben beschrieben inkubiert wurden. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Deckgläschen anschließend dreimal für 10 min in 0,1 mg/ml Saponin in PBS gewaschen, einmal für 10 min sowie zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Zur Färbung der Nukleinsäuren der gesamten Zellpopulation wurden die Zellen für einige Fragestellungen zusätzlich für 1 min in 5 µg/ml Propidiumiodid inkubiert. Anschließend wurden sie erneut dreimal in PBS gewaschen. Um eine Kristallbildung durch PBS zu vermeiden, wurden die Deckgläschen in entmineralisiertes Wasser getaucht und überschüssige Flüssigkeit auf einem trockenen Tuch entfernt. Abschließend wurden sie mit 10 µl Mowiol pro Deckgläschen (Calbiochem, Darmstadt) auf Objektträgern fixiert, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Die

Auswertung der gefärbten und fixierten Präparate erfolgte mit einem Leica TCS SP2 konfokalen Laserscanmikroskop.

Fixierungslösung

4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat/HCl, pH 7,4

Waschpuffer

0,1 mg/ml Saponin, 1 % BSA in PBS

Inkubationslösung

0,1 mg/ml Saponin, 1% BSA (beides frisch angesetzt) in PBS

Tabelle 3: Antikörper und deren Verdünnung für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Maus mAk IgG ₁ anti-humanes Cytochrom c, Klon 6H2.B4, 1:100	Cy3-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Maus IgG, 1:400
Maus mAk IgG ₁ anti humanes Bax, Klon 6A7, 1:100	Cy3-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Maus IgG, 1:400
Maus mAk IgG ₁ anti humanes Bax, 1:100	Cy3-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Maus IgG, 1:400
anti- <i>Toxoplasma</i> -Serum, Kaninchen Ig, 1:2000	Cy2-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG, 1:50
anti- <i>Toxoplasma</i> -Serum, Maus Ig, 1:100	Cy2-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG, 1:50; oder Cy5-konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Maus IgG, 1:100

2.2.18 Caspase-Aktivitätstest

Die Aktivitäten von Caspase 8, Caspase 9 und Caspase 3/7 wurden durch Spaltung von fluorogenen Caspase-spezifischen Substraten bestimmt. Dazu wurden die Zellen durch Trypsinisierung oder Resuspension isoliert, einmal mit PBS gewaschen und in 50 µl NP40-Lysepuffer extrahiert. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Proben für 5 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Je 10 µl der Überstände wurden in Triplikaten mit 90 µl Reaktionspuffer in 96-Loch-Mikrotiterplatten gemixt. Die Fluoreszenzintensität von freiem

Aminomethylcoumarin nach Caspase-vermittelter Spaltung des Substrates wurde alle 5 min über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C und bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 380 nm und 460 nm mit einem Victor V Multifunktionsmessgerät (Perkin Elmer, Boston, USA) gemessen. Die Zunahme der gespaltenen Substrate über die Zeit wurde als Maß für die Caspase-Aktivität errechnet.

NP40-Lysepuffer:

150 mM NaCl

50 mM Tris, pH 8.0

1% Nonidet P40

25 µl Protease Inhibitor Cocktail /ml, Complete Mini EDTA-free

Reaktionspuffer:

10 µM Ac-DEVD-AMC (Caspase 3/7-spezifisches Substrat) / 50 µM Ac-IETD-AMC (Caspase 8-spezifisches Substrat/ 50 µM Ac-LEHD-AMC (Caspase 9-spezifisches Substrat)

10 mM HEPES

50 mM NaCl

0.1 % CHAPS

1 mg/ml BSA

40 mM β-Glycerophosphat

2 mM MgCl₂

5 mM EGTA, pH 7.0

2.2.19 Intrazelluläre Färbungen und Durchflusszytometrie

HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät (1×10^6 Zellen pro Probe) und am folgenden Tag im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 20:1 infiziert. Jurkat-Zellen (1×10^6 Zellen pro Probe) wurden in 12-Lochplatten ausgesät und am gleichen Tag im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 30:1 infiziert oder nicht infiziert belassen. Einundzwanzig Stunden nach Infektion wurden HeLa-BimS-Zellen für 3 h mit 1 µM Tetrazyklin behandelt, HeLa-WT- und Jurkat-Zellen wurden für den gleichen Zeitraum mit 1 µM Staurosporin behandelt. Danach wurden die Zellen durch Trypsinisierung oder Resuspendierung und Zentrifugation für 5 min bei 400 x g isoliert. Sie wurden in PBS resuspendiert und in eine 96-Loch-V-Boden-Mikrotiterplatte überführt. Nach erneuter Sedimentierung bei 400 x g und 4°C für 5 min wurden die Zellen in 0,5% PFA in PBS für 30 min auf Eis fixiert und anschließend dreimal in FACS-Puffer (siehe unten) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit spezifischen Primärantikörpern oder Isotypkontrollen (siehe Tabelle 2.4) in 50 µl Färbepuffer

(siehe unten) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen mit 10 µg/ml R-Phycoerythrin (PE)-konjugierten Sekundärantikörpern (Tabelle 2.4) im Dunkeln für 30 min auf Eis gefärbt. Nachdem ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt worden waren, wurden die Zellen in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und sofort die Fluoreszenzintensitäten in einem FACSCalibur-Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen.

Tabelle 4: Antikörper für FACS-Färbung

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Maus mAk IgG ₁ anti humanes Bax; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG, 10 µg/ml
Maus mAk IgG ₁ anti humanes Bax, Klon 6A7; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG, 10 µg/ml
Maus IgG _{2a} mAk anti-human Bak; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG, 10 µg/ml
Kaninchen pAk Ig anti humanes Bim; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG, 10 µg/ml
Isotypkontrolle Maus; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG, 10 µg/ml
Isotypkontrolle Kaninchen; 10 µg/ml	PE- konjugiertes F(ab') ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG, 10 µg/ml

FACS-Puffer

1% FCS in PBS, pH 7,4

Färbepuffer

1% FCS, 50 µg/ml Digitonin in PBS, pH 7,4

2.2.20 Immunkopräzipitation

Um die Interaktionen verschiedener Proteine miteinander zu bestimmen, wurden Immunkopräzipitationen durchgeführt. Für die Präzipitation von Bax, Bak und Bim aus unterschiedlich behandelten Proben wurden je 1×10^7 Zellen in 500 µl Lysepuffer (siehe 2.2.2) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 5 min wurde der Überstand mit 0,5 µg/ml Maus IgG (für Bax und Bak) bzw. 0,5 µg/ml

Kaninchen IgG (für Bim) für 30 min bei 4°C auf eine m Rotilab-Schüttler präadsorbiert. Maus IgG- bzw. Kaninchen IgG-gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit 20 µl Protein G-Sepharose für 30 min bei 4°C in Kopf-über-Kopf-Rotation und anschließender Zentrifugation bei 10600 x g und 4°C für 5 min aus dem Lysat entfernt. Die Protein G-Sepharose war zuvor zweimal in 1 ml Lysepuffer gewaschen und bei 10600 x g und 4°C für 5 min sedimentiert worden. Das präadsorbierte Lysat wurde danach über Nacht in Kopf-über-Kopf-Rotation bei 4°C mit je 5 µg/ml Maus anti-Bax IgG, Maus anti-Bak IgG oder Kaninchen anti-Bim IgG inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 1,5 h bei 4°C mit je 15 µl Protein G Sepharose, die zuvor zweimal in Lysepuffer gewaschen worden war. Anschließend wurde die Protein G Sepharose mit gebundenen Präzipitaten bei 10600 x g und 4°C für 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal in Hochsalz-Puffer, d.h. Lysepuffer mit einer Endkonzentration von 0,5 M NaCl, und anschließend zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Die Präzipitate wurden dann in je 15 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, bei 99°C für 5 min im Thermomixer aufgekocht, kurz abzentrifugiert und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.21 Statistische Analyse

Quantitative Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten verschiedener Ansätze wurden durch den Student's *t*-Test ermittelt. P-Werte wurden mit der Anzahl der statistischen Vergleiche multipliziert (Bonferroni Korrektur). Werte von $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Inhibierung der Apoptose durch *T. gondii* nach Stimulation des rezeptor-vermittelten Apoptosesignalweges

T. gondii ist in der Lage, die rezeptorvermittelte Apoptose nach Fas/CD95-Ligation in SKW6.4-Zellen zu inhibieren (Vutova et al., 2007). In diesen sogenannten Typ I- Zellen werden Effektorcaspasen direkt über die Caspase 8 ohne Notwendigkeit der mitochondrialen Amplifikation aktiviert (Scaffidi et al., 1998). In eigenen Experimenten wurde nun der Effekt einer *Toxoplasma*-Infektion auf die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II- Zellen untersucht. In diesen Zellen wird über die Spaltung des BH3-only Proteins Bid hauptsächlich der mitochondriale Weg der Apoptose aktiviert, eine für die Aktivierung der Effektorcaspase 3 notwendige Voraussetzung. Unter Verwendung von Fas/CD95-transfizierten HeLa-Zellen wurde untersucht, ob *T. gondii* in der Lage ist, die Fas/CD95-vermittelte Apoptose zu hemmen. Des Weiteren wurden Apoptosesignalwege nach Fas/CD95- Stimulation auf Veränderungen nach Infektion mit *T. gondii* untersucht.

3.1.1 *T. gondii* inhibiert die Apoptose nach Fas-Ligation in Typ II-Zellen

Zunächst wurde durch mikroskopische Analysen untersucht, ob *T. gondii* in der Lage ist, die Fas/CD95-induzierte Apoptose in Typ II-Zellen zu hemmen. HeLa-Fas-Zellen wurden im Parasit-Wirt-Verhältnis von 20:1 infiziert oder nicht-infiziert belassen. Bei dieser Infektionsrate waren 78% der Zellen infiziert (nicht gezeigte Ergebnisse). Achtzehn Stunden nach Infektion wurden die Zellen für 6 weitere Stunden mit 0,5 µg/ml agonistischem anti-Fas/CD95 behandelt. Mittels Hoechst-Färbung wurden die unterschiedlich behandelten Zellen auf Chromatinkondensation als morphologischen Marker für apoptotischen Zelltod untersucht. Nicht-infizierte und infizierte Zellpopulationen ohne Fas/CD95-Stimulation waren vital und wiesen intakte Zellkerne auf (Abb. 2). Die Behandlung von nicht infizierten Zellen mit agonistischem anti-Fas/CD95 induzierte die Apoptose in $71\% \pm 4\%$ (Mittelwert $\pm$ SEM; n=3) der Zellen. Nach 6 Stunden Behandlung mit anti-Fas/CD95 war die Chromatinkondensation bereits weit fortgeschritten, größtenteils waren die Zellen in apoptotische Vesikel abgeschnürt. *Toxoplasma*-infizierte Zellpopulationen waren jedoch weitgehend vor apoptotischem Zelltod bewahrt, da nur $30\% \pm 4\%$ der Zellen kondensierte Zellkerne aufwiesen. In der infizierten Zellpopulation war die Apoptose demnach um etwa 60% im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen reduziert (Abb. 2).

Abb. 2: Inhibierung von Fas/CD95- vermittelter Apoptose durch *T. gondii* in Typ II- Zellen. *T. gondii*- infizierte HeLa-Fas-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 18 h nach Infektion für weitere 6 h mit anti-Fas/CD95 stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und nach Hoechst-Färbung durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Prozentzahlen geben den Mittelwert der apoptotischen Zellen mit Standardfehler (n = 3) an.

Als zusätzlicher Nachweis von apoptotischen Zellen diente der TUNEL-Test, wobei gleichzeitig *T. gondii* in infizierten Zellpopulationen nachgewiesen werden konnte. Um zu untersuchen, ob eine Invasion des Parasiten für die Hemmung der Apoptose notwendig war, wurden die Zellen wie oben behandelt und fixiert. DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen wurden durch Markierung mit FITC-gekoppeltem dUTP sichtbar gemacht. Gleichzeitig wurden Zellen mit Propidiumiodid und Toxoplasmen mit spezifischen Antiserum und Cy5-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen.

Behandlung mit agonistischem anti-Fas induzierte DNA-Strangbrüche in der Mehrheit der nicht-infizierten Zellen (Abb 3). Tatsächlich waren nach 6 Stunden anti-Fas-Behandlung ausschließlich parasit-positive Zellen weiterhin vital, während in den benachbarten, nicht-infizierten Zellen DNA-Strangbrüche als Indikator für ein spätes Stadium der Apoptose nachzuweisen waren. Nicht-behandelte Kontrollzellen waren in der TUNEL-Färbung negativ. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Infektion mit *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II HeLa-Fas-Zellen effektiv hemmen kann.

Abb. 3: Eine Invasion von *T. gondii* in Typ II-Zellen inhibiert die Fas/CD95-vermittelte Apoptose. *T. gondii*-infizierte HeLa-Fas-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 18 h nach Infektion für weitere 6 h mit anti-Fas/CD95 stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen wurden DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Test (grüne Fluoreszenz) nachgewiesen, während *T. gondii* mit spezifischem Maus-Antiserum gefärbt wurde (blaue Fluoreszenz). HeLa-Fas-Zellen wurden durch Propidiumiodidfärbung von Nukleinsäuren sichtbar gemacht (rote Fluoreszenz). Repräsentative Ausschnitte der unterschiedlichen Proben wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie ausgewertet.

3.1.2 Fas-Ligation aktiviert den mitochondrialen Apoptosesignalweg in Typ II HeLa-Fas-Zellen

In Typ II-Zellen reichen die geringen Mengen aktiver Caspase 8 nicht aus, um Caspase 3 direkt zu spalten und zu aktivieren (Scaffidi et al., 1999). Es wurde mehrfach beschrieben, dass in diesen Zellen die Caspase 8-vermittelte Aktivierung der Caspase 3 durch die Spaltung des BH3-only Proteins Bid, die Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien und die darauffolgende Aktivierung der Caspase 9 verstärkt wird (Kuwana et al., 1998; Scaffidi et al., 1998, 1999). In HeLa-Fas-Zellen wurde darum die Spaltung von Bid und die Aktivität und Aktivierung der Caspasen des rezeptorvermittelten und des mitochondrialen Apoptosesignalweges in nicht-infizierten und *T. gondii*-infizierten Zellen nach Stimulation von Fas/CD95 untersucht. Behandlung mit anti-Fas/CD95 führte zu einer starken Aktivität der Caspasen 8, 9 und 3/7 in nicht-infizierten Zellen (Abb. 4A). Dagegen waren die Aktivitäten der Caspasen 8, 9 und 3/7 nach Infektion mit *T. gondii* signifikant reduziert ($p < 0,01$; Student's *t*-Test). Die Infektion der Zellen mit einer höheren Anzahl von Parasiten reduzierte

Abb. 4: Die Aktivitäten der Caspasen 8, -9, -3 sowie die Spaltung von Bid nach Fas/CD95-vermittelter Apoptose sind in *T. gondii*-infizierten Typ II-Zellen gehemmt. HeLa-Fas-Zellen wurden mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Nach einer Infektionszeit von 18 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit anti-Fas/CD95 behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und A) die Aktivitäten von Caspase 8, -9 und -3/7 fluorimetrisch gemessen und B) die proteolytische Spaltung der Caspasen sowie von Bid in aktive Untereinheiten mittels Western Blot und Immunfärbung untersucht. Durch die Immunfärbung von Aktin wurde ein gleichmäßiger Probenaustrag sichergestellt. Für die Kontrolle der Spaltprodukte wurde eine nicht-infizierte Positivkontrolle aufgetragen, in der Apoptose durch Staurosporin induziert worden war.

in den infizierten Zellpopulationen die Aktivitäten der Caspasen weiter auf Hintergrundaktivität (Abb. 4A). Caspasen werden durch proteolytische Spaltung in aktive Untereinheiten aktiviert. Die Spaltung der Caspasen in aktive Untereinheiten wurde durch Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4B). Nach Behandlung mit anti-Fas wurden Caspase 8, 9 und 3 in aktive Untereinheiten gespalten. Das BH3-only Protein Bid wurde ebenfalls in die verkürzte aktive Form tBid (truncated Bid) gespalten. Die Spaltung der Caspasen 8, 9 und 3 und Bid in aktive Proteinuntereinheiten war dosisabhängig nach Infektion mit *T. gondii* gehemmt. Zusätzlich waren die Proteinlevel der Caspase 8-Proform in Abhängigkeit der Infektionsrate herunterreguliert. Diese Degradierung des Caspase 8-Proteinlevels entspricht der alternativen Spaltung der Proform durch *T. gondii* (Vutova et al., 2007; siehe auch 3.2.4). Die Proformen von Bid und Caspase 3 waren nach Apoptoseinduktion in geringerer Menge

vorhanden als in unbehandelten Zellen, jedoch waren die Proteinlevel der Proformen von Bid und Caspase 3 nach Infektion mit *T. gondii* nicht verändert. Durch eine Kontrollfärbung von Aktin wurde nachgewiesen, dass die untersuchten Proteinlysate gleich konzentriert waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des rezeptorvermittelten Apoptoseweges nach Ligation von Fas/CD95 in HeLa-Fas-Zellen zusätzlich zu einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges über die Spaltung des BH3-only Proteins Bid führt. Eine Infektion mit *T. gondii* verhinderte jedoch die Aktivierung beider Apoptosesignalwege durch Inhibierung der Caspase-Aktivierung und ihrer Aktivitäten.

3.1.3 Die Cytochrom c-Freisetzung nach Fas-Ligation in HeLa-Fas-Zellen ist in *T. gondii*-infizierten Zellen gehemmt

Die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien ist ein bedeutender Schritt in der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade. Nach proapoptotischen Stimuli ist *T. gondii* in der Lage, die Cytochrom c-Freisetzung innerhalb des intrinsischen Apoptosewegs zu inhibieren (Goebel et al., 2001). Des Weiteren ist der Parasit fähig, mit der Apoptosekaskade unterhalb der Mitochondrien zu interferieren (Keller et al., 2006). Um die Inhibierungsmechanismen innerhalb des mitochondrialen Amplifikationsloops genauer zu untersuchen, wurde die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol nach Ligation von Fas/CD95 in HeLa-Fas-Zellen untersucht. Western Blot-Analysen von mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen aus HeLa-Fas-Zellen zeigten, dass nach Stimulation mit anti-Fas/CD95 in nicht-infizierten Zellpopulationen Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol ausgeschüttet wurde (Abb. 5A). In *T. gondii*-infizierten Zellpopulationen war diese Cytochrom c-Freisetzung stark vermindert. Durch Immunfärbung der Cytochrom c-Oxidase wurde nachgewiesen, dass die cytosolische Lokalisation von Cytochrom c nicht auf einer Kontamination mit mitochondrialen Proteinextrakten beruhte. Die Cytochrom c-Freisetzung wurde zusätzlich im Immunfluoreszenztest auf Einzelzelebene untersucht (Abb. 5B). In nicht-behandelten Kontrollzellen war Cytochrom c in der Mehrheit in vesikulären Strukturen lokalisiert, was mit einer Lokalisation in den Mitochondrien im Einklang steht. Lediglich eine spontane Apoptoserate von $1,3 \pm 0,9$ % führte zu einer Cytochrom c-Freisetzung in das Cytosol dieser Zellen. In nicht-infizierten Zellen, in denen die Apoptose durch Fas-Ligation induziert wurde, konnte in $79,0 \pm 2,1$ % der Zellen eine deutlich homogene cytosolische Verteilung von Cytochrom c nachgewiesen werden. *T. gondii*-infizierte Zellen waren dagegen weitgehend vor der Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien geschützt, die cytosolische Verteilung von Cytochrom c nach Fas-Ligation war in infizierten Zellpopulationen auf $33,0 \pm 14,4$ % der

Abb. 5: *T. gondii* blockiert die Cytochrom c- Freisetzung in HeLa-Fas-Zellen während der Fas/CD95-induzierten Apoptose. *T. gondii*-infizierte HeLa-Fas-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 18 h nach Infektion für 6 h mit anti-Fas behandelt oder unbehandelt belassen. A) Mitochondriale und cytosolische Proteinextrakte wurden mittels Western Blot und Immunfärbung auf die subzelluläre Verteilung von Cytochrom c untersucht. Mittels COX-Färbung wurde eine Kontamination der cytosolischen Fraktion mit mitochondrialen Proteinen ausgeschlossen. B) Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellen mit einem Cytochrom c-spezifischem Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper gefärbt (rote Fluoreszenz) und gleichzeitig *T. gondii* mit spezifischem Antiserum und Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Eine Infektion mit *T. gondii* und der Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Cytochrom c wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie analysiert.

Zellen reduziert. Bei den infizierten Zellpopulationen blieben im Durchschnitt $22,0 \pm 4 \%$ der Zellen parasit-negativ. In der großen Mehrheit der parasit-positiven Zellen konnte eine Lokalisation von Cytochrom c innerhalb vesikulärer Strukturen nachgewiesen werden (Abb 5B). Zellen, in die kein Parasit invadiert war, waren dagegen nicht vor der Cytochrom c-Ausschüttung in das Cytosol geschützt (Abb. 5B, durch einen Pfeil angezeigt). Diese Untersuchungen zeigen, dass *T. gondii* die Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien nach Fas-Ligation in seinen Wirtszellen effektiv verhindert.

3.1.4 Die Proform der Initiatorcaspase 8 ist in *T. gondii*-infizierten HeLa-Fas-Zellen herunterreguliert

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass *T. gondii* in Typ I SKW6.4-Zellen den rezeptorvermittelten Apoptoseweg durch Reduktion der Caspase 8-Aktivität und gleichzeitige Degradierung der Proform der Caspase 8 hemmt (Vutova et al., 2007). In eigenen Arbeiten

Abb. 6: Spaltung von Caspase 8 während Fas/CD95-vermittelter Apoptose und alternative Spaltung in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen. HeLa-Fas-Zellen wurden mit *T. gondii* kokultiviert oder nicht-infiziert belassen und 18 h nach Infektion für 6 h mit agonistischem anti-Fas/CD95 behandelt. Proteinlysate wurden durch Western Blot und Caspase 8- spezifische Immunfärbung mit mAk 12F5 auf proteolytische Spaltung der Caspase 8 nach Aktivierung und alternative Spaltprodukte nach Infektion mit *T. gondii* untersucht.

konnte die Hemmung der Caspase 8- Aktivität und eine Degradierung der Caspase 8-Proform in Typ II HeLa-Fas-Zellen bestätigt werden (siehe Abb. 6). Um zu untersuchen, ob die Degradierung der Caspase 8 in HeLa-Fas-Zellen auf einer alternativen Spaltung der Caspase 8 in *T. gondii*-infizierten Zellen beruht, wurden HeLa-Fas-Zellen in unterschiedlichen Infektionsraten infiziert oder unbehandelt belassen und wurden 18 Stunden nach Infektion für 6 Stunden mit agonistischem anti-Fas/CD95 behandelt. Proteinlysate wurden mittels Western Blot auf Spaltprodukte der Caspase 8 nach Fas-Aktivierung und Infektion mit *T. gondii* untersucht (Abb. 6). Der verwendete anti-Caspase 8-Antikörper 12F5 für die Immunfärbung erkennt ein Epitop innerhalb der p18-Domäne von Caspase 8 und daher sowohl die Proform als auch die p43/41-Intermediate und p18. Zusätzlich erkennt der Antikörper ein Fragment von 30 kDa, das bei der *T. gondii*-vermittelten Spaltung der Caspase 8 entsteht (Vutova et al., 2007). In nicht-infizierten, unbehandelten HeLa-Fas-Zellen trat die Proform der Caspase 8 bei 55 und 53 kDa auf (Abb 6). Nach 6 Stunden Behandlung mit agonistischem anti-Fas/CD95 konnte mit dem anti-Caspase 8, Klon 12F5-Antikörper zusätzlich zur Caspase 8-Proform das aktive Fragment p18 nachgewiesen werden, wobei die Intermediärprodukte p43/41 nicht deutlich gemacht werden konnten. In infizierten anti-Fas behandelten Zellen war kein aktives Fragment von 18 kDa nachweisbar, was darauf hindeutete, dass die Aktivierung der Caspase 8 in *T. gondii*-infizierten Zellen gehemmt war. Interessanterweise traten in infizierten Zellen Proteine von 20 kDa, 26 kDa und 30 kDa auf. Diese Proteine mit Ausnahme von p30 traten sowohl bei

unbehandelten Zellen als auch bei anti-Fas/CD95 behandelten Zellen auf und waren demnach unabhängig von der Stimulation des rezeptorvermittelten Apoptosesignalweges. Das Protein von 30 kDa wurde in Vutova et al. (2007) als alternatives Spaltprodukt der Caspase 8 in *T. gondii*-infizierten Zellen nachgewiesen, während p26 ein *Toxoplasma*-Protein darstellt, das auch in *T. gondii*-Lysat vorhanden war (Abb. 6), und p20 ein kreuzreaktives Wirtszellprotein, das in *T. gondii*-infizierten Zellen induziert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass *T.gondii* ebenfalls in Typ II- HeLa-Fas-Zellen die Proform der Caspase 8 in einer alternativen Weise spaltet und dadurch wahrscheinlich die autokatalytische Spaltung und Aktivierung der Caspase 8 verhindert. Dieser wichtige Inhibierungsmechanismus, der bereits in Typ I-Zellen gezeigt wurde (Vutova et al., 2007), interferiert ebenfalls mit der Aktivierung des rezeptorvermittelten Apoptoseweges nach Fas-Ligation in HeLa-Fas-Zellen. Die Parasiten-induzierte Degradierung der Caspase 8 dürfte dazu beitragen, den Zelltod nach Fas-Stimulation in Fas-transfizierten HeLa-Zellen zu verhindern.

3.1.5 *T. gondii* verhindert die Fas-induzierte Apoptose in Typ II-Zellen

hauptsächlich durch Hemmung des mitochondrialen Amplifikationsloops

Die Exekution der Apoptose in Typ II- Zellen nach Stimulation von Fas/CD95 beruht nicht nur auf der Verstärkung der Caspase 3-Aktivierung durch den mitochondrialen Apoptoseweg, sondern auf einem Feedback-Mechanismus unterhalb der Mitochondrien (Kuwana et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Um die Bedeutung der mitochondrialen Amplifikationsschleife in HeLaFas-Zellen zu untersuchen, wurde die Caspase 9-Aktivität in nicht infizierten HeLa-Fas-

Abb. 7: Die Aktivierung der Caspase 3/7 nach Fas/CD95-Stimulation in HeLa-Fas-Zellen ist abhängig von der Aktivierung der Caspase 9. Nicht-infizierte HeLa-Fas-Zellen wurden mit dem Caspase 9-Inhibitor LEHD-FMK oder seinem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt oder nicht-vorbehandelt belassen und für 6 h mit anti-Fas/CD95 behandelt. Die Caspase 3/7-Aktivität und die Caspase-9-Aktivität wurden durch fluorimetrische Messung von Caspase 3/7-spezifischem Substrat (schwarze Balken) und Caspase 9-spezifischem Substrat (schraffierte Balken) in Proteinlysaten bestimmt.

Zellen durch den spezifischen Caspase 9-Inhibitor LEHD-FMK gehemmt (Abb. 7). Eine anti-Fas/CD95-Behandlung der Zellen führte zu einer starken Aktivierung von Caspase 9 und 3/7. In Anwesenheit des Caspase 9-Inhibitors war wie erwartet keine Caspase 9-Aktivität, jedoch außerdem keine Caspase 3/7-Aktivität nach anti-Fas/CD95-Behandlung messbar. Dies zeigt, dass der Zelltod von HeLa-Fas-Zellen nach Fas/CD95-Stimulation von der Caspase 9 und der mitochondrialen Amplifikationschleife abhängig ist.

Für eine genauere Unterscheidung der Inhibierungspotentiale von *T. gondii* innerhalb des rezeptorvermittelten und des mitochondrialen Signalweges wurde Fas/CD95 im Caspase 9-defizienten Jurkat-Klon JMR und der Caspase 9-transfizierten Revertante F9 stimuliert (Samraj et al., 2006). Western Blot-Analysen bestätigten das Fehlen von Caspase 9 in JMR-

Abb. 8: *T. gondii* verhindert die Fas-induzierte Apoptose in Typ II-Zellen hauptsächlich durch Hemmung des mitochondrialen Amplifikationsloops. A) Caspase 9-defiziente Jurkat-Zellen (JMR) und davon abgeleitete Caspase 9-transfizierte Revertanten (F9) wurden für 24 h infiziert (offene Symbole) oder nicht-infiziert belassen (schwarze Symbole). Die Zellen wurden während der letzten 1 bis 3 h der Infektion mit agonistischem anti-Fas/CD95 behandelt oder unbehandelt belassen. Die Aktivitäten der Caspasen 8 und -3/7 in Proteinlysaten wurden durch fluorimetrische Messung der Spaltung spezifischer Substrate analysiert. Um die Effekte von *T. gondii* in JMR-Zellen zu verdeutlichen, wurden die Werte für 0 und 3 h zusätzlich durch Säulendiagramme mit kleinerer Y-Achse dargestellt. B) Caspase 9-defiziente JMR-Zellen und F9-Revertanten wurden durch Western Blot-Analyse und Immunfärbung auf Proteinlevel von Caspase 8 und -9 kontrolliert. Durch Kontrollfärbung von Aktin wurde ein gleichmäßiger Probenaufrag nachgewiesen. Die Linien- und Balkendiagramme geben Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Versuchen an. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollzellen und *T. gondii*-infizierten Zellen wurden durch Student's *t*-Test identifiziert (*= $p < 0,5$; **= $p < 0,01$).

Zellen und die Komplementierung von Caspase 9 in F9-Zellen. Die Jurkat-Klone unterschieden sich dagegen nicht im Proteingehalt von Caspase 8 (Abb 8B). Zwei Stunden nach Ligation von Fas waren Caspase 8 und Caspase 3/7 in F9-Zellen in hohem Maß aktiviert, in JMR-Zellen konnte jedoch keine messbare Caspase 8- und Caspase 3/7-Aktivität nachgewiesen werden. Dies bestätigte, dass die rezeptorvermittelte Apoptose in diesen Zelltypen von der Aktivität der Caspase 9 und der mitochondrialen Amplifikationsschleife abhängt. Drei Stunden nach Fas-Ligation konnte eine geringe Aktivität der Caspase 8 in Caspase 9-defizienten JMR-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Caspase 8-Aktivität nach Infektion mit *T. gondii* auf Hintergrundaktivität signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Der geringe Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in JMR-Zellen nach 3 Stunden anti-Fas-Behandlung wurde in Anwesenheit des Parasiten gehemmt, allerdings nicht in gleichem Ausmaß wie die Caspase 8-Aktivität. Die bereits hohe Aktivität der Caspasen 8 und -3/7 nach 2 Stunden Fas-Stimulation in F9-Klonen stieg nach 3 Stunden Fas-Stimulation weiter an. In infizierten F9-Zellen waren die Caspase 8 und Caspase 3- Aktivitäten signifikant vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass *T. gondii* die Fas-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen hauptsächlich durch die Hemmung der mitochondrialen Amplifikationsschleife verhindert, während eine Hemmung der Caspase 8 erst nach längerer Fas/CD95-Stimulierung nachzuweisen ist und ihr daher eine geringere Rolle zukommt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Fas-transfizierten Typ II HeLa-Zellen nach Fas/CD95-Stimulation effektiv hemmen kann. Eine ausreichende Aktivierung der Effektorcaspasen nach Fas/CD95-Ligation ist in diesen Zellen abhängig von der Aktivierung der mitochondrialen Amplifikationsschleife. Die Hemmung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in Typ II- Zellen durch *T. gondii* ist ein multifaktorieller Prozeß. *T. gondii* inhibiert die Initiatorcaspase 8 durch die Degradierung des Proteinlevels der Proform und der Hemmung der Aktivität der Caspase 8. Die Daten deuten darauf hin, dass die Degradierung der Initiatorcaspase 8 auf einer alternativen Spaltung durch *T. gondii* beruht. Dieser Inhibierungsmechanismus trägt insgesamt allerdings nur in einem geringem Ausmaß zu der Apoptosehemmung durch *T. gondii* bei. Innerhalb der mitochondrialen Amplifikationsschleife greift *T. gondii* zusätzlich mit einem zweiten Inhibierungsmechanismus ein. Die Inhibierung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in HeLa-Fas-Typ II- Zellen durch *T. gondii* beruht hauptsächlich auf der Hemmung des mitochondrialen Apoptosesignalweges.

3.2 Inhibierung der Apoptose durch *T. gondii* nach Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskaden

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass *T. gondii* den mitochondrialen Apoptoseweg nach unterschiedlichen proapoptotischen Stimuli inhibieren kann (Nash et al., 1998, Goebel et al., 1999 und 2001). Dabei interferiert *T. gondii* mit der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade oberhalb der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Goebel et al., 2001). Eine mögliche Beteiligung der Bcl-2-Proteine an dem Hemmungsmechanismus wurde beschrieben (Goebel et al., 2001; Carmen et al., 2006), allerdings waren die genauen Mechanismen bisher unbekannt. Darüber hinaus wurden auch andere Mechanismen der Interferenz beschrieben (Kim und Denkers, 2006). In dieser Arbeit wurde die mitochondriale Apoptosesignalkaskade daher detailliert auf Veränderungen nach Infektion mit *T. gondii* untersucht. Die Veränderungen innerhalb des mitochondrialen Signalweges wurden an zwei unterschiedlichen Apoptosemodellen untersucht. Zum einen wurde Apoptose durch Staurosporin-Behandlung in HeLa-WT-Zellen oder Jurkat-Zellen induziert, zum anderen wurde in BimS-transfizierten HeLa-Zellen mit einem Tetrazyklin-induzierbaren Promotor die Expression von BimS durch Behandlung mit Tetrazyklin induziert. In diesem Modell konnte gezielt die Apoptosesignalkaskade unterhalb des BH3-only Proteins BimS aktiviert werden.

3.2.1 *T. gondii* interferiert mit der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade zwischen BimS-Expression und der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien

Morphologische Untersuchungen in BimS-transfizierten HeLa-Zellen zeigten, dass eine Behandlung der Zellen mit Tetrazyklin in 79% der Zellen Apoptose induzierte. Nach Infektion mit *T. gondii* und anschließender Tetrazyklin-Induktion war der Anteil an apoptotischen Zellen dagegen auf 24 % der Zellen vermindert (Abb. 9B). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass *T. gondii* den mitochondrialen Apoptosesignalweg abwärts des BH3-only-Proteins BimS hemmen kann. Western Blot-Analysen bestätigten, dass in Tetrazyklin-behandelten HeLa-BimS-Zellen im Gegensatz zu nicht-induzierten Kontrollzellen BimS deutlich exprimiert wurde (Abb. 9A). Staurosporin-Behandlung von HeLa-WT-Zellen induzierte Apoptose in 100 % der Zellen, eine Infektion mit *T. gondii* reduzierte die Anzahl der apoptotischen Zellen jedoch auf 34% (Abb. 9C). Sowohl in HeLa-BimS-Zellen als auch in HeLa-WT-Zellen entsprach die Reduktion der apoptotischen Zellen einem Inhibierungspotential von *T. gondii* von ca. 70%. Dies deutete darauf hin, dass *T. gondii* in beiden

Abb. 9: *T. gondii*-infizierte Zellen werden nach intrinsischen pro-apoptotischen Stimuli vor dem Zelltod bewahrt. B) HeLa-BimS-Zellen und C) HeLa-WT-Zellen wurden mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Nach 21 h Infektionszeit wurde die Apoptose durch induzierte Expression von BimS nach Tetrazyklin-Behandlung (B) oder Staurosporin-Behandlung (C) für 3 h ausgelöst. Die Zellen wurden anschließend fixiert, mittels Hoechst-Farbstoff gefärbt und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. A) Die induzierte BimS-Expression nach Tetrazyklin-Behandlung für 3 h in HeLa-BimS-Zellen wurde durch Western-Blot-Analyse bestätigt.

Zelltypen gleichermaßen unterhalb des BH3-only Proteins BimS mit der Apoptosesignalkaskade der Wirtszelle interferiert. Die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen wurde mittels Fraktionierung in cytosolische und mitochondriale Extrakte und Western Blot-Analyse mit anschließender Immunfärbung untersucht. Nicht-infizierte und infizierte Kontrollzellen, die nicht mit Tetrazyklin behandelt waren, zeigten eine ausschließliche Lokalisation von Cytochrom c innerhalb der mitochondrialen Fraktion (Abb. 10). Nach Induktion der Apoptose in nicht-infizierten HeLa-BimS-Zellen wurde Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol

Abb. 10: *T. gondii* inhibiert die Cytochrom c-Freisetzung nach induzierter BimS-Expression in HeLa-BimS-Zellen. *T. gondii*-infizierte HeLa-BimS-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen. Mitochondriale und cytosolische Proteinextrakte wurden durch Western Blot und Immunfärbung auf die subzelluläre Verteilung von Cytochrom c untersucht. Durch COX-Färbung wurde eine Kontamination der cytosolischen Fraktion mit mitochondrialen Proteinen ausgeschlossen. Durch Aktin-Färbung wurde eine gleichmäßige Proteinkonzentration der verschiedenen cytosolischen Fraktionen sichergestellt.

ausgeschüttet. Interessanterweise war die Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen vollständig gehemmt. Eine Kontrollfärbung der Cytochrom c-Oxidase zeigte, dass die cytosolische Fraktion nicht mit mitochondrialen Proteinen kontaminiert war. Die Aktin-Färbung belegte eine gleichmäßige Isolierung von cytosolischen Proteinen. In HeLa-WT-Zellen und Jurkat-Zellen war die Cytochrom c-Freisetzung nach Infektion mit *T. gondii* ebenfalls deutlich gehemmt (nicht gezeigte Ergebnisse). Diese Daten zeigen deutlich, dass *T. gondii* mit der Apoptosesignalkaskade zwischen dem BH3-only Protein BimS und der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien interferiert.

Zusätzlich wurde geprüft, ob Inhibierungsmechanismen unterhalb der Mitochondrien nach mehrfacher Exekution eines positiven Feedbackloops dazu führen könnten, dass in *T. gondii*-infizierten Zellen eine verminderte Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien beobachtet wurde. Um die Bedeutung der mitochondrialen Amplifikations-schleife für die verminderte Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen zu klären, wurde die Cytochrom c-Freisetzung in das Cytosol in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD-FMK untersucht. Caspase 3/7-Aktivitätstests bestätigten die

Effektivität des Caspase-Inhibitors (Abb. 11B). Western Blots wurden wie oben beschrieben durchgeführt und bestätigten, dass die *T. gondii*-vermittelte Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung unabhängig von Caspase-Aktivitäten und damit einem Feedback-Mechanismus der mitochondrialen Amplifikationsschleife stattfand (Abb. 11A). Dadurch wurde bewiesen, dass tatsächlich eine Hemmung zwischen BimS-Expression und Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen erfolgte.

Abb. 11: Die Hemmung der Cytochrom c- Freisetzung in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen nach induzierter BimS-Expression ist unabhängig von Caspase-abhängigen Feedbackmechanismen. A) HeLa-BimS-Zellen wurden für 24 h mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Während der letzten 4 h der Infektion wurden die Zellen wo angegeben mit 20 μ M zVAD-FMK inkubiert. In den letzten 3 h der Infektion wurde in einigen Proben die Apoptose durch Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression ausgelöst. Anschließend wurden mitochondriale und cytosolische Proteinextrakte mittels Western-Blot und Immunfärbung auf die subzelluläre Verteilung von Cytochrom c untersucht. Durch COX-Färbung wurde eine Kontamination der cytosolischen Fraktion mit mitochondrialen Proteinen ausgeschlossen, durch Aktin-Färbung wurde eine gleichmäßige Proteinkonzentration der verschiedenen cytosolischen Extrakte sichergestellt. B) Zur Überprüfung der Effizienz des generellen Caspase-Inhibitors zVAD-FMK wurden nicht-infizierte HeLa-WT-Zellen 1 h mit dem generellen Caspase-Inhibitor zVAD-FMK vorbehandelt oder unbehandelt belassen. Nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin für 3 h wurde die Caspase 3/7-Aktivität in Proteinlysaten aus zVAD-behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollen fluorimetrisch gemessen.

3.2.2 *T. gondii* inhibiert die Aktivierung der Caspasen 8, -9, und -3 nach induzierbarer Expression von BimS

Im mitochondrialen Apoptosesignalweg wurde die Aktivierung der Caspase 9 und der Effektorcaspase 3/7 nach Infektion mit *T. gondii* untersucht. Die induzierbare Expression von BimS führte zu einer starken Aktivität von Caspase 9 und -3/7 in nicht-infizierten Zellen (Abb. 12). Eine Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszell-Verhältnis 10:1 reduzierte die Aktivität der Caspase 9 auf 26% ($p < 0,05$) und die Aktivität der Caspase 3/7 auf 36% ($p < 0,01$). Eine Infektion mit der doppelten Anzahl an Parasiten verminderte die Caspase 9-Aktivität auf 14% ($p < 0,05$). Die Caspase 9-Aktivität war damit fast vollständig gehemmt. Die Aktivität der Effektorcaspase 3/7 wurde auf 19% ($p < 0,1$) vermindert (Abb. 12). Eine Infektion mit *T. gondii* verhinderte also effektiv die Enzymaktivitäten der Caspasen 9 und -3/7 nach induzierbarer Expression von BimS.

Caspasen werden durch proteolytische Spaltung in aktive Untereinheiten aktiviert. Durch Western Blot und anschließende Immunfärbung wurde die Spaltung der Caspasen 8, -9 und -3 nach Infektion und Apoptose-Induktion in HeLa-BimS-Zellen untersucht. Nach Induktion von BimS wurde Caspase 9 in die aktive Untereinheit p35 gespalten (Abb. 13). Die Spaltung von Caspase 9 in p35 war in HeLa-BimS-Zellen, die zuvor mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis 10:1 infiziert worden waren, deutlich reduziert und nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 20:1 nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig mit dem Rückgang des p35-Spaltprodukts in Abhängigkeit der Infektionsdosis nahm der Proteinlevel der Caspase 9-Proform zu. Nach induzierter Expression von BimS wurde auch

Abb. 12: *T. gondii* inhibiert die enzymatische Aktivität der Caspasen 9 und -3/7 nach induzierter BimS-Expression durch Tetrazyklin-Behandlung. *T. gondii*-infizierte HeLa-BimS-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen. Die Aktivitäten der Caspasen 9 und -3/7 in Proteinlysaten wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 9- und -3/7- spezifischen Substraten analysiert. Die Balken geben Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Versuchen an. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollzellen und *T. gondii*-infizierten Zellen wurden durch Student's *t*-Test identifiziert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Abb. 13: *T. gondii* interferiert mit der proteolytischen Spaltung der Capasen 8, -9 und -3 nach induzierter BimS-Expression. HeLa-BimS-Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 10:1 (+) oder 20:1 (++) infiziert oder nicht-infiziert belassen. Nach einer Infektionszeit von 21 h wurden die Zellen für weitere 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und die proteolytische Spaltung der Caspasen in aktive Untereinheiten durch Western Blot und Immunfärbung untersucht. Durch die Kontrollfärbung von Aktin wurde ein gleichmäßiger Probenauftrag sichergestellt.

die Effektorcaspase 3 in die aktive Untereinheit p17 gespalten. Bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 10:1 war das p17-Spaltprodukt noch geringfügig vorhanden, bei der doppelten Infektionsdosis war p17 nicht mehr nachweisbar. Entsprechend der Verminderung von p17 in Abhängigkeit der Infektionsrate mit *T. gondii* nahm die Proform der Caspase 3 zu. Durch Kontrollfärbung von Aktin konnte eine gleichmäßige Proteinkonzentration der Proben nachgewiesen werden. Die induzierbare Expression von BimS führte auch zu starken positiven Feedbackmechanismen durch Effektorcaspasen. So führte eine Behandlung mit Tetrazyklin in nicht-infizierten Zellen zu einer starken Aktivierung der Initiatorcaspase 8 (Abb. 13). Die Proform der Caspase 8 war dabei in nicht-infizierten Zellen effektiv in die Intermediärprodukte p43/41 gespalten, außerdem war auch das aktive Fragment p18 schwach nachweisbar. Die Spaltung in die Intermediärprodukte p43/41 war bereits nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis 10:1 stark vermindert, nach Infektion im Verhältnis 20:1 konnten keine Spaltprodukte der Caspase 8 mehr nachgewiesen werden. Nach Tetrazyklin-Behandlung

nahm der Proteinlevel der Proform der Caspase 8 in Abhängigkeit der Infektionsrate ab, jedoch konnte keine deutliche Abnahme des Proteinlevels in nicht-behandelten Zellen nachgewiesen werden, so dass eine Modulation der Caspase 8 unabhängig von pro-apoptotischen Signalen durch *T. gondii* ausgeschlossen werden konnte. Zusammen belegen diese Daten, dass *T. gondii* die Aktivierung der Caspasen 8, -9, und -3 nach induzierbarer Expression von BimS verhindert.

3.2.3 Die Inhibierung des mitochondrialen Apoptoseweges durch *T. gondii* beruht weder auf einer Degradierung der pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak noch auf einer Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass *T. gondii* mit der Signalkaskade zwischen BimS-Expression und der Cytochrom c-Freisetzung interferiert, wurden anschließend die Proteine der Bcl-2-Familie auf Veränderungen nach Infektion mit *T. gondii* untersucht. Western Blot-Analysen der Proteinlevel von BimS nach induzierter Expression durch Tetrazyklin zeigten, dass die induzierte Expression von BimS in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen unverändert war (Abb. 14). Die Hemmung der BimS-induzierten Apoptose durch *T. gondii* war daher nicht auf Interferenz mit der Tetrazyklin-induzierten BimS-Expression oder eine Degradation von BimS zurückzuführen.

Abb 14: *T. gondii* interferiert nicht mit der Tetrazyklin-induzierten Expression von BimS. Im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 10:1 (+) oder 20:1 (++) mit *T. gondii* infizierte HeLa-BimS-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen. Die Proteinlevel von BimS wurden in Extrakten unterschiedlich behandelter Zellen nach Tetrazyklin-induzierter Expression mittels Western Blot und Immunfärbung von Bim untersucht. Mittels Aktinfärbung wurde eine gleichmäßige Proteinkonzentration der Extrakte nachgewiesen.

Weitere Western Blot-Analysen der anti-apoptotischen Proteine mit BH4-Domäne konnten keine Veränderungen der Proteinlevel von Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x und A1 in HeLa-BimS-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* nachweisen (Abb. 15). Die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung beruhte daher nicht auf einer Hochregulation dieser anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle nach Infektion mit *T. gondii*. Die Multidomänen-Proteine Bax und Bak, an denen sämtliche pro-apoptotischen Signale zusammenlaufen und die nach pro-apoptotischen Stimuli als Effektormoleküle die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien auslösen, waren in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen ebenfalls in den Proteinleveln unverändert (Abb. 16A). Dieses wichtige Ergebnis wurde in HeLa-WT-Zellen bestätigt (Abb. 16B). In Jurkat-Zellen, in denen pro-apoptotische Stimuli ausschließlich durch Bak weitergeleitet werden, war dessen Expression nach *T. gondii*-Infektion ebenfalls unverändert (nicht gezeigte Ergebnisse.). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass *Toxoplasma* die Cytochrom c- Freisetzung nicht durch eine Degradierung der zentralen pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak inhibiert.

Abb. 14: Die Proteinlevel der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x und A1 sind nach Infektion mit *T. gondii* unverändert. HeLa-BimS-Zellen wurden im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 10:1 (+) oder 20:1 (++) mit *T. gondii* infiziert oder nicht-infiziert belassen. Nach 21 h Infektionszeit wurden sie für 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen. Die Proteinlevel der anti-apoptotischen BH4-Proteine nach Tetrazyklin-induzierter Expression wurden mittels Western Blot und Immunfärbung untersucht. Eine gleichmäßige Konzentration der Proben wurde durch Aktinfärbung kontrolliert.

Abb. 16: Die Proteinlevel der Multidomänenproteine Bax und Bak sind in *T. gondii*-infizierten Zellen unverändert.

A) HeLa-BimS-Zellen und B) HeLa-WT-Zellen wurden für 24 h mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszell-Verhältnis 10:1 (+) oder 20:1 (++) infiziert oder nicht-infiziert belassen. Während der letzten 3 h wurde die Apoptose durch Behandlung mit Tetrahydrozoan (A) oder Staurosporin (B) induziert. Proteinlysate wurden durch Western Blot und Immunfärbung auf die Proteinlevel von Bax und Bak untersucht. Mittels Aktin-Färbung wurde ein gleichmäßiger Probenaufrag der verschiedenen Lysate sichergestellt.

Da in HeLa-WT-Zellen die Apoptose durch den Kinase-Inhibitor Staurosporin oberhalb der BH3-only Proteine ausgelöst wurde, wurde durch Western Blot-Analyse zusätzlich die Proteinlevel der BH3-only Proteine Puma, Bad, phosphoryliertes Bad, Bmf und des Multidomänenproteins Bok überprüft. Bok wird begrenzt in speziellen Zelltypen exprimiert, u.a. in HeLa-Zellen. Der Proteinlevel von Bmf war in *T. gondii*-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen unverändert (Abb. 17). Die Proteinlevel von Bad und Puma waren in apoptotischen Zellen bemerkenswerterweise deutlich verringert, in *T. gondii*-infizierten Zellen, in denen die Staurosporin-induzierte Apoptose inhibiert wurde, waren die Proteinlevel dagegen höher als in nicht-infizierten Kontrollen. Dagegen waren die Proteinlevel von Bad und Puma in *T. gondii*-infizierten Zellen, die nicht mit Staurosporin behandelt worden waren, unverändert im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle, so dass eine Infektion keinen generellen Effekt auf die Proteinlevel von Bad und Puma hatte, sondern nur die Spaltung von Bad und Puma nach Induktion der Apoptose teilweise verhinderte. Die Menge an phosphoryliertem Bad nahm nach Apoptoseinduktion ab, war jedoch nach Infektion mit *T. gondii* verändert (Abb. 17). Allein die Proteinlevel von Bok, dem Multidomänenprotein, das in HeLa-WT-Zellen zusätzlich zu Bax und Bak exprimiert wird, waren nach Infektion mit *T. gondii* unabhängig von pro-apoptotischen Stimuli deutlich verringert (Abb. 17). Die Herunterregulierung von Bok könnte daher in HeLa-WT-Zellen und HeLa-BimS-Zellen spezifisch zur Apoptosehemmung durch *T. gondii* beitragen.

Abb. 17: Proteinlevel der BH3-only Proteine nach Infektion mit *T. gondii*. HeLa-WT-Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis 10:1 (+) und 20:1 (++) infiziert oder nicht-infiziert belassen. Während der letzten 3 h der Infektionszeit wurde Apoptose durch Behandlung mit Staurosporin induziert. Proteinlysate wurden durch Western Blot und Immunfärbung auf die Level verschiedener BH3-only Proteine untersucht. Mittels Aktin-Färbung wurde ein gleichmäßiger Probenauftrag der Lysate nachgewiesen.

Die Bedeutung der Wirtszelltranskription für die Inhibierung der Cytochrom c- Freisetzung nach Infektion mit *T. gondii* wurde zusätzlich in HeLa-WT-Zellen und Jurkat-Zellen untersucht. Diese Zelllinien wurden verwendet, da eine induzierbare Expression von BimS in HeLa-BimS-Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der RNA-Synthese unmöglich war. Um zu überprüfen, ob die Apoptosehemmung aus der Induktion von anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle resultiert, wurde die Transkription der Wirtszellen durch Actinomycin D gehemmt. Nach Infektion mit *T. gondii* wurde in infizierten und nicht-infizierten Kontrollen anschließend die Apoptose induziert. Eine effektive Hemmung der RNA-Synthese wurde durch den Nachweis von IL-2-Transkripten nach Induktion der IL-2-Synthese in Act D-behandelten und unbehandelten Jurkat-Zellen kontrolliert (Abb. 18A). Die Transkription des IL-2-Gens wurde dabei durch die Stimulation von Jurkat-Zellen mit Phytohämagglutinin und Phorbolmyristatacetat induziert. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Actinomycin D war die PHA/PMA-induzierte IL-2-Synthese vollständig gehemmt (Abb. 18A). Die Hemmung der Cytochrom c- Freisetzung nach *T. gondii*- Infektion in Jurkat-Zellen wurde zunächst in einem

Kontrollansatz ohne Actinomycin D überprüft (Abb. 18B). Mitochondriale und cytosolische Extrakte aus infizierten Jurkat-Zellen und nicht-infizierten Kontrollen, die mit Staurosporin behandelt worden waren oder unbehandelt geblieben waren, wurden durch Western Blot-Analyse auf die subzelluläre Verteilung von Cytochrom c untersucht. Wie bereits in HeLa-BimS-Zellen gezeigt wurde (siehe Abb. 10 & 11A), hemmt *T. gondii* auch in Jurkat-Zellen die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol nach Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges (Abb. 18B). Nach Vorbehandlung von Jurkat-Zellen mit Actinomycin D wurde in nicht-infizierten Zellen allein durch Behandlung mit Actinomycin D Cytochrom c ins Cytosol freigesetzt. In *T. gondii*-infizierten Zellen war die Actinomycin D-induzierte Cytochrom c- Freisetzung allerdings vollständig gehemmt. Nach Stimulation des mitochondrialen Apoptoseweges durch Staurosporin wurde zusätzlich die Cytochrom c- Ausschüttung aus den Mitochondrien stimuliert. In infizierten Jurkat-Zellen war diese Cytochrom c- Freisetzung ins Cytosol ebenfalls vollständig gehemmt (Abb. 18B). Auch Vorbehandlung von HeLa-WT-Zellen mit Actinomycin D hatte keinen Einfluss auf die Apoptosehemmung durch *T. gondii*. Auch in diesem Zelltyp konnte bestätigt werden, dass die Cytochrom c- Freisetzung in Zellen, in denen die Transkription durch Actinomycin D gehemmt war, nach Infektion mit *T. gondii* gleichermaßen wie in unbehandelten Zellen inhibiert war (Abb. 18C). In HeLa-WT-Zellen war die Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol bei gleichzeitiger Actinomycin D- Behandlung deutlich reduziert. Eine Aktin-Färbung bestätigte den gleichmäßigen Proteinauftrag der einzelnen Proben, während die COX-Färbung sicherstellte, dass im Cytosol detektiertes Cytochrom c nicht auf einer Kontamination mit der mitochondrialen Fraktion beruhte. Aus diesen Ergebnissen geht deutlich hervor, dass die Hemmung der Apoptosesignalkaskade durch *T. gondii* oberhalb der Mitochondrien unabhängig von der Wirtszelltranskription stattfand. Die Hemmung der Apoptosesignalkaskade durch *T. gondii* beruhte also weder auf der Degradierung der wichtigen pro-apoptotischen Moleküle Bax und Bak noch auf der Induktion anti-apoptotischer Moleküle in der Wirtszelle.

In früheren Arbeiten wurde eine Modulation der PI 3-Kinase-Kaskade durch *T. gondii* beschrieben (Kim und Denkers, 2006). Die PI 3-Kinase-abhängige Aktivierung von Akt/PKB und ERK in *T. gondii*-infizierten Zellen resultierte in einer Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose, die nach experimenteller Blockierung der PI 3-Kinase durch Wortmannin aufgehoben wurde (Kim und Denkers, 2006). Die Beteiligung der PI 3-Kinase-Kaskade an der Apoptosehemmung durch *T. gondii* in HeLa-Zellen wurde durch den Einsatz des spezifischen irreversiblen PI 3-Kinase-Inhibitors Wortmannin überprüft. Dazu wurden HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen vor Infektion mit *T. gondii* mit Wortmannin inkubiert. Nach Infektion mit *T. gondii* und Induktion der Apoptose durch Tetrazyklin oder Staurosporin

Abb. 19: Die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* nach proapoptotischen Stimuli ist nicht durch eine Modulation der PI 3-Kinase-abhängigen Signalkaskade bedingt. A) HeLa-BimS-Zellen und B) HeLa-WT-Zellen wurden für 1 h vor Infektion mit *T. gondii* mit Wortmannin vorbehandelt und die PI 3-Kinase dadurch irreversibel gehemmt. In *T. gondii*-infizierten Zellen im Parasit-Wirtszellverhältnis von 20:1 und nicht-infizierten Kontrollen wurde durch Tetrazyklin- bzw. Staurosporin-Behandlung für 3 h die Apoptose induziert. Die Caspase 3/7-Aktivität in Proteinlysaten der verschiedenen Proben wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

wurde die Caspase 3/7- Aktivität in Proteinlysaten der Proben fluorimetrisch gemessen (Abb. 19). Tetrazyklinbehandlung von HeLa-BimS-Zellen (Abb. 19A) und Staurosporinbehandlung von HeLa-WT-Zellen (Abb. 19B) führte zu einem deutlichen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivitäten in nicht-infizierten Zellen. Das Hemmungspotential der Caspase 3/7- Aktivität von *T. gondii* in Zellen, die nicht mit Wortmannin behandelt worden waren, war quantitativ vergleichbar mit dem Hemmungspotential von *T. gondii* in Wortmannin-behandelten Wirtszellen. Dadurch konnte eine Modulation der PI 3-Kinase-Kaskade durch *T. gondii* als zugrundeliegender Mechanismus der Hemmung der Cytochrom c- Freisetzung nach proapoptotischen Stimuli weitgehend ausgeschlossen werden.

3.2.4 *T. gondii* verhindert die Aktivierung von Bax und Bak nach proapoptotischen Stimuli

Bei der Aktivierung von Bax und Bak konvergieren sämtliche pro-apoptotischen Signale oberhalb der Mitochondrien. Der zentrale Mechanismus der Bax/Bak-Aktivierung wurde auf Veränderungen nach einer Infektion mit *T. gondii* untersucht. Die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran wurde als Voraussetzung für die Bax/Bak-Aktivierung beschrieben

Abb. 20: Die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran ist in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen unverändert. Infizierte HeLa-BimS-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin behandelt, um die Expression von BimS zu induzieren. Mitochondriale Proteinextrakte wurden mit NaCO₃ behandelt, um Membran-assoziierte Proteine von Zellorganellen zu entfernen. Die verbliebenen, in die Membran inserierten Proteine wurden anschließend extrahiert. Durch Western Blot und Immunfärbung von Bim wurde die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran in Tetrazyklin-behandelten Zellen nachgewiesen. Die anschließende Färbung von Hsp70 kontrollierte den gleichmäßigen Probenaufrag der verschiedenen Extrakte

(Ley et al., 2005; Weber et al., 2007), daher wurde zunächst die BimS-Insertion in die Mitochondrienmembran in *T. gondii*-infizierten HeLa-BimS-Zellen überprüft. Western Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinextrakten zeigten, dass nach Tetrazyklin-induzierter BimS-Expression in nicht-infizierten und infizierten HeLa-BimS-Zellen gleiche Mengen BimS in die Mitochondrienmembran inserierten (Abb. 19).

Die Aktivierung von Bax und Bak in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen wurde durch intrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. Bei den intrazellulären Färbungen wurden dazu Antikörper verwendet, die spezifisch gegen den N-Terminus von Bax bzw. Bak gerichtet waren, der in beiden Proteinen erst nach Aktivierung exponiert wird. In der Histogrammdarstellung der Fluoreszenzintensitäten (Abb. 21) wurden nicht-infizierte Kontrollen (graue Flächen) mit *T. gondii*-infizierten Zellpopulationen (weiße Flächen) verglichen. In HeLa-BimS-Zellen, die nicht mit Tetrazyklin behandelt worden waren, waren die Fluoreszenzaktivitäten von Bax und Bak wie nach Isotypkontrollfärbung nachzuweisen, was auf nicht aktiviertes Bax und Bak hinwies (Abb. 21A, Darstellung links). Nach Tetrazyklin-induzierter Expression von BimS war aktives Bax in nicht-infizierten HeLa-BimS-Zellen deutlich nachweisbar. Außerdem wurde auch Bak in geringerem Ausmaß durch BimS-Expression aktiviert (Abb. 21A). Interessanterweise war die Aktivierung von Bax und Bak in infizierten Zellen, in denen die Apoptose durch BimS-Expression induziert worden war,

Abb. 21: *T. gondii* verhindert die Aktivierung von Bax und Bak nach proapoptotischen Stimuli. Zellen wurden im Parasit-Wirtszellverhältnis von 20:1 mit *T. gondii* infiziert (weiße Fläche, schraffierte Balken) oder nicht-infiziert belassen (graue Fläche, schwarze Balken). Einundzwanzig h nach Infektion wurde die Apoptose für 3 h in A) HeLa-BimS-Zellen durch Tetrazyklin und in B) Jurkat-Zellen durch Staurosporin induziert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen aktives Bax, aktives Bak und einem unspezifischen Isotypkontrollantikörper gefärbt. Die Fluoreszenzintensitäten der Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Repräsentative Histogramme aus mindestens 3 Experimenten wurden links dargestellt. Rechts wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten als Mittelwerte $\pm$ SEM aus allen Versuchen angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollen nach Apoptoseinduktion und *T. gondii*-infizierten Proben wurden durch Students *t*-Test identifiziert (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

vollständig gehemmt. Eine Isotypkontrollfärbung bestätigte die Spezifität der Antikörper gegen Bax und Bak. In HeLa-WT-Zellen, in denen die Apoptose durch Staurosporin induziert worden war, konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von Bax und Bak nach Induktion der Apoptose in *T. gondii*-infizierten HeLa-WT-Zellen eindeutig gehemmt war (nicht gezeigte Ergebnisse). In Bax-defizienten Jurkat-Zellen wurde die Aktivierung von Bak nach Staurosporin-Behandlung in nicht-infizierten und infizierten Zellen verglichen (Abb. 21B). Ohne Staurosporin-Behandlung konnte weder in infizierten Zellen noch in nicht-infizierten Zellen eine Aktivierung von Bak nachgewiesen werden (Abb. 21B). Nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin kam es zu einer erheblichen Aktivierung von Bak in nicht-infizierten Zellen. Bei vorheriger Infektion mit *T. gondii* war die Aktivierung von Bak in Jurkat-Zellen jedoch signifikant inhibiert (Abb. 21B). Diese Analysen zeigen deutlich, dass *T. gondii* die Aktivierung von Bax und Bak als Antwort auf pro-apoptotische Stimuli hemmen kann.

Die Hemmung der Bax-Aktivierung nach Infektion mit *T. gondii* wurde durch morphologische Untersuchung auf Einzelzellebene bestätigt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Aktivierung von Bax in HeLa-BimS-Zellen untersucht. Dazu wurde wie für die Durchflusszytometrie ein Antikörper verwendet, der ein N-terminales Epitop von Bax erkennt, das nur nach Aktivierung exponiert wird. In nicht-infizierten und infizierten Zellen, die nicht mit Tetrazyklin behandelt worden waren, trat lediglich eine sehr schwache Hintergrundfärbung von Bax auf, die gleichmäßig im Cytosol lokalisiert erschien (Abb. 22). Dies deutete darauf hin, dass in diesen Zellen keine aktivierte Form von Bax vorlag. In nicht-infizierten HeLa-BimS-Zellen, in denen Apoptose durch Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression ausgelöst wurde, konnte dagegen in nahezu der gesamten Zellpopulation aktiviertes Bax sehr deutlich nachgewiesen werden. Aktives Bax lokalisierte dabei in vesikulären, körnigen Strukturen, was mit der Lokalisierung von aktiviertem Bax an die Mitochondrienmembran vereinbar war. In einer *Toxoplasma*-infizierten Zellpopulation, in der Apoptose durch Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression ausgelöst wurde, konnte in der Mehrzahl der Zellen dagegen nur dieselbe schwache Hintergrundfärbung nachgewiesen werden wie in den nicht-behandelten Kontrollzellen. Bemerkenswerterweise war dagegen in Zellen, in die kein Parasit invadiert war, deutlich aktiviertes Bax feststellbar (Abb. 22; Pfeil). Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte dadurch bestätigt werden, dass die Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression zu einer Aktivierung von Bax führte, die jedoch durch eine Infektion der Wirtszelle mit *T. gondii* effektiv verhindert wurde. Durch Untersuchung auf Einzelzellebene konnte außerdem nachgewiesen werden, dass offensichtlich eine Invasion des Parasiten für die Hemmung von Bax notwendig war.

Abb. 22: Intrazelluläre *T. gondii* verhindern die Aktivierung von Bax nach Tetrazyklin-induzierter BimS-Expression. Im Parasit-Wirtszell-Verhältnis 20:1 infizierte und nicht-infizierte HeLa-BimS-Zellen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend fixiert. Aktives Bax (rote Fluoreszenz) und *T. gondii* (grüne Fluoreszenz) wurden durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Parallel zu jedem repräsentativen Bildausschnitt wurde eine Phasenkontrastaufnahme aufgenommen. Die Aktivierung von Bax in den unterschiedlich behandelten Zellen wurde durch konfokale Laserscanmikroskopie ausgewertet. Aktives Bax nach Tetrazyklin-Induktion in parasit-negativen Zellen einer infizierten Zellpopulation ist durch einen Pfeil angezeigt.

3.2.5 Die Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran ist in *T. gondii*-infizierten Zellen gehemmt

Die Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran nach Aktivierung von Bax durch BH3-only Proteine ist ein wichtiges Ereignis innerhalb der intrinsischen Apoptose-signal-kaskade. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von Bax mittels Immun-fluoreszenzfärbung und konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht. In infizierten und nicht-

Abb. 23: Eine Infektion mit *T. gondii* verhindert die Translokation von Bax in HeLa-WT-Zellen nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin. Im Parasit-Wirtszellverhältnis 20:1 mit *T. gondii*-infizierte HeLa-WT-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Staurosporin behandelt, um Apoptose zu induzieren. Nach Fixierung der Zellen wurden Bax (rote Fluoreszenz) und *T. gondii* (grüne Fluoreszenz) mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Repräsentative Bilder beider Fluoreszenzen wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie aufgezeichnet und überlagert.

infizierten HeLa-WT-Zellen wurde Apoptose durch Staurosporin induziert und nach Fixierung der Zellen Bax und *T. gondii* mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der Bax sowohl vor als auch nach Aktivierung, also unabhängig von der Exposition des N-Terminus erkennt. In nicht-infizierten und *Toxoplasma*-infizierten HeLa-WT-Zellen, die nicht mit Staurosporin behandelt worden waren, konnte eine diffuse Verteilung von Bax im Cytosol nachgewiesen werden (Abb. 23). Nach Induktion der Apoptose lokalisierte Bax innerhalb nicht-infizierter Zellen in konzentrierten, vesikulären Strukturen. Diese vesikulären Ansammlungen von Bax-Proteinen nach Induktion der

Apoptose stand im Einklang mit einer Translokation von Bax an die Mitochondrien. Dagegen war in infizierten Zellen Bax nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin meist gleichmäßig im Cytosol der Wirtszelle verteilt. Bemerkenswerterweise lokalisierte Bax in Zellen, in die kein Parasit invadiert war, allerdings in konzentrierten, vesikulären Strukturen (Abb 23). Durch diesen antikörper-basierten Nachweis von Bax konnte gezeigt werden, dass Bax sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten Zellen in Abwesenheit eines proapoptotischen Stimulus gleichmäßig im Cytosol der Zelle verteilt vorlag. Vor allem konnte auch gezeigt werden, dass nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin eine Translokation von endogenem Bax an die Mitochondrien erfolgte, ein Vorgang, der durch intrazelluläre *T. gondii* effektiv verhindert wurde.

In weiteren Experimenten wurde zusätzlich die subzelluläre Lokalisation von Bax in HeLa-WT-Zellen und in HeLa-BimS-Zellen untersucht, die mit einem Konstrukt aus dem Bax-Gen und dem Reportergen YFP (Bax-YFP) transfiziert worden waren. Die korrekte Insertion des Bax-Gens in den pEYFP-C1-Vektor wurde durch PCR mit Bax-spezifischen Primern nachgewiesen sowie durch Verdau mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI, die während der Klonierung flankierend an die Bax-Sequenz eingefügt worden waren (Abb. 24). Die PCR des Bax-Gens amplifizierte ein PCR-Produkt von ca. 500 bp Größe, das mit der erwarteten Größe der Bax-Sequenz übereinstimmte. Durch Restriktionsverdau von pEYFP-C1 mit HindIII und EcoRI konnte ein Insert von ca. 500 bp Größe aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Durch den Einzelverdau von pEYFP-C1 mit HindIII sowie mit EcoRI wurde das Plasmid linearisiert (Abb. 24). Durch diese Kontrollen wurde sichergestellt, dass tatsächlich pEYFP-C1-Bax für die Transfektion von HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen verwendet wurde.

Abb. 24: Plasmidkontrolle von pEYFP-Bax. Zur Kontrolle des Plasmids für die Transfektion von HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen mit Bax-YFP wurde pEYFP-Bax auf die Insertion des Bax-Gens überprüft. Das Bax-Gen wurde mittels spezifischer Primer durch PCR amplifiziert. Außerdem wurde das Bax-Insert durch Restriktionsverdau aus dem Vektor isoliert und pEYFP-C1-Bax durch Einzelverdau linearisiert.

Abb. 25A: Intrazelluläre *T. gondii* verhindern die Translokation von Bax-YFP nach Tetrazyklin-induzierter Expression von BimS. HeLa-BimS-Zellen wurden mit Bax-YFP transfiziert (grüne Fluoreszenz) und 30-40 h nach Transfektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirszellverhältnis von 20:1 infiziert oder nicht-infiziert belassen. Einundzwanzig h nach Infektion wurde die Apoptose durch Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression für 3 h ausgelöst. Die Zellen wurden fixiert, anschließend wurde *T. gondii* mit spezifischem Antiserum (blaue Fluoreszenz) und Zellen mit Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) gefärbt. Repräsentative Bilder aller Fluoreszenzen wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie aufgezeichnet und überlagert. Auf eine gleichmäßige cytosolische Verteilung von Bax-YFP in Tetrazyklin-induzierten HeLa-BimS-Zellen mit intrazellulären Parasiten wurde mit Pfeilen hingewiesen.

Um die subzelluläre Lokalisation von Bax-YFP nach Infektion mit *T. gondii* zu untersuchen, wurden HeLa-WT-Zellen und HeLa-BimS-Zellen mit pEYFP-C1-Bax transfiziert. Dreißig bis vierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit *T. gondii* infiziert oder blieben nicht-infiziert und wurden anschließend mit Tetrazyklin oder Staurosporin behandelt, um Apoptose

Abb. 25B: Intrazelluläre *T. gondii* verhindern die Translokation von Bax-YFP nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin. HeLa-WT-Zellen wurden mit Bax-YFP transfiziert (grüne Fluoreszenz) und 30-40 h nach Transfektion mit *T. gondii* infiziert oder nicht infiziert belassen. Einundzwanzig h nach Infektion wurde die Apoptose durch Staurosporin-Behandlung für 3 h induziert. Die Zellen wurden fixiert, anschließend wurde *T. gondii* mit spezifischem Antiserum (blaue Fluoreszenz) und Zellen mit Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) gefärbt. Repräsentative Bilder beider Fluoreszenzen wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie aufgezeichnet und überlagert. Auf eine gleichmäßige cytosolische Verteilung von Bax-YFP in Staurosporin-induzierten HeLa-WT-Zellen mit intrazellulären Parasiten wurde mit Pfeilen hingewiesen.

zu induzieren. Die Transfektionseffizienz betrug in beiden Zelllinien ca. 70-80%. Nach Transfektion mit YFP-Bax exprimierten sowohl HeLa-BimS-Zellen als auch HeLa-WT-Zellen Bax-YFP, das gleichmäßig im Cytosol der transfizierten Zellen verteilt war (Abb. 25A, 25B). Induktion von Apoptose durch Tetrazyklin in HeLa-BimS-Zellen (Abb. 25A) oder durch Staurosporin in HeLa-WT-Zellen (Abb. 25B) führte zur Umverteilung von Bax-YFP in

vesikuläre Strukturen, in denen Bax-YFP stark akkumulierte. Dagegen war in transfizierten Zellen, in denen Apoptose ausgelöst worden war und die vorher mit *T. gondii* infiziert worden waren, Bax-YFP wie in unbehandelten Kontrollen meist gleichmäßig im Cytosol verteilt (Abb. 25A und 25B). Wie bereits durch Immunfluoreszenznachweis von endogenem Bax gezeigt (Abb. 23), wurde auch Bax-YFP in den parasit-negativen Wirtszellen einer *Toxoplasma*-infizierten Zellpopulation in der Mehrheit in vesikulären Strukturen nachgewiesen, während in Zellen, in die mindestens ein Parasit invadiert war, die Apoptose-vermittelte Translokation von Bax-YFP verhindert wurde (Abb. 25A, 25B). Die subzelluläre Umverteilung von Bax-YFP in vesikuläre Strukturen nach proapoptotischer Stimulierung von nicht-infizierten Zellen korrelierte demnach mit der Translokation von Bax, die zuvor mit einem Bax-spezifischen Antikörper nachgewiesen worden war. Außerdem wurde auch die Hemmung der subzellulären Translokation von Bax in *T. gondii*-infizierten Zellen, die zuvor antikörperbasiert nachgewiesen worden war, durch Transfektion mit einem Bax-YFP-Reporter bestätigt. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass Bax in vitalen Zellen im Cytosol lokalisiert ist. Proapoptotische Stimuli führen zu einer Umverteilung von Bax in Vesikel, die jedoch in *T. gondii*-infizierten Zellen effektiv blockiert wird.

3.2.6 Die Oligomerisierung von Bax nach pro-apoptotischer Stimulierung ist in *T. gondii*-infizierten Zellen stark reduziert

Nach der Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran in Gegenwart von pro-apoptotischen Stimuli führt die Oligomerisierung von Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran zu der Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Die Bildung von Bax-Oligomeren ist daher für die Weiterleitung pro-apoptotischer Signale essentiell. Innerhalb der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade wurde daher der Effekt einer *T. gondii*-Infektion auf die Oligomerisierung von Bax durch pro-apoptotische Stimuli untersucht. Proteinlysate wurden mit Ethylenglycolbis(sulfosuccinimidyl)succinat (EGS) behandelt, das multimere Proteine durch kovalente Bindung in ihrer Quartärstruktur konservierte. Durch Western Blot und Immunfärbung wurde Bax anschließend als Monomer und als unterschiedlich große Oligomere nachgewiesen (Abb. 26). In Kontrolllysaten, die nicht mit EGS behandelt worden waren, lag Bax ausschließlich als Monomer vor. Durch das Kontrolllysate ohne EGS konnte erneut nachgewiesen werden, dass der Proteinlevel von Bax in *T. gondii*-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen unverändert war. Nach EGS-Behandlung zeigten nicht-infizierte Zellen, die nicht mit Tetrazyklin induziert worden waren, bereits eine geringfügige Dimerbildung von Bax (Abb. 26A), was auf eine geringfügige Aktivität des BimS-Promotors auch in Abwesenheit von Tetrazyklin hindeuten könnte. Interessanterweise

war die spontane Bax-Dimerisierung in Gegenwart von *T. gondii* deutlich gehemmt. Die BimS-Expression nach Tetrazyklin-Behandlung bewirkte eine sehr deutliche Zunahme der Oligomerisierung von Bax in nicht-infizierten Zellen. In Lysaten dieser Zellen konnten nach EGS-Behandlung eine starke Dimer- sowie Trimerbildung von Bax nachgewiesen werden. In Lysaten aus *T. gondii*-infizierten Zellen, in denen die Apoptose durch BimS-Expression induziert worden war, wurde nach EGS-Behandlung dagegen lediglich eine geringfügige Dimerbildung von Bax nachgewiesen. Die Oligomerisierung von Bax war in BimS-induzierten Zellen bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* demnach stark reduziert. Diese Daten zeigen, dass *T. gondii* eine Oligomerisierung von Bax nach Induktion der Apoptose durch BimS-Expression verhindert (Abb. 26 A).

Um zu prüfen, ob dieser Mechanismus der Apoptoseinhibierung durch *Toxoplasma* auch nach Auslösung des mitochondrialen Signalweges durch andere Stimuli wirksam war, sollten diese Daten in HeLa-WT-Zellen bestätigt werden (Abb. 26 B). In HeLa-WT-Zellen konnte nach Induktion der Apoptose mittels Staurosporin in nicht-infizierten Zellen nach EGS-Behandlung der Lysate sogar eine verstärkte Dimer-, Trimer, und Tetramerbildung von Bax und gleichzeitig eine deutliche Verringerung der Bax-Monomere nachgewiesen werden. Dagegen war in *Toxoplasma*-infizierten Zellen, die ebenfalls mit Staurosporin behandelt worden waren, die Oligomerisierung von Bax wie in HeLa-BimS-Zellen stark reduziert. Gleichzeitig konnte in HeLa-WT-Zellen nach Infektion eine Zunahme des Bax-Monomer-Proteinlevels nachgewiesen werden (Abb. 26 B). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die verminderte Bax-Aktivierung in *T. gondii*-infizierten Zellen mit einer deutlich reduzierten Oligomerisierung von Bax einhergeht.

Abb. 26: *T. gondii* verhindert die Oligomerisierung von Bax nach proapoptotischen Stimuli. In infizierten Proben und nicht infizierten Kontrollen wurde in A) HeLa-BimS-Zellen durch induzierte BimS-Expression nach Tetrazyklin-Behandlung und in B) HeLa-WT-Zellen durch Staurosporin-Behandlung die Apoptose induziert. EGS-behandelte Proteinlysate und unbehandelte Kontrolllysate wurden durch Western Blot und Bax-spezifische Immunfärbung analysiert. Eine gleichmäßige Konzentration der Proben wurde durch Aktinfärbung kontrolliert.

3.2.7 Interaktionen von Proteinen der Bcl-2-Familie und *T. gondii*

Die Aktivierung von Bax und Bak wird wesentlich durch verschiedene Interaktionen der Bcl-2-Proteine untereinander vermittelt. Dabei binden BH3-only Proteine entweder direkt an Bax und Bak oder sie binden an anti-apoptotische Proteine, die daraufhin Bax und Bak freisetzen (Huang und Strasser, 2000; Puthalakh und Strasser, 2002). Um die Interaktionen der Bcl-2-Proteine in *T. gondii*-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Zunächst wurde Bak aus Jurkat-Zellen und Bax aus HeLa-WT-Zellen durch Immunpräzipitation isoliert. Bax und Bak wurden in gleichen Mengen aus Lysaten von *Toxoplasma*-infizierten und nicht-infizierten Proben präzipitiert und durch Western Blot analysiert (nicht gezeigte Ergebnisse). Um zu untersuchen, ob möglicherweise *Toxoplasma*-Proteine mit Bax und Bak interagierten und eine Bindung durch Immunkopräzipitation nachgewiesen werden konnte, wurden die Proben mit *Toxoplasma*-spezifischen Antiseren gefärbt. Nach Immunfärbung der Western Blots mit *Toxoplasma*-spezifischen Antiseren konnten jedoch keine kopräzipitierten *Toxoplasma*-Proteine in infizierten Proben nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). So konnte auch durch Immunpräzipitation im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen gezeigt werden, dass die Proteinlevel von Bax und Bak in *T. gondii*-infizierten Zellen offensichtlich unverändert waren, es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob möglicherweise ein *Toxoplasma*-Protein an Bax und/oder Bak gebunden hatte und dadurch die Aktivierung der Multidomänenproteine verhindert wurde.

In weiteren Experimenten wurde die Affinität von BimS zu den Interaktionspartnern Mcl-1 und Bcl-2 untersucht. Interessanterweise konnte nach Immunpräzipitation von BimS deutlich mehr BimS aus Tetrazyklin-behandelten, nicht-infizierten Proben präzipitiert werden als aus unbehandelten und *Toxoplasma*-infizierten Proben (Abb. 27). Die Affinitäten von BimS zu den Interaktionspartnern Mcl-1 und Bcl-2 waren nach Infektion mit *T. gondii* allerdings unverändert. Die Mengen an kopräzipitiertem Mcl-1 und Bcl-2 waren nach Induktion der Apoptose durch Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollen ebenfalls nicht verändert. Eine direkte Interaktion von BimS mit Bax konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 27), was hinsichtlich der Modelle für die Bax-Aktivierung darauf hindeutete, dass die Aktivierung von Bax nach Tetrazyklin-induzierter BimS-Expression nicht durch direkte Aktivierung, sondern eher durch Verdrängung anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine von Bax erfolgen könnte. Auch eine Interaktion von *Toxoplasma*-Proteinen mit BimS konnte durch Immunkopräzipitation und Immunfärbung mit *Toxoplasma*-spezifischen Antiseren nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass BimS nach Infektion mit *T. gondii* keine veränderte Affinitäten mit pro- oder anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie aufwies. Außerdem konnte keine Assoziation von *Toxoplasma*-Proteinen mit BimS nachgewiesen werden.

Abb. 27: Immunpräzipitation von Bim aus Proteinlysaten von *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten HeLa-BimS-Zellen. Im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 20:1 mit *T. gondii* infizierte HeLa-BimS-Zellen und nicht-infizierte Kontrollen wurden 21 h nach Infektion für 3 h mit Tetrazyklin induziert oder unbehandelt belassen. Proteinlysate wurden zunächst mit unspezifischem Kontrollantikörper prä-adsorbiert und unspezifisch bindende Proteine durch anschließende Inkubation mit Protein G-Sepharose und Zentrifugation entfernt. Überstände der einzelnen Proben wurden mit einem Bim-spezifischen Antikörper inkubiert, anschließend wurden Antikörper-Proteinkomplexe mit Protein G-Sepharose präzipitiert. Präzipitiertes BimS und kopräzipitierte Bindungspartner wurden durch Western Blot-Analyse und spezifische Immunfärbung nachgewiesen. Als Kontrolle wurden parallel Gesamtlisate der entsprechenden Proben aufgetrennt und analysiert. Ein Ansatz der Immunpräzipitation (IP Ko), der mit Lysepuffer statt Proteinlysat durchgeführt wurde, diente zur Kontrolle spezifischer Proteine aus den Proteinlysaten.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass *T. gondii* die mitochondriale Apoptosesignalkaskade nach proapoptotischen Stimuli effektiv hemmen kann. Sowohl nach relativ unspezifischer Induktion der Apoptose durch Staurosporin als auch nach gezielter Induktion der Apoptosesignalkaskade abwärts von BimS war *T. gondii* in der Lage, Caspase-Aktivitäten deutlich zu vermindern. Durch Verwendung einer Zelllinie, die BimS unter Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors exprimierte, konnte außerdem sehr deutlich gezeigt werden, dass der Parasit mit der mitochondrialen Signalkaskade zwischen BimS-Expression und der Cytochrom c-Ausschüttung aus den

Mitochondrien interferiert. Die Proteinlevel der zentralen Multidomänenproteine Bax und Bak, die sämtliche pro-apoptotischen Signale innerhalb der mitochondrialen Signalkaskade kanalisieren, waren nach Infektion mit *T. gondii* unverändert. Aus Analysen der Proteinlevel ging hervor, dass eine Infektion mit *T. gondii* keinen Effekt auf die Proteinlevel der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x und A1 hatte. Außerdem wurde durch Versuche mit einem Transkriptionshemmer nachgewiesen, dass die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen unabhängig von der Wirtszelltranskription war. Die Apoptosehemmung beruht demnach nicht auf einer Induktion von anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle durch *T. gondii*. Es konnte jedoch deutlich nachgewiesen werden, dass *T. gondii* die Aktivierung der wichtigen proapoptotischen Moleküle Bax und Bak verhindert. Die Blockierung der Bax/Bak-Aktivierung führt in *T. gondii*-infizierten Zellen zu einer Hemmung der Bax-Translokation an die Mitochondrien und zu einer deutlich verminderten Oligomerisierung von Bax in der Mitochondrienmembran. Die Inhibierung der Bax- und Bak-Aktivierung stellt demnach einen zentralen Hemmungsmechanismus von *T. gondii* dar, der die mitochondriale Apoptosesignalkaskade nach unterschiedlichen proapoptotischen Stimuli effektiv blockieren kann.

3.3 Voraussetzungen der Hemmung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade durch *T. gondii*

Die bisher dargestellten Ergebnisse schlossen aus, dass die Inhibierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges durch *T. gondii* auf einer Degradierung pro-apoptotischer Moleküle beruht. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptosehemmung unabhängig von der Wirtszelltranskription erfolgt, wodurch eine Induktion von anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle durch den Parasiten ebenfalls ausgeschlossen wurde. Nach Immunpräzipitation von Proteinen der Bcl-2-Familie konnten anti-*Toxoplasma*-Seren kein kopräzipitiertes *T. gondii*-Protein detektieren. Um im Folgenden die parasitären Voraussetzungen für die Apoptosehemmung genauer zu charakterisieren, wurde zunächst der Zeitverlauf der Inhibierung untersucht. Des Weiteren wurden die Parasiten unterschiedlich vorbehandelt und der Effekt auf das Inhibierungspotential von *T. gondii* nach Induktion der Apoptose untersucht.

3.3.1 Kinetik der Apoptosehemmung

Um die Inhibierung des mitochondrialen Apoptosewegs durch *T. gondii* genauer zu charakterisieren, wurde untersucht, wie sich das Inhibierungspotential abhängig von der Infektionszeit verhielt. Dazu wurden HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen für unterschiedlich lange Zeiträume mit *T. gondii* infiziert und während der letzten 3 h der Infektionszeit mit Staurosporin oder Tetrazyklin behandelt, um Apoptose zu induzieren. Nach Lyse der Zellen mit NP-40-Puffer wurde die Caspase 3/7-Aktivität in den einzelnen Proben fluorimetrisch bestimmt. Das Hemmungspotential zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde aus dem prozentualen Anteil der Inhibierung im Vergleich zum nicht-infizierten Ansatz errechnet, der die gleiche Zeit parallel inkubiert und –abgesehen von der Infektion– gleich behandelt worden war. Sowohl in HeLa-WT- als auch in HeLa-BimS-Zellen war 3 h nach Infektion mit *T. gondii*, d.h. bei gleichzeitiger Induktion der Apoptose zum Zeitpunkt der Infektion keine Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 28). Dagegen konnte *T. gondii* in Abhängigkeit der fortschreitenden Infektionszeiten von rund 6 h die Caspase 3/7-Aktivität in beiden Zelllinien deutlich reduzieren. So war in HeLa-WT-Zellen die Staurosporin-induzierte Caspase 3/7-Aktivität nach einer Gesamt-Infektionszeit von 6 h auf nur noch 53% ($p < 0,05$; Student's *t*-Test), nach 9 h Infektionszeit sogar auf 26% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) der Kontrollaktivität reduziert (Abb. 28B). In HeLa-WT-Zellen war eine effektive Hemmung der Apoptose nach 9 h erreicht, die im weiteren zeitlichen Verlauf nicht deutlich weiter verstärkt wurde. Die Caspase 3/7-Aktivität war in *T. gondii*-infizierten HeLa-WT-Zellen nach 12 h

Abb. 28: Kinetik der Caspase 3/7-Inhibierung durch *T. gondii*. A) HeLa-BimS-Zellen und B) HeLa-WT-Zellen wurden für 3, 6, 9, 12 und 24 h mit *T. gondii* infiziert. Während der letzten 3 h der Infektionszeit wurde Apoptose entweder durch A) Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression oder B) Staurosporin induziert. Die Aktivität der Caspase 3/7 in den Proteinlysaten wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 3/7-spezifischem Substrat DEVD-AMC gemessen. Die Daten geben Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Versuchen an. Dabei wurde für jeden Wert die prozentuale Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zur nicht-infizierten, Apoptose-induzierten Kontrolle errechnet. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollzellen und *Toxoplasma*-infizierten Zellen wurden durch Student's t-Test identifiziert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Infektionszeit auf 25% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test), nach 24 h auf 23% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) der Caspase-Aktivitäten in nicht-infizierten Kontrollen reduziert (Abb. 28B). In HeLa-BimS-Zellen war nach 6 h Infektion mit *T. gondii* ähnlich wie in HeLa-WT-Zellen die Caspase 3/7-Aktivität auf 51% ($p < 0,05$; Student's *t*-Test) reduziert (Abb. 28A). Neun Stunden nach Infektion mit *T. gondii* war die Caspase 3/7-Aktivität nur geringfügig verändert auf 49% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) vermindert. Jedoch wurde die Caspase 3/7-Aktivität nach 12 h Infektion mit *T. gondii* weiter auf 28% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) reduziert und nach 24 h Infektionszeit sogar auf 3,2% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) der nicht infizierten Kontrollen gesenkt (Abb. 28A). Sowohl in HeLa-WT- als auch in HeLa-BimS-Zellen war die Caspase 3/7-Aktivität bereits 6 h nach Infektion mit *T. gondii* auf die Hälfte reduziert. Für eine effektive Hemmung der Apoptose war in HeLa-WT- und in HeLa-BimS-Zellen eine Infektionsdauer der Zellen von 9-12 h notwendig.

3.3.2 Voraussetzungen des Parasiten für die Apoptosehemmung

In früheren Arbeiten war gezeigt worden, dass eine Invasion der Wirtszelle durch den Parasiten notwendig ist, um die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach Induktion der Apoptose durch Actinomycin D zu hemmen (Goebel et al., 2001). Durch

Immunfluoreszenzmikroskopie konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass offensichtlich intrazelluläre Toxoplasmen notwendig sind, um die Aktivierung (siehe 3.2.4) und die Translokation von Bax (siehe 3.2.5) zu hemmen. Um die Voraussetzungen von *T. gondii* für die Hemmung des mitochondrialen Apoptosewegs genauer zu charakterisieren, wurden HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen mit unterschiedlich vorbehandelten Parasiten inkubiert und die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität mit der Hemmung durch nicht-behandelte Parasiten verglichen (Abb. 30). Die Effektivität der jeweiligen Vorbehandlung von *T. gondii* wurde parallel mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laserscanmikroskopie geprüft (Abb. 29). Unbehandelte Toxoplasmen reduzierten die Staurosporin-induzierte Caspase 3/7-Aktivität nach Infektion von HeLa-WT-Zellen auf 25% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) der Caspase 3/7-Aktivität nicht infizierter Zellen (Abb. 30B). In HeLa-BimS war die durch BimS-Expression induzierte Caspase 3/7-Aktivität durch unbehandelte *T. gondii* auf 10% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) des nicht-infizierten Kontrollansatzes vermindert (Abb. 30A). UV-bestrahlte Parasiten konnten in die Wirtszelle invadieren, waren jedoch nicht zur Replikation fähig, was durch Immunfluoreszenz bestätigt wurde (Abb. 29). Eine Infektion mit UV-behandelten Parasiten verminderte die Caspase-3/7-Aktivität in HeLa-WT-Zellen durchschnittlich auf 47% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test), in HeLa-BimS-Zellen auf 25% ($p < 0,01$; Student's *t*-Test) der Caspaseaktivität der nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 30). Die Apoptosehemmung war nach UV-Bestrahlung der Parasiten im Vergleich zu unbehandelten

Abb. 29: Wirtszellinvasion und intrazelluläre Entwicklung von unterschiedlich vorbehandelten *T. gondii*. HeLa-WT-Zellen wurden mit *T. gondii* inkubiert, die entweder unbehandelt geblieben waren oder hitzeinaktiviert wurden, mit UV-Strahlung oder Cytochalasin D behandelt worden waren. Vierzig h nach Infektion (bei Cytochalasin D-Behandlung: 9 h nach Kokultur) wurden die Zellen fixiert und durch Immunfluoreszenz analysiert. *T. gondii* wurde mit *Toxoplasma*-spezifischem Antiserum (grüne Fluoreszenz) und HeLa-WT-Zellen durch Propidiumiodidfärbung (rote Fluoreszenz) der Nukleinsäuren sichtbar gemacht. Repräsentative Bilder beider Fluoreszenzen wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie im xy-Schnitt und im xz-Schnitt aufgezeichnet und überlagert.

Parasiten daher lediglich in geringfügigem Maß beeinträchtigt. Die Immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen deuteten dabei darauf hin, dass UV-behandelte Parasiten Wirtszellen weniger effektiv infizierten als unbehandelte Kontrollen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Replikationsfähigkeit des Parasiten keine wesentliche Voraussetzung darstellt, um die Apoptose der Wirtszelle effektiv zu hemmen. Um zu überprüfen, ob die Vitalität und damit auch eine Invasion des Parasiten in die Wirtszellen notwendig war, um Apoptose zu hemmen, wurden Wirtszellen mit hitzeinaktivierten Toxoplasmen kokultiviert. Sowohl in HeLa-WT- als auch in HeLa-BimS-Zellen waren hitzeinaktivierte Parasiten nicht in der Lage, die Caspase 3/7-Aktivität signifikant zu hemmen (Abb. 30). In HeLa-WT-Zellen, die mit hitzeinaktivierten Parasiten inkubiert worden waren, lag die Caspase 3/7-Aktivität bei durchschnittlich 88%, in HeLa-BimS-Zellen bei 85% im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurde dabei bestätigt, dass hitzeinaktivierte Parasiten wie erwartet nicht zur Wirtszellinvasion fähig waren (Abb. 29). Dadurch wurde bestätigt, dass eine Invasion von lebensfähigen *T. gondii* in die Wirtszelle eine wichtige Voraussetzung für die Apoptosehemmung ist. *T. gondii* sezerniert bereits bei der Anheftung an die Wirtszelle Effektormoleküle in eine sogenannte Evakuole (Hakansson et al., 2001). Durch Vorbehandlung mit Cytochalasin D können Parasiten an die Wirtszellen

Abb. 30: Voraussetzungen von *T. gondii* für die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität. Parasiten wurden mittels UV-Strahlung, Hitzeinaktivierung oder mit Cytochalasin D oder Cycloheximid vorbehandelt und anschließend mit A) HeLa-BimS-Zellen und B) HeLa-WT-Zellen kokultiviert. Nach 6 h Infektionszeit wurde in den Wirtszellen für 3 h die Apoptose durch A) Tetrazyklin- bzw. B) Staurosporin- Behandlung induziert. Die Aktivität der Caspase 3/7 in den Proteinlysaten wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 3/7-spezifischem Substrat DEVD-AMC gemessen. Die prozentualen Caspase-Aktivitäten der mit *T. gondii* inkubierten Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle stellen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollen nach Apoptoseinduktion und Proben, die mit *T. gondii* kokultiviert worden waren, wurden durch Student's t-Test identifiziert (**p<0,01).

adhärieren, jedoch nicht mehr aktiv invadieren (Hakansson et al., 2001). Die Bedeutung der vor Invasion in die Wirtszelle sezernierten Moleküle als mögliche apoptosehemmende Faktoren des Parasiten wurde durch Inkubation von HeLa-Zellen mit Cytochalasin D-vorbehandelten Toxoplasmen untersucht. Mit Immunfluoreszenzmikroskopie von Cytochalasin D-behandelten Toxoplasmen nach Kokultur mit Wirtszellen konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* tatsächlich nicht mehr in der Lage war, aktiv die Wirtszelle zu invadieren (Abb. 29). Jedoch waren mehrfach an der Wirtszelloberfläche angeheftete Parasiten nachzuweisen, die offensichtlich mit dem Apikalkomplex zur Wirtszelle orientiert waren (Abb. 29). Sowohl in HeLa-WT-Zellen als auch in HeLa-BimS-Zellen, die mit Cytochalasin D-vorbehandelten Toxoplasmen kokultiviert worden waren, war die Caspase 3/7-Aktivität nach Induktion der Apoptose im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen auf durchschnittlich 60% des Kontrollansatzes ohne *T. gondii* signifikant gehemmt (Abb. 30). Im Vergleich zum Inhibierungspotential nicht-behandelter Parasiten wird deutlich, dass die Sekretion von Molekülen durch *T. gondii* in die Wirtszelle zur Apoptosehemmung beitragen dürfte, dass für eine effektive Hemmung der Apoptose jedoch eine Invasion der Toxoplasmen in die Wirtszelle erfolgen muss. Anschließend wurde die Bedeutung der Protein-de-novo-Biosynthese von *T. gondii* für die Inhibierung der Apoptose untersucht. Dazu wurden Parasiten zur Hemmung der Translation mit Cycloheximid vorbehandelt und während der Kokultur mit den Wirtszellen mit Cycloheximid weiterbehandelt. Diese Experimente wurden ausschließlich in HeLa-WT-Zellen durchgeführt, da die Anwesenheit eines Proteinbiosynthesehemmers die Tetrazyklin-induzierte BimS-Expression als Mittel zur Induktion von Apoptose verhindert hätte. Trotz Cycloheximid-Behandlung waren Toxoplasmen weiterhin fähig, die Caspase 3/7-Aktivität in HeLa-WT-Zellen signifikant auf 34% (** $p < 0,01$) der Caspase 3/7-Aktivität in nicht-infizierten Kontrollzellen zu reduzieren. Dieses Hemmungspotential entsprach in etwa dem nicht-behandelter *T. gondii*, die die Caspase 3/7-Aktivität auf 25% (** $p < 0,01$) verminderten. Die Protein-de-novo-Biosynthese in *T. gondii* ist demnach für die Apoptosehemmung nicht von Bedeutung.

3.3.3 Hsp70 als mögliches Effektormolekül der Apoptosehemmung

In Hitzestress-induzierten humanen Zellen hemmt eine Überexpression von Hsp70 die Aktivierung und Translokation von Bax (Stankiewicz et al., 2005). Aufgrund der konservierten Aminosäuresequenzen der Hitzeschockproteine innerhalb der Eukaryoten wurde untersucht, ob möglicherweise *Toxoplasma*-Hsp70 die Aktivierung und Translokation von Bax in Wirtszellen, die mit pro-apoptotischen Stimuli behandelt worden waren, inhibiert. Dazu wurde die Expression von Hitzeschockproteinen im Parasiten durch Vorinkubation bei 45°C für 1 h induziert. In einem zweiten Versuchsansatz wurden Toxoplasmen mit Quercetin

vorbehandelt, um die Hsp70-Synthese zu hemmen. Nach Infektion der Wirtszellen mit derart vorbehandelten *T. gondii* und unbehandelten Kontrollparasiten und Induktion der Apoptose wurde die Aktivität der Caspase 3/7 in Zelllysaten der einzelnen Proben fluorimetrisch gemessen. Das Inhibierungspotential der vorbehandelten Toxoplasmen wurde mit dem Inhibierungspotential von unbehandelten Toxoplasmen nach Induktion der Apoptose verglichen. Toxoplasmen, die zuvor einem Hitzeschock ausgesetzt worden waren, hemmten die Caspase 3/7-Aktivität ähnlich stark wie unbehandelte Parasiten (Abb. 31; $p < 0,01$, Student's *t*-Test). Dabei war in HeLa-WT-Zellen die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität nach Hitzeschockbehandlung der Parasiten mit der Hemmung durch unbehandelte Parasiten vergleichbar. In HeLa-BimS-Zellen war die Caspase 3/7-Aktivität nach Infektion mit Hitzeschock-behandelten *T. gondii* sogar höher als in Zellen, die mit unbehandelten *T. gondii* infiziert worden waren. Hitzeschockbehandlung der Parasiten führte demnach nicht zu einer verstärkten Hemmung von Wirtszellapoptose. Im zweiten Versuchsansatz war die Caspase 3/7-Aktivität nach Infektion mit unbehandelten und Quercetin-behandelten Parasiten gleichermaßen reduziert (Abb. 31; $p < 0,01$). In HeLa-BimS-Zellen führte die Quercetin-Vorbehandlung von *T. gondii* zu einer deutlichen Reduktion des Hemmungspotentials des

Abb. 31: Die Induktion bzw. die Hemmung von Hsp70 als mögliches anti-apoptotisches Effektormolekül von *T. gondii* haben keinen Effekt auf die Apoptosehemmung. Parasiten wurden für 1 h bei 45°C inkubiert oder mit Quercetin vorbehandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit A) HeLa-BimS-Zellen und B) HeLa-WT-Zellen kokultiviert. Nach 6 h Infektionszeit wurde in den Wirtszellen für 3 h die Apoptose durch A) Tetrazyklin- bzw. B) Staurosporin- Behandlung induziert. Die Aktivität der Caspase 3/7 in den Proteinlysaten wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 3/7-spezifischem Substrat DEVD-AMC gemessen. Die prozentualen Caspase-Aktivitäten der Proben im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle stellen den Mittelwert und den Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen nicht-infizierten Kontrollen nach Apoptoseinduktion und Proben, die mit *T. gondii* kokultiviert worden waren, wurden durch Student's *t*-Test identifiziert (** $p < 0,01$).

Parasiten, allerdings ohne statistische Signifikanz des Mittelwertes. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde dabei nur auf durchschnittlich 50% des Kontrollwertes reduziert ($p > 0,01$), unbehandelte Toxoplasmen dagegen waren in der Lage, die Caspase 3/7-Aktivität auf etwa 10% zu reduzieren ($p < 0,01$). Eine Hemmung der Hsp70-Synthese durch Quercetin in *T. gondii* führte jedoch nicht zu einer Verringerung des Inhibierungspotentials in HeLa-WT-Zellen ($p < 0,01$, Student's *t*-Test). Eine Beteiligung von Hsp70 an der Apoptosehemmung konnte durch diese Experimente nicht völlig ausgeschlossen werden, die Daten deuten jedoch darauf hin, dass Hsp70 von *Toxoplasma* nicht entscheidend zur Inhibierung der Wirtszellapoptose beiträgt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Invasion des Parasiten in die Wirtszelle eine Voraussetzung für die effektive Hemmung des mitochondrialen Apoptoseweges ist. Das Inhibierungspotential von *T. gondii* nimmt mit der Zeit nach Infektion zu und hat nach 9 bis 12 Stunden Infektionszeit das maximale Potential für eine effektive Hemmung der Apoptose erreicht. Die Daten nach Cytochalasin D-Vorbehandlung des Parasiten deuten darauf hin, dass eine Sekretion von Molekülen in die Wirtszelle zu der Inhibierung beiträgt, allerdings war im zeitlichen Verlauf des Inhibierungspotentials nach 3 h noch keine Hemmung der Apoptose nachzuweisen. Demnach ist für eine effektive Hemmung der Apoptose eine etablierte Infektion der Wirtszelle notwendig. Die Replikationsfähigkeit der Toxoplasmen und die Protein-de-novo-Biosynthese haben jedoch keine Bedeutung für die Apoptosehemmung. Sehr deutlich konnte eine induzierte Transkription von anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle als Mechanismus für die Apoptosehemmung ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Notwendigkeit der Invasion für die Apoptosehemmung konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung in das Cytosol aus einer direkten Interaktion von *T. gondii* mit der Wirtszelle resultieren dürfte.

4. Diskussion

Um eine obligat intrazelluläre Lebensweise zu ermöglichen, hat *T. gondii* Strategien entwickelt, die das Überleben in der Wirtszelle und die intrazelluläre Vermehrung begünstigen. Die Integrität seiner Wirtszellen spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Inhibierung der Wirtszellapoptose dürfte einen zentralen Mechanismus für das intrazelluläre Überleben und die Vermehrung von *T. gondii* darstellen und gehört auch zu den Evasionsmechanismen von zahlreichen anderen intrazellulären Mikroorganismen. *Toxoplasma* interferiert dabei auf unterschiedliche Weisen mit den Signalkaskaden seiner Wirtszelle. *T. gondii* ist in der Lage, die Apoptose nach unterschiedlichen proapoptotischen Stimuli zu inhibieren (Goebel et al., 2001; Nash et al., 1998). Innerhalb des intrinsischen Apoptosesignalweges interferiert der Parasit mit der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien. Dabei wurden bisher einige Veränderungen von regulatorischen Proteinen beschrieben, jedoch wurde der Mechanismus der Inhibierung nicht detailliert geklärt (Orlofsky et al., 1999; Goebel et al., 2001; Kim und Denkers, 2006; Carmen et al., 2006). Unterhalb der Mitochondrien verhindert *T. gondii* zusätzlich die Aktivierung der Caspase 9 (Keller et al., 2006; Schaumburg und Lüder, persönliche Mitteilung). Des Weiteren inhibiert *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ I-Zellen durch die Hemmung der Caspase 8-Aktivität und die Degradierung der Proform der Initiatorcaspase 8 (Vutova et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung nach Infektion mit *T. gondii* auf einer Interferenz mit Proteinen der Bcl-2-Familie beruht. Untersuchungen der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in Typ II-Zellen zeigten, dass der Zelltod in diesen Zellen von der Aktivierung des mitochondrialen Amplifikationsloop abhängig ist. Außerdem wurde gezeigt, dass Inhibierungsmechanismen von *T. gondii* innerhalb des mitochondrialen Signalweges für die Hemmung der rezeptorvermittelten Apoptose eine zentrale Rolle spielen.

4.1 *T. gondii* inhibiert die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II HeLa-Fas-Zellen hauptsächlich durch Interferenz mit dem mitochondrialen Amplifikationsloop

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass *T. gondii* die Apoptose in Typ II HeLa-Fas-Zellen hemmen kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass *T. gondii* den Zelltod nach Stimulation von TNF-Rezeptoren verhindert (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001). In dieser Arbeit konnte dabei erstmalig nachgewiesen werden, dass in Typ II-Zellen mehrere Mechanismen von *Toxoplasma* innerhalb dieses Apoptosesignalweges den Zelltod der Wirtszelle verhindern können. In Typ I-Zellen, in denen große Mengen der Initiatorcaspase 8 an den DISC rekrutiert und aktiviert

werden, können aktive Untereinheiten der Caspase 8 allein die Aktivierung der Effektorcaspasen bewirken (Scaffidi et al., 1998). In diesen Zellen hemmt *T. gondii* die Fas/CD95-vermittelte Apoptose effektiv durch die Degradierung der Caspase 8-Proform und die Hemmung der Caspase 8-Aktivität (Vutova et al., 2007). Die Degradierung der Caspase 8 beruht dabei offensichtlich auf einer alternativen Spaltung in *T. gondii*-infizierten Zellen (Vutova et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptose in Typ II-Zellen nach Fas/CD95-Ligation von dem mitochondrialen Amplifikationsloop und der Anwesenheit von Caspase 9 abhängig ist. Die Aktivierung der Effektorcaspasen nach Fas/CD95-Ligation wird dabei wesentlich durch Caspase 9 verstärkt. Durch einen positiven Feedbackloop der Effektorcaspasen wird zusätzlich Caspase 8 aktiviert, die über die Spaltung von Bid erneut den mitochondrialen Apoptoseweg aktiviert. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen damit, dass die Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 bedeutende Mediatoren der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade darstellen (Lakhani et al., 2006). Eine Hemmung der Caspase 9 durch den spezifischen Inhibitor LEHD-FMK in nicht infizierten HeLa-Fas-Zellen verhinderte die Aktivierung der Caspase 3/7 im Zuge des Feedbackloops nach Fas/CD95-Ligation. Dies steht im Einklang mit früheren Daten, dass die Fas/CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch Bcl-2 oder Bcl-x_L hemmbar ist (Kuwana et al., 1998; Li, 1998; Scaffidi et al., 1998). In diesen Zellen verminderte eine Infektion mit *T. gondii* die Aktivitäten der Caspasen 8, -9 und -3 und die Spaltung von Bid deutlich, wobei die genauen Interaktionen von *T. gondii* mit der Signalkaskade aufgrund der beschriebenen positiven Feedbackmechanismen von Effektorcaspasen nicht zu lokalisieren waren.

Anhand von Caspase 9-defizienten Zellen, in denen nach längerer Fas/CD95-Stimulierung eine geringe Caspase 8-Aktivität messbar war, konnte dagegen eine direkte Interferenz von *T. gondii* mit der Initiatorcaspase 8 nachgewiesen werden. Obwohl *T. gondii* in der Lage war, die Aktivität der Caspase 8 zu hemmen, konnte jedoch keine Degradierung der Proform unabhängig von Fas/CD95-Ligation nachgewiesen werden. Western Blot-Analysen mit einem Caspase 8-spezifischen Antikörper (Klon 12F5) zeigten allerdings, dass in *T. gondii*-infizierten HeLa-Fas-Zellen das alternative Spaltprodukt von 30 kDa auftrat, das mit der alternativen Spaltung der Caspase 8 durch *T. gondii* assoziiert wurde (Vutova et al., 2007). In Typ I-Zellen konnte gezeigt werden, dass dieses Spaltprodukt neben den Fragmenten von 23 kDa und 25 kDa als Caspase 8-spezifische alternative Spaltprodukte nach Infektion mit *T. gondii* auftraten, die in *T. gondii*-infizierten Caspase 8-defizienten Zellen und *T. gondii*-Lysaten fehlten (Vutova et al., 2007). Weitere Analysen in unserer Arbeitsgruppe bestätigten, dass die Degradierung der Proform von Caspase 8 und die alternative Spaltung in Fragmente von 23, 25 und 30 kDa in mehreren getesteten Zelllinien, u.a. in HeLa-Fas-Zellen, nach Infektion mit *T. gondii* induziert wurde (A. Bahnweg und C. Lüder, persönliche

Mitteilung). Die alternative Spaltung der Initiatorcaspase 8 kann somit zu der Hemmung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose in HeLa-Fas-Zellen beitragen. Allerdings spielt sie nur eine untergeordnete Rolle, da die Caspase 8 in HeLa-Fas-Zellen nach Behandlung mit anti-Fas/CD95 nur geringfügig aktiviert wird, wie die Untersuchungen mit Caspase 9-defizienten Zellen eindeutig zeigten. Diese geringen Mengen an aktiver Caspase 8 reichen jedoch aus, um die mitochondriale Amplifikationsschleife zu induzieren. In Caspase 9-defizienten Zellen waren die Aktivitäten der Caspasen 8 und -3/7 in *T. gondii*-infizierten Zellen lediglich geringfügig reduziert. Die Caspase 8 wurde demnach in Typ II-Zellen weniger effektiv durch *T. gondii* gehemmt als in Typ I-Zellen. Dagegen war *T. gondii* in der Lage, die Apoptose in Caspase 9-transfizierten Revertanten, in denen verstärkt die mitochondriale Amplifikationschleife aktiviert wurde, fast vollständig zu hemmen (Abb. 32). Die Hemmung der Apoptose in HeLa-Fas-Zellen beruht demnach hauptsächlich auf einer Inhibierung des mitochondrialen Amplifikationsloops.

Frühere Arbeiten belegen, dass *T. gondii* innerhalb des mitochondrialen Apoptosesignalwegs auch die Rekrutierung der Caspase 9 an das Apoptosom hemmen kann und so deren Aktivierung verhindert (Keller et al., 2006; Schaumburg und Lüder; persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurde auch nachgewiesen, dass *T. gondii* die Aktivierung der Bcl-2-Proteine Bax und Bak blockiert und dadurch die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach pro-apoptotischen Stimuli inhibiert (Abb. 32, siehe auch 4.2). Demnach dürften nach Fas/CD95-Ligation zwei unterschiedliche Inhibierungsmechanismen innerhalb der mitochondrialen Amplifikationsschleife eingreifen. *T. gondii* hemmt die Aktivierung von Bax und Bak sowohl nach induzierter BimS-Expression als auch nach relativ unspezifischer Apoptoseinduktion durch Staurosporin, was einen generellen Inhibierungsmechanismus auf Ebene der Bcl-2-Proteine nahelegt (siehe 4.2). Dadurch ist anzunehmen, dass *T. gondii* auch nach Spaltung und Aktivierung von Bid die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien durch die Hemmung von Bax und Bak verhindert. Ob *T. gondii* allerdings tatsächlich die Cytochrom c-Freisetzung nach Spaltung und Aktivierung von Bid inhibiert, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Für diese Untersuchung könnte z.B. die Apoptose durch zellpermeable BH3-Peptide, die von Bid abgeleitet sind, induziert werden (Schimmer et al., 2001; Li et al., 2007). Eine Untersuchung der Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung durch *Toxoplasma* nach Fas/CD95-Ligation in Caspase 9-defizienten Zellen gestaltete sich schwierig, da in Caspase 9-defizienten Zellen nur geringe Mengen Cytochrom c aus den Mitochondrien ausgeschüttet wurde. Die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung nach Fas/CD95-induzierter Apoptose in *T. gondii*-infizierten Zellen könnte daher sowohl durch Hemmung der Bax/Bak-Aktivierung resultieren (siehe 4.2) als auch eine Folge der Hemmung unterhalb der Cytochrom c-Freisetzung und einem daraufhin vermindert aktiviertem Feedbackloop durch Effektorcaspasen sein.

Abb. 32: *T. gondii* interferiert mit Apoptosesignalkaskaden seiner Wirtszelle durch mehrere Prozesse. Schematisch dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mechanismen der Inhibition von Wirtszellapoptose durch *T. gondii*. *Toxoplasma* vermittelt die Degradierung der Caspase 8-Proform und eine Hemmung der Caspase 8-Aktivität. Dieser Inhibitionsmechanismus trägt in Typ II-Zellen zu der Hemmung der Apoptose nach Fas/CD95-Ligation bei, die Apoptoseinhibition beruht allerdings hauptsächlich auf der Hemmung des mitochondrialen Amplifikationsloops durch *T. gondii*. Im mitochondrialen Apoptosesignalweg blockiert *T. gondii* die Aktivierung der zentralen pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak, ohne dabei deren Proteinexpression zu verändern. Durch multifaktorielles Eingreifen in Apoptosesignalkaskaden ist *T. gondii* in der Lage, die Apoptose seiner Wirtszelle nach unterschiedlicher pro-apoptotischer Stimulierung effektiv zu verhindern.

Im zellfreien System wurde gezeigt, dass *T. gondii* mit der intrinsischen Signalkaskade unterhalb der Mitochondrien interferiert, indem die Apoptosombildung und die Caspase 9-Aktivierung gehemmt wird (Keller et al., 2006; Schaumburg und Lüder, persönliche Kommunikation). In unserer Arbeitsgruppe wurde bestätigt, dass die Signalkaskade unterhalb der Mitochondrien in vivo gehemmt wird (Bareiß, 2007). Die zusätzliche Hemmung der Caspase 9-Aktivierung durch *T. gondii* korreliert mit der vollständigen Hemmung der Caspase 9 in HeLa-Fas-Zellen, nachdem die Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen um 60% reduziert war. Die wiederum etwas höhere Aktivität der Caspase 3 erklärt

sich aus einer geringfügigen direkten Aktivierung der Caspase 3 durch Caspase 8. Zusammenfassend bewirken daher möglicherweise zwei Inhibierungsmechanismen synergistisch eine effektive Hemmung der mitochondrialen Amplifikationsschleife nach Fas/CD95-Ligation in Typ II-Zellen.

Die in dieser Arbeit und in anderen Studien (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003; Vutova et al., 2007) gezeigten Daten über die Inhibierung der rezeptorvermittelten Apoptose durch *T. gondii* stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von Persson et al. (2007). In der genannten Studie wurde postuliert, dass durch die Ligation von Fas intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher freigesetzt werden, die den aktiven Egress der Parasiten und die Nekrose der Wirtszelle bewirken. Persson et al. konnten zeigen, dass eine Fas-Behandlung infizierter Zellpopulationen zu einer starken Zunahme von nekrotischen Wirtszellen und extrazellulärer Parasiten führte. Die Reduktion der Caspaseaktivitäten in *T. gondii*-infizierten Zellpopulationen ließe sich darauf zurückführen, dass cytoplasmatische Proteine aus nekrotischen Wirtszellen auslaufen würden.

In dieser Arbeit konnte jedoch deutlich gezeigt werden, dass die Ligation von Fas in parasit-negativen Zellen die Fragmentierung des Chromatins mit DNA-Strangbrüchen bewirkte, welches ein charakteristisches Kennzeichen der Apoptose ist, während parasit-positive Zellen vor der Apoptose geschützt waren. Des Weiteren wurde die *T. gondii*-vermittelte Hemmung der proteolytischen Spaltung und Aktivierung der Caspasen nach Fas-Ligation nachgewiesen, wobei der Proteingehalt der unterschiedlichen Proben stets durch Kontrollfärbungen von Aktin geprüft wurde. Gleichbleibende Mengen an Aktin innerhalb Fas-induzierter Proben deuten darauf hin, dass eine Infektion mit *T. gondii* nicht zu einer starken Zunahme nekrotischer Zellen führte, woraufhin die Zellinhalte ausgelaufen wären. In der Studie von Vutova et al. (2007) wurde außerdem die Degradierung der Caspase 8-Proform nach Infektion mit *T. gondii* unabhängig von der Fas-Stimulation gezeigt. Dieser Effekt kann daher nur durch eine Modulation von Caspase 8-Proteinleveln durch *T. gondii* erklärt werden und nicht durch die Nekrose infizierter Zellen nach Fas-Stimulation.

Für eine genauere Analyse dieser widersprüchlichen Beobachtungen wurde in unserer Arbeitsgruppe kürzlich die Apoptose und Nekrose von *T. gondii*-infizierten Wirtszellen nach Aktivierung von Fas untersucht (Gansz, 2008). Dazu wurden die gleichen Zellen und Parasiten wie in der Studie von Persson et al. (2007) verwendet. Die starke Zunahme von nekrotischen Zellen nach Infektion mit *T. gondii* und anti-Fas-Behandlung, die Persson beobachtet hatte, konnte dabei nicht bestätigt werden. Die Ligation von Fas führte zu einem deutlichen Anstieg an Zellen, die Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exprimierten und dadurch Annexin-positiv waren. Eine Infektion von *T. gondii* konnte die Anzahl an Annexin-positiven Zellen deutlich reduzieren, wobei jedoch die Anzahl an nekrotischen Zellen im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle nicht zunahm. Des Weiteren konnte keine

wesentliche Zunahme an extrazellulären Parasiten nach anti-Fas-Behandlung beobachtet werden (Gansz, 2008). Diese Untersuchungen konnten bestätigen, dass *T. gondii* die Apoptose seiner Wirtszelle nach Fas-Ligation effektiv verhindert und dadurch seine intrazelluläre Vermehrung begünstigt.

4.2 *T. gondii* interferiert mit dem intrinsischen Apoptose-Signalweg durch eine direkte Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie

In dieser Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass *T. gondii* die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach pro-apoptotischer Stimulierung durch eine Interferenz mit Bcl-2-Proteinen verhindert. Vor allem durch die induzierbare Expression von BimS konnte dabei erstmalig und überzeugend nachgewiesen werden, dass *Toxoplasma* mit der Signalkaskade oberhalb der Mitochondrien zwischen den BH3-only Proteinen und der Aktivierung von Bax und Bak interferiert. Damit wurde ein weiterer wichtiger Mechanismus von *T. gondii* identifiziert, die Apoptose seiner Wirtszelle zu hemmen. In der vorliegenden Arbeit konnte auch deutlich gezeigt werden, dass *T. gondii* die Aktivierung von Bax und Bak hemmt und als Folge die Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran und die Oligomerisierung von Bax verhindert (Abb. 32). Bax und Bak werden durch die Interaktion mit pro-apoptotischen BH3-only Proteinen und anti-apoptotischen BH4-Proteinen aktiviert. Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen proapoptotischen BH3-only Proteinen, anti-apoptotischen BH4-Proteinen und Bax und Bak wurden bisher jedoch nicht detailliert geklärt und sind Gegenstand aktueller Forschung (Bouillet und Strasser, 2002; Puthalakh und Strasser, 2002; Willis und Adams, 2005; Labi et al., 2006). Wie *T. gondii* in die Signalkaskade zwischen BimS und Bax und Bak eingreift, soll anhand unterschiedlicher Modelle für die Bax/Bak-Aktivierung diskutiert werden.

4.2.1 Mechanismen der Bax/Bak-Aktivierung durch BH3-only Proteine unabhängig von einer *T. gondii*-Infektion

Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen pro-apoptotischen BH3-only Proteinen, anti-apoptotischen BH4-Proteinen und Bax und Bak sind bisher nicht abschließend geklärt: Es werden dabei zwei Modelle diskutiert, wie BH3-only Proteine zu der Aktivierung von Bax und Bak führen: (i) Das Modell der direkten Bindung („direct binding model“) nimmt an, dass tBid, Bim und Puma die Multidomänenproteine Bax und Bak durch direkte Bindung aktivieren können. Die anderen BH3-only Proteine üben dagegen eine sensibilisierende Funktion aus, indem sie anti-apoptotische BH4-Proteine (z.B. Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x, A1) binden und dadurch

deren Hemmung von tBid, Puma und Bim verhindern (Kim et al., 2006; Letai et al., 2002; Kuwana et al., 2005; Häcker und Weber, 2007); (ii) Das zweite Modell der indirekten Bindung („displacement model“) beinhaltet, dass alle BH3-only Proteine mit unterschiedlicher Affinität an anti-apoptotische BH4-Proteine binden (Kuwana et al. 2005; Chen et al., 2005). Durch die Verdrängung anti-apoptotischer BH4-Moleküle von Bax und Bak werden letztere freigesetzt und aktiviert. In diesem Modell binden tBid, Puma und Bim mit hoher Affinität an alle anti-apoptotischen Proteine, während die übrigen BH3-only Proteine nur mit bestimmten Bindungspartnern assoziieren. So reichen diese BH3-only Proteine allein nicht aus, um die Apoptose zu induzieren und benötigen weitere proapoptotische Stimuli durch andere BH3-only Proteine (Kuwana et al., 2005). Beide Modelle stimmen darin überein, dass tBid, Puma und Bim die effektivsten pro-apoptotischen BH3-only Proteine sind (Häcker et al., 2006).

Bak ist ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran und ist dort mit Mcl-1 und Bcl-x_L assoziiert, wodurch Bak in einem inaktiven Status verbleibt (Willis et al., 2005). Bax ist dagegen vorwiegend im Cytosol lokalisiert (Suzuki et al., 2000; Schinzel et al., 2004). Aus 3D-Strukturanalysen von Bax ging hervor, dass die C-terminale Membraninsertionsdomäne in der gleichen Tasche geborgen ist, an die wahrscheinlich die BH3-only-Proteine bindet (Suzuki et al., 2000). Bei der Aktivierung durch BH3-only Proteine erfolgt eine Konformationsänderung der Multidomänenproteine Bax und Bak, wobei eine zuvor im Inneren des Proteins verborgene alpha-Helix an der Proteinoberfläche exponiert wird. Diese Konformationsänderung bewirkt die Dimerisierung von Bax und Bak, die Translokation von Bax zu den Mitochondrien, und die Insertion von Bax und Bak in die Mitochondrienmembran (Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998; Eskes et al., 2000). Bax und Bak oligomerisieren in der Mitochondrienmembran (Wei et al., 2000; Desagher et al., 1999; Antonsson et al., 2001), wodurch Poren in der äußeren Mitochondrienmembran entstehen, die zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren wie Smac/Diablo und Apoptosis Inducing Factor (AIF) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien führen.

Eine Interaktion von Bax und Bak mit Komponenten der mitochondrialen Permeability Transition Pore (PTP), die sich aus dem Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC), Cyclophilin D und der Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) zusammensetzt, wurde für die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien diskutiert (Shimizu et al., 2000 und 2007; Vyssokikh et al., 2004). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aktives Bax und/oder Bak ausreichen, um die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol zu bewirken (Kuwana et al., 2002; Antonsson et al., 2000). Nach neueren Erkenntnissen bewirkt tatsächlich die Oligomerisierung von Bax und Bak allein die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Baines et al, 2007). In eigenen Experimenten wurden Immunpräzipitationen der Bcl-2-Proteine durchgeführt. In HeLa-BimS-Zellen konnte gezeigt werden, dass nach Immunpräzipitation mit einem Bim-

spezifischen Antikörper nicht nur BimS präzipitiert werden konnte, sondern auch Bcl-2 und Mcl-1. Diese anti-apoptotischen BH4-Proteine wurden als Bindungspartner von Bim beschrieben (Wuillème-Toumi, 2007; O'Connor et al. 1998; Su et al. 1998). Bax konnte jedoch nicht mit BimS kopräzipitiert werden, wodurch diese Experimente eher das indirekte Modell der Bax-Aktivierung unterstützen, nach dem Bax an Mcl-1 und/oder Bcl-2 gebunden ist und dadurch in einem inaktiven Status vorliegen würde. Nach der induzierten Expression von BimS könnte BimS dann an Mcl-1 und Bcl-2 binden, woraufhin Bax freigesetzt werden würde und zu der Konformationsänderung und Aktivierung von Bax führen würde. Weitere nicht gezeigte Ergebnisse wiesen nach, dass nach Immunpräzipitation von Mcl-1 sowohl BimS als auch Bax kopräzipitiert werden konnten. Die Bindung von Bax an anti-apoptotisches Mcl-1, aber nicht an BimS, bestätigt das Modell der indirekten Aktivierung. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es möglicherweise zu zelltyp-abhängigen Unterschieden innerhalb des Bcl-2-Netzwerkes kommen kann. Zum Beispiel konnte in eigenen Experimenten auch gezeigt werden, dass in Jurkat-Zellen die Cytochrom c-Freisetzung allein durch Bak, aber nicht durch Bax induziert wurde. Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass die Interaktionen zwischen Bcl-2-Proteinen nicht universell auf jeden Zelltyp anwendbar sind. Eine Beteiligung von Bok an der Apoptosesignalkaskade in Jurkat-Zellen wurde nicht überprüft, ist jedoch nicht auszuschließen, da Bok auch teilweise in lymphalem Gewebe exprimiert werden kann (Inohara et al., 1998). Bok wurde ursprünglich in Ovar-, Hoden- und Uterusgewebe der Maus nachgewiesen (Hsu et al., 1997) und besitzt wie Bax und Bak die BH-Domänen 1-3. Bok interagiert aber nur begrenzt mit anti-apoptotischen Proteinen. Aufgrund der begrenzten Expression wurde Bok als spezifisches Multidomänenprotein in Keinzellgewebe angesehen (Hsu et al., 1997). Bok/Mtd mRNA wurde aber auch in humanem adulten Gehirn-, Leber- und Lymphgewebe nachgewiesen sowie in embryonaler Leber, Thymus, Lunge und intestinale Epithel (Inohara et al., 1998), sowie in Krebszellen wie HeLa-Zellen (Inohara et al., 1998; Gao et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Bok zunächst im Cytosol und an intrazellulären Membranen lokalisiert ist und nach pro-apoptotischer Stimulierung an die mitochondriale Membran transloziert und dort Oligomere bildet (Gao et al., 2005). Dadurch könnte Bok die Staurosporin- und BimS-induzierte Apoptose in HeLa-WT- und HeLa-BimS-Zellen zusätzlich vermitteln.

4.2.2 Modulation der intrinsischen Signalkaskade durch *T. gondii* oberhalb der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *T. gondii* die Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien durch eine Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie verhindert. Dabei wurde eindeutig gezeigt, dass *T. gondii* die Aktivierung von Bax und Bak

sowohl nach induzierter BimS-Expression als auch nach relativ unspezifischer Apoptoseinduktion durch Staurosporinbehandlung hemmt. Als Folge der *T. gondii*-vermittelten Hemmung der Bax-Aktivierung wurde die darauffolgende Translokation von Bax an die Mitochondrien und die Oligomerisierung verhindert. Interessanterweise war die Insertion von BimS in die Mitochondrienmembran dagegen nach Infektion mit *T. gondii* nicht vermindert. Damit wurde ein wichtiger Mechanismus von *T. gondii* molekular charakterisiert, durch den der Parasit mit dem intrinsischen Apoptosignalweg nach pro-apoptotischen Stimuli interferiert.

Zusätzlich konnte erstmalig eine Degradierung des Multidomänenproteins Bok durch *T. gondii* nachgewiesen werden. Über die Funktion von Bok ist bisher nur wenig bekannt und die Expression des Proteins auf bestimmte Gewebe begrenzt (siehe oben). Da Bok aber zumindest in HeLa-Zellen an der Apoptosesignalweiterleitung beteiligt ist (Inohara et al., 1998; siehe auch 4.2.1), könnte die Reduktion des Proteinlevels von Bok in *T. gondii*-infizierten Zellen zu der Apoptosehemmung durch den Parasiten beitragen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Proteinlevel von Bok nicht dosisabhängig nach Infektion mit *T. gondii* reduziert wurden und dass auch bei höchster Infektionsrate keine vollständige Degradierung erreicht wurde. Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten von Caspasen deutlich dosisabhängig herunterreguliert und bei höchster Infektionsrate vollständig inhibiert. Da auch die Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen sehr deutlich vermindert wurde und gleichzeitig eine starke Hemmung der Bax- und Bak-Aktivität nachgewiesen werden konnte, beruht der Inhibierungsmechanismus oberhalb der Mitochondrien mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Blockade der Bax/Bak-Aktivierung. Die Reduktion der Proteinlevel von Bok dürfte dagegen einen zusätzlichen, zelltypspezifischen Nebeneffekt darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Epithelzellen und lymphatischen Zellen eindeutig nachgewiesen, dass die Modulation der Aktivität von Bax und Bak und die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung durch *T. gondii* unabhängig von der Wirtszelltranskription erfolgt. Dadurch wurde gezeigt, dass die Cytochrom c-Freisetzung nach pro-apoptotischen Stimuli in *T. gondii*-infizierten Zellen nicht mittelbar durch die Induktion von anti-apoptotischen Molekülen in der Wirtszelle verhindert wird, wie aufgrund von vorherigen Daten angenommen wurde (Orlofsky et al., 1999; Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten dagegen erstmalig darauf hin, dass eine direkte Interaktion des Parasiten mit Proteinen der Bcl-2-Familie eine Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien hemmt (siehe auch 4.3). RNA-Mikroarrays (Blader et al., 2001) und Proteomanalysen (Nelson et al., 2008) von *T. gondii*-infizierten Wirtszellen zeigen, dass eine Infektion mit *T. gondii* zahlreiche Veränderungen in der Wirtszelle hervorruft, sowohl auf transkriptioneller als auch post-transkriptioneller Ebene. Dabei ist anzunehmen, dass je nach

Zelltyp mehrere und auch unterschiedliche Veränderungen innerhalb einer Signalkaskade zu beobachten sind. Die Induktion anti-apoptotischer Moleküle könnte demnach zelltyp-spezifisch zu einem anti-apoptotischen Zustand in der Wirtszelle beitragen. Jedoch ist die Aktivierung von NF- κ B mit darauf folgender induzierten Transkription von Bcl-2, A1, Bclx_L und IAPs (Molestina et al., 2003) in HeLa-Zellen und Jurkat-Zellen nicht notwendig, um die Cytochrom c-Freisetzung und die Caspase 3-Aktivität in *T. gondii*-infizierten Zellen zu hemmen, wie aus dieser Arbeit hervorgeht. Ob die Aktivierung von NF- κ B durch *T. gondii* eine wichtige Voraussetzung für die Hemmung der Apoptose darstellt (Payne et al., 2003; Molestina et al., 2003), ist daher eher fraglich. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Inhibierung der Apoptose in HL-60-Zellen durch *T. gondii* mit einer unveränderten DNA-Bindeaktivität von NF- κ B einhergeht (Lüder und Gross, 2005). Außerdem wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass in *T. gondii*-infizierten Zellen keine Aktivierung von NF- κ B erfolgt (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2002). Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Beteiligung von NF- κ B an der Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *Toxoplasma* sind daher notwendig.

Kim und Denkers (2006) zeigten, dass *T. gondii* die Staurosporin-induzierte Apoptose in Makrophagen in Abhängigkeit des Phosphatidylinositol 3-Kinase- (PI 3-Kinase) Signalweges hemmt. Die Aktivierung der PI 3-Kinase in infizierten Wirtszellen führte zur Phosphorylierung und gleichzeitiger Aktivierung der Proteinkinase B (PKB)/Akt, der Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) und Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2). Die Aktivierung von PKB/Akt resultiert in der Phosphorylierung und Inaktivierung von dem BH3-only Protein Bad und der Caspase 9 (Blume-Jensen et al., 1998; Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Zusätzlich ist PKB an der Inaktivierung des Forkhead Family Transkriptionsfaktor (FKHR1) (Brunet et al., 1999) und an der positiven Regulierung des NF- κ B-Signalweges beteiligt (Kane et al., 1999; Patra et al., 2004). Die Aktivierung von ERK bewirkt eine Phosphorylierung und Inaktivierung der Bim-Splice-Variante BimEL und möglicherweise BimL, aber nicht BimS (Ley et al., 2005). Tatsächlich war nach Hemmung der PI 3-Kinase in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen durch den Inhibitor Wortmannin der anti-apoptotische Effekt von *T. gondii* aufgehoben (Kim und Denkers, 2006). Die Autoren schlossen, dass die *T. gondii*-vermittelte Aktivierung der PI 3-Kinase die Staurosporin-induzierte Apoptose in Makrophagen hemmen konnte (Kim und Denkers, 2006). Um die Beteiligung des PI 3-Kinase-Signalweges an der Apoptosehemmung in *T. gondii*-infizierten HeLa-WT-Zellen und HeLa-BimS-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen vor Infektion mit *T. gondii* mit dem irreversiblen PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin vorbehandelt. Die Hemmung der PI 3-Kinase konnte die Apoptose-hemmung durch *T. gondii* jedoch weder in HeLa-WT-Zellen noch in HeLa-BimS-Zellen aufheben. Diese Daten belegen, dass die Aktivierung der PI 3-Kinase, die nach Infektion von Mausmakrophagen mit dem RH-Stamm

von *T. gondii* beobachtet wurde, nicht an der Hemmung des intrinsischen Apoptoseweges durch Parasiten des Stammes NTE in humanen HeLa-Zellen beteiligt ist. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass das BH3-only Protein Bad, dass durch eine Aktivierung der PI 3-Kinase hätte verstärkt phosphoryliert sein müssen, in Anwesenheit des Parasiten nicht stärker phosphoryliert war als in nicht-infizierten Zellen. Dadurch konnte in dieser Arbeit eine Aktivierung des PI 3-Kinase-Signalweges durch *T. gondii* als Inhibierungsmechanismus weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus kann auch eine posttranslationale Modifikation von Bim-Splice-Varianten durch *Toxoplasma* als unwahrscheinlich angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die *T. gondii*-vermittelte Hemmung der Bax- und Bak-Aktivierung ohne eine gleichzeitige Degradierung von pro-apoptotischen BH3-only Proteinen oder der Multidomänenproteine Bax und Bak erfolgt. Dies widerspricht Daten einer Publikation von Carmen et al. (2006), in der gezeigt wurde, dass in *T. gondii*-infizierten embryonalen Mausfibroblasten sowohl Bax als auch das BH3-only Protein Bad abhängig von der Infektionsrate degradiert waren. Die Autoren argumentierten, dass der anti-apoptotische Status in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen auch auf der Degradierung von pro-apoptotischen Proteinen beruht. Es ist jedoch unklar, ob eine Reduktion der Proteinlevel von Bad und Bax für die vollständige Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung ausreichen würde, da nachgewiesen wurde, dass nur in Bax/Bak⁻ doppelt defizienten Zellen, nicht aber in Bax⁻- oder Bak⁻ einzeln defizienten Zellen die Apoptose effektiv gehemmt werden konnte. Bax und Bak können also die Funktion des Anderen ersetzen (Wei et al., 2001). Das Fehlen oder eine Degradierung von Bak in MEF-Zellen nach *Toxoplasma*-Infektion wurde von Carmen et al. (2006) aber nicht beschrieben. Daher wäre es wichtig zu überprüfen, ob die Apoptose in MEF-Zellen ausschließlich durch Bax weitergeleitet wird oder ob auch eine Degradierung von Bak nach Infektion vorliegt. Des Weiteren wäre es wichtig, auch die Aktivierung von Bax und Bak in MEF-Zellen nach *Toxoplasma*-Infektion zu bestimmen. Sollten diese zusätzlichen Ergebnisse eine Degradierung und verminderte Aktivität von Bax, Bad und möglicherweise anderen pro-apoptotischen Proteinen belegen, wäre es naheliegend dass es sich um einen zelltyp-spezifischen Effekt oder einen stammspezifischen Effekt des *T. gondii*-RH-Stammes handelt, der in der oben genannten Studie verwendet wurde. Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, dass sich die Parasit-Wirt-Interaktionen deutlich innerhalb der drei klonalen Linien von *Toxoplasma* (Typ I, II und III) voneinander unterscheiden (Saeij et al., 2006). Dies könnte die unterschiedlichen Beobachtungen von Carmen et al. (2006) und der vorliegenden Arbeit in Hinsicht auf die Proteinlevel von Bad und Bax erklären.

T. gondii-infizierte Wirtszellen sind resistent gegen eine Reihe von pro-apoptotischen Stimuli (Nash et al., 1998; Payne et al., 2003; Lüder und Gross, 2005). Dabei führt die Bestrahlung

von Wirtszellen beispielsweise durch p53 zu der Aktivierung von Puma und Noxa während die durch Mangel an Wachstumsfaktoren oder Cytokinen induzierte Apoptose die BH3-only Proteine Bim und Bad aktiviert (Boullet und Strasser, 2002; Puthalakh und Strasser, 2002; Willis und Adams, 2005; Labi et al., 2006). Der Inhibierungsmechanismus von *T. gondii*, der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, blockiert die Aktivierung von Bax und Bak nach induzierter BimS-Expression und nach Staurosporin-Behandlung und verhindert dadurch effektiv die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. In Staurosporin-behandelten Zellen wurde keine Expression der Splice-Variante BimS nach-gewiesen (nicht gezeigte Ergebnisse). Staurosporin ist außerdem ein eher unspezifischer Apoptoseinduktor und induzierte die Apoptose unter den hier gewählten Bedingungen in 100% der behandelten Zellen. Da die anderen Bim-Splice-Varianten BimL und BimEL, die durch posttranslationale Modifikation aktiviert werden, Bax und Bak nicht so effektiv aktivieren können wie BimS (Ley et al., 2005), liegt nahe, dass in Staurosporin-behandelten Zellen die intrinsische Apoptosesignalkaskade durch andere und/oder mehrere BH3-only Proteine induziert wird. *T. gondii* ist jedoch in der Lage, die Staurosporin-induzierte und BimS-induzierte Apoptose gleichermaßen in ähnlichem Umfang zu hemmen. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass *Toxoplasma* nicht nur die durch BimS oder Staurosporin-induzierte Apoptose durch den hier beschriebenen Mechanismus hemmt, sondern generell die durch BH3-only Proteine vermittelte Signalkaskade. Zusätzlich weisen die Daten dieser Arbeit und die früherer Arbeiten (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001; siehe auch 4.3) darauf hin, dass es sich um eine direkte Interaktion des Parasiten mit der durch Bcl-2-Proteine regulierten Signalkaskade handelt. Die Interaktion eines möglichen parasitären Effektormoleküls spezifisch mit BimS kann daher weitgehend ausgeschlossen werden, da BimS in HeLa-WT-Zellen nach Staurosporin-Induktion nicht exprimiert wird. Sehr viel wahrscheinlicher ist vielmehr eine Interaktion des Parasiten entweder unterhalb von BimS oder generell mit BH3-only Proteinen, wie zum Beispiel über eine Interaktion mit der in den BH3-only Proteinen konservierten BH3-Domäne. Eine derartige Interaktion wurde z.B. für das FL1-Protein des Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) nachgewiesen, das über die Bindung der BH3-Domäne die Apoptose durch induzierte Expression von Bim, Puma und Noxa hemmt (Fischer et al., 2006). Eine weitere molekulare Strategie von *Toxoplasma* könnte darin bestehen, Effektormoleküle in die Wirtszelle zu sezernieren, die die Funktion anti-apoptotischer Moleküle übernehmen oder die Affinität von wirtseigenen anti-apoptotischen BH4-Proteinen für die pro-apoptotische Proteine Bax und Bak erhöhen. Kürzlich wurde gezeigt, dass das virale Protein vMAP (viral mitochondrial anti-apoptotic protein) des murinen γ -Herpesvirus 68 (γ HV-68) mit Bcl-2 interagiert, woraufhin mehr Bcl-2 an die Mitochondrien rekrutiert wurde und vor allem die Bindungsaffinität von Bcl-2 für pro-apoptotische BH3-only Proteine erheblich erhöht war (Feng et al., 2007). Eine verstärkte

Bindung von Bcl-2 oder Mcl-1 an Bim wurde in Immunpräzipitationen von Bim in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen. Daher kommt eher die Möglichkeit in Betracht, dass *T. gondii* Moleküle in die Wirtszelle sezerniert, die die Funktion anti-apoptotischer Moleküle übernehmen. Dabei könnten zum einen pro-apoptotische BH3-Proteine, zum anderen aber auch die Bindung und Inaktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak und möglicherweise Bok inaktiviert werden. Eine derartige Interaktion wurde nach Infektion von humanen Zelllinien mit Myxoma Virus nachgewiesen, wobei das virale M11L-Protein durch die Bindung an Bax dessen Konformation stabilisierte und dadurch die Aktivierung und Translokation an die Mitochondrien verhinderte (Su et al., 2005). In-silico-Analysen des Proteoms von *T. gondii* wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um Aminosäuresequenzen des Parasiten mit anti-apoptotischen Molekülen aus Wirtszellen und mit bekannten anti-apoptotischen viralen Effektorproteinen zu vergleichen, jedoch wurden keine Homologien gefunden (siehe auch 4.3).

Sämtliche pro-apoptotischen Signale konvergieren bei der Aktivierung der Multidomänenproteine Bax und Bak. Die Inhibierung der Bax- und Bak-Aktivierung nach Infektion mit *Toxoplasma* durch die oben diskutierten molekularen Grundlagen dürfte einen Mechanismus darstellen, der die intrinsische Apoptosesignalkaskade an einem Abschnitt hemmt, an dem pro-apoptotische Stimuli konvergieren. Ein derartiger Inhibierungsmechanismus des Parasiten würde erklären, dass *T. gondii* die Apoptose effektiv nach unterschiedlichen pro-apoptotischen Stimuli hemmen kann.

Um zu prüfen, ob *T. gondii* in der Lage ist, die Apoptose nach Aktivierung jeglicher BH3-only Proteine zu hemmen, könnten synthetische Peptide eingesetzt werden, die durch die Fusion mit einer Antennapediasequenz zellpermeabel gemacht worden sind (Li et al., 2007). Alternativ könnte die Bindung eines möglichen Effektormoleküls von *T. gondii* an Bcl-2-Proteine chromatographisch untersucht werden, indem *Toxoplasma*-Lysat an eine Säule gebunden wird und durch Reaktion mit Wirtszelllysat eventuell gebundene Bcl-2-Proteine identifiziert werden. Die Identifizierung des parasitären Effektormoleküls, das die Apoptosehemmung verursacht, sowie die detaillierte Aufklärung des Inhibierungsmechanismus, der in der vorliegenden Arbeit stark eingegrenzt werden konnte, sind wichtige Aufgaben weiterer Untersuchungen.

4.3 Voraussetzungen des Parasiten für die Hemmung des intrinsischen Apoptosesignalweges

Erste Hinweise über mögliche Mechanismen der Interaktion von *Toxoplasma* mit der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade lieferten Nash et al. (1998) und Goebel et al. (1999), die zeigten, dass ausschließlich lebende, intrazelluläre Parasiten die Apoptose

inhibieren. Dabei waren durch Pyrimethamin und Ciprofloxacin abgetötete intrazelluläre Parasiten unfähig, die Apoptose zu inhibieren (Nash et al., 1998). Die Apoptose wurde ausschließlich in parasit-positiven Zellen und nicht in parasit-negativen Nachbarzellen einer infizierten Zellpopulation gehemmt, wodurch nachgewiesen wurde, dass eine Invasion des Parasiten in die Wirtszelle eine notwendige Voraussetzung für die Apoptosehemmung ist (Goebel et al., 1999). Dadurch wurde bereits auf eine direkte Interaktion des Parasiten mit Apoptosesignalkaskaden der Wirtszelle geschlossen (Lüder und Groß, 2005). Um Veränderungen innerhalb des intrinsischen Signalweges nach Infektion mit *T. gondii* experimentell nachzuweisen und biochemisch zu charakterisieren, war aufgrund dieser Voraussetzung ein Parasit-Wirtszellverhältnis von 20:1 notwendig. Dadurch wurde eine effiziente Infektionsrate der Zellpopulationen von durchschnittlich 78 % erreicht und Veränderungen durch eine *T. gondii*-Infektion innerhalb einer infizierten Zellpopulation identifiziert. Messungen der Caspase 3/7-Aktivität in Staurosporin-behandelten oder BimS-induzierten Zellen, die mit unterschiedlich vorbehandelten Toxoplasmen infiziert bzw. kokultiviert worden waren, bestätigten, dass hitzeinaktivierte Parasiten, die nicht mehr in der Lage waren, in die Wirtszelle zu invadieren, die Apoptose nicht verhindern konnten. In Anwesenheit von hitzeinaktivierten Toxoplasmen war die Caspase 3/7-Aktivität nur in geringem Maße reduziert. Dies war möglicherweise auf indirekte anti-apoptotische Mechanismen während der Infektion zurückzuführen, wie die *T. gondii*-induzierte Sekretion von Granulozyten Kolonie-Stimulierendem Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF) oder anderen Wachstumsfaktoren, die eine erhöhte Expression von Mcl-1 induzieren können (Channon et al., 2002). UV-behandelte Toxoplasmen waren dagegen in der Lage, die Apoptose effektiv zu inhibieren. Deshalb stellt die Replikationsfähigkeit von *T. gondii* keine Voraussetzung für die Apoptosehemmung dar. Das Inhibierungspotential von unbehandelten Toxoplasmen wurde dabei nicht vollständig erreicht, was möglicherweise auf eine leicht reduzierte Infektiosität UV-bestrahlter Parasiten zurückzuführen war. Dennoch konnte deutlich nachgewiesen werden, dass Toxoplasmen, die sich nicht mehr vermehren konnten, die Apoptose ihrer Wirtszellen verhindern konnten, wodurch bisherige Daten von Goebel et al. (2001) auf die hier verwendeten Apoptosemodelle ausgeweitet wurden.

In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass eine Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung und der Caspase 3/7-Aktivität in infizierten Wirtszellen erfolgte, in denen die RNA-Synthese vor der Infektion mit *T. gondii* durch Actinomycin D gehemmt worden war. Dadurch wurde der wichtige Nachweis erbracht, dass die hier erstmalig nachgewiesene Hemmung der Bax/Bak-Aktivierung nicht auf der Induktion anti-apoptotischer Moleküle nach *T. gondii*-Infektion beruht, sondern eher auf einer direkten Interaktion des Parasiten mit Proteinen der Bcl-2-Familie. In Zusammenarbeit mit Jonathan Wastling (Liverpool) konnte eine Hochregulierung der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2, Bcl_{X_L}, Bcl-w, Bcl-x und A1 auch durch

Proteomanalyse *T. gondii*-infizierter HFF-Zellen weitgehend ausgeschlossen werden. Eine Induktion der anti-apoptotischen Moleküle Mcl-1 (Goebel et al., 2001), A1/Bfl-1 (Orlofsky et al., 1999) oder die Induktion NF- κ B-regulierter Gene (Payne et al., 2003) könnte demnach zelltyp-spezifisch zusätzlich zur Hemmung der Bax/Bak-Aktivierung beitragen. Sie ist jedoch keine notwendige Bedingung für die Inhibierung der Cytochrom c-Freisetzung in *T. gondii*-infizierten Zellen.

Aufgrund des Hinweises auf eine direkte Interaktion eines parasitären Effektormoleküls mit der Signalkaskade konnte die Injektion der Evakuole durch *T. gondii* in die Wirtszelle kurz vor der Invasion (Hakansson et al., 2001) eine Rolle bei der Apoptosehemmung spielen. Deren mögliche Beteiligung wurde durch eine Vorbehandlung der Parasiten mit Cytochalasin D untersucht. Cytochalasin verhindert die Aktinpolymerisierung und dadurch eine aktive Invasion des Parasiten, wobei die Adhäsion an die Wirtszelle und die Sekretion der Organellen des Apikalkomplexes nicht beeinträchtigt wird. Tatsächlich war die Caspase 3/7-Aktivität in HeLa-WT und HeLa-BimS-Zellen auf etwa 60% des Kontrollwertes reduziert. Die Caspase 3/7-Aktivität war damit durch Cytochalasin D-behandelte Parasiten etwa halb so stark gehemmt wie durch lebende, unbehandelte Toxoplasmen. Messungen der Caspase 3/7-Aktivität nach unterschiedlichen Infektionszeiten deuteten darauf hin, dass eine etablierte Infektion für eine effektive Hemmung der Caspase 3 notwendig ist. Dies schließt eine Beteiligung der Evakuole an der Apoptosehemmung jedoch nicht aus, da Proteine längere Zeit in der Evakuole verbleiben können, bis sie in das Wirtszellcytosol gelangen (Hakansson et al., 2001).

Durch Hemmung der Proteinbiosynthese nach Vorbehandlung der Toxoplasmen mit Cycloheximid sollte untersucht werden, ob eine Protein-de-novo-Synthese der Parasiten eine Voraussetzung für die Apoptosehemmung ist. Nach Infektion wurde mit Cycloheximid weiterbehandelt, so dass von einer gleichzeitigen Hemmung der Proteinbiosynthese in den Wirtszellen auszugehen war. Ein Versuchsansatz mit HeLa-BimS-Zellen (nicht gezeigte Ergebnisse) zeigte jedoch, dass die Proteinsynthese zumindest in der Wirtszelle nur teilweise gehemmt war, da 40% der Caspase 3/7-Aktivität von nicht-infizierten Kontrollzellen erreicht wurde, obwohl die Behandlung mit Cycloheximid eine Expression von BimS hätte verhindern sollen. Dadurch konnte durch diese Inhibierungsversuche nicht geklärt werden, ob die Hemmung der Apoptose in infizierten Wirtszellen von der Protein-de-novo-Synthese in *T. gondii* abhängig ist. Allerdings zeigten Messungen der Caspase 3/7-Aktivität nach Induktion der Apoptose nach unterschiedlichen Infektionszeiten, dass das Inhibierungspotential von *T. gondii* mit der Zeit nach der Infektion kontinuierlich anstieg und nach 9-12 Stunden ein Maximum erreichte. Diese Daten legen nahe, dass ein Effektormolekül des Parasiten kontinuierlich sekretiert wird und aus der PV in das Wirtszellcytosol gelangt. Arbeiten von Nash et al. (1998), in denen gezeigt wurde, dass abgetötete intrazelluläre

Parasiten unfähig sind, die Apoptose zu hemmen (siehe oben), und die Kinetik der Apoptoseinhibierung in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Metabolismus des Parasiten innerhalb der parasitophoren Vakuole für die Inhibierung der Apoptose wichtig ist. Diese Daten widersprechen einer Beteiligung der Evakuole an der Apoptosehemmung, deren Bedeutung in weiteren Experimenten untersucht werden sollte.

Da die PVM wie ein molekulares Sieb fungiert (Schwab et al., 1994), diffundieren Moleküle bis 1300 Da durch Poren der Membran hindurch. So könnte ein von *T. gondii* sezerniertes Effektormolekül in das Wirtszellcytoplasma gelangen. Die Sekretion von Molekülen der Dichten Granula in die parasitophore Vakuole (Cesbron-Delauw, 1994) könnte dabei eine Rolle spielen. Eine Beteiligung von Molekülen der Dichten Granula sowie der Mikronemen und Rhoptrien an der Apoptosehemmung sollte durch eine liposomale Transfektion von Wirtszellen mit angereicherten Fraktionen der sekretorischen Organellen oder durch Mikroinjektion in weiteren Experimenten weiter untersucht werden. Eine Interaktion eines parasitären Effektormoleküls mit Bcl-2-Proteinen könnte auch durch Moleküle von *Toxoplasma* vermittelt werden, die bei der Modifikation der PVM durch den Parasiten während der Invasion in die Membran eingebaut werden. ROP2 z.B. ist in der PVM verankert und vermittelt durch den N-Terminus, der zum Wirtszellcytosol hin exponiert ist, die Assoziation der PV mit den Wirtszellmitochondrien (Sinai und Joiner, 2001). Aufgrund der engen Assoziation zwischen PVM und Wirtszellmitochondrien wäre eine Modulation der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade durch parasitäre Membranproteine der PVM denkbar.

Hsp70 verhindert die Aktivierung von Bax und die Translokation von Bax an die Mitochondrienmembran (Stankiewicz et al., 2005). Es stellte daher ein vielversprechendes parasitäres Effektormolekül bei der Hemmung der Bax-Aktivierung durch *T. gondii* dar. In dieser Arbeit wurden allerdings keine Hinweise auf die Beteiligung von Hsp70 an der Apoptosehemmung gefunden. Die hier verwendeten experimentellen Ansätze müssen jedoch als nicht hinreichend spezifisch angesehen werden, um abschließend zu klären, ob Hsp70 an der Interaktion mit Bcl-2-Proteinen beteiligt sein könnte. So ist die Hemmung der Hsp70-Synthese durch Quercetin sehr unspezifisch und eine mögliche Induktion durch Hitzeschockbehandlung der Toxoplasmen wurde nicht überprüft.

Eine mögliche Strategie des Parasiten könnte darin bestehen, ein anti-apoptotisches Molekül in die Wirtszelle zu sezernieren, das den antiapoptotischen Molekülen Mcl-1 oder Bcl-2 in ihrer Funktion entspricht. Da die Proteine der Bcl-2-Familie über konservierte Domänen miteinander interagieren, wurde durch In-Silico-Analysen das Proteom von *T. gondii* ME49 mittels PFAM-Suche auf homologe Aminosäuresequenzen der BH1-4-Domänen untersucht. Dabei wurde mittels eines Computerprogramms aus den konservierten Domänen einer Proteinfamilie (daher: PFAM) eine Konsensussequenz von Aminosäuren erstellt, nach der im

T. gondii-Proteom gesucht wurde. Zusätzlich wurde ein Alignment des *T. gondii*-Proteoms mit verschiedenen bekannten viralen Proteinen durchgeführt, die Apoptose inhibieren. Keiner dieser beiden Ansätze lieferte jedoch Kandidatenproteine mit signifikanter Homologie zu anti-apoptotischen Proteinen oder Domänen. Dagegen wurde eine signifikante Homologie eines *Toxoplasma*-Proteins mit humanem Beclin gefunden, das zu der Gruppe der BH3-Proteine gezählt wird, jedoch an der Signalweiterleitung der Autophagie beteiligt ist. Da neben Apoptose die Autophagie eine wichtige Bedeutung als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene hat (Labbé und Saleh, 2008), könnte Beclin als Autophagie-hemmendes Molekül eine Rolle spielen, um die Integrität der infizierten Wirtszelle zu bewahren. Des Weiteren wurde Beclin als Bcl-2-bindendes Molekül identifiziert, das durch die Interaktion mit Bcl-2 den Sindbis-Virus-induzierten Zelltod hemmt (Liang et al., 1998). Eine mögliche Beteiligung von Beclin an der Hemmung der Apoptose durch *T. gondii* sollte daher weiterhin untersucht werden.

4.4 In vivo-Bedeutung der Apoptose und therapeutische Ansätze

Eine Infektion mit *Toxoplasma* durchläuft zunächst die akute Phase, die durch eine schnelle Replikation der Tachyzoiten und die Dissemination im Organismus gekennzeichnet ist. Darauf folgt die chronische Phase, in der sich ruhende Gewebezysten im Zentralen Nervensystem und in der Skelettmuskulatur bilden (Krahenbuhl und Remington, 1982). *T. gondii* induziert eine starke zellvermittelte Immunabwehr, die sowohl für die Kontrolle der akuten Phase als auch der chronischen Phase von Bedeutung ist. Die klinische Bedeutung der zellvermittelten Immunabwehr wird im Fall einer Reaktivierung von Gewebezysten in *Toxoplasma*-seropositiven HIV-Patienten deutlich, wobei eine unkontrollierte Replikation von Tachyzoiten im ZNS zu einer lethalen Enzephalitis führen kann (Luft et al., 1984). Die zellvermittelte adaptive Immunabwehr setzt sich aus Makrophagen- und B-Zell-stimulierenden CD4⁺-Zellen und zytotoxischen CD8⁺-Zellen zusammen. Vor allem CD8⁺-, aber auch CD4⁺-T-Zellen können in infizierten Zellen entweder durch Sekretion von Perforin und Granzym B oder durch Ligation von Fas Apoptose induzieren. Während der Toxoplasmose spielen beide Zellpopulationen aufgrund ihrer IFN- γ -Produktion eine wichtige Rolle für eine effektive Abwehr des Parasiten. CD8⁺-Zellen zeigen außerdem deutlich zytotoxische Aktivitäten während der Toxoplasmose (Hakim et al., 1991; Subauste et al., 1991). Nach einer Vakzinierung sind CD8⁺-Zellen notwendige Effektorzellen für einen Schutz vor einer Infektion (Gazzinelli et al., 1991), und allein der Transfer von spezifischen CD8⁺-Zellen führt in Mäusen zu einem ausreichenden Schutz gegen folgende *T. gondii*-Infektionen (Suzuki und Remington, 1998; Khan et al., 1994). Interessanterweise ist die Produktion von IFN- γ essentiell für die Kontrolle der akuten Infektion, während die Perforin-abhängige

Zytotoxizität lediglich begrenzt dazu beiträgt (Denkers et al., 1997). Spezifische CD8⁺-Zellen können auch eine Reaktivierung von latenten Parasitenstadien im immunkomprimierten Wirt verhindern (Khan et al., 1999). Zusätzlich zu der Produktion von IFN- γ , die eine dominante Rolle in der Kontrolle der chronischen Phase einnimmt, würde eine Perforin-vermittelte Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten zusätzlich die Reaktivierung von Gewebezysten im Gehirn verhindern, was den direkten Kontakt von zytotoxischen Effektorzellen und infizierten Zellen voraussetzt (Denkers et al., 1997). Tatsächlich wurden Infiltrate von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen während der chronischen Phase der Toxoplasmose im Gehirn gefunden, und ihre Antikörper-vermittelte Depletion führte zu einer Reaktivierung persistierender Parasiten und zum Tod des Wirtes (Gazzinelli et al., 1992; Hunter und Remington, 1994). Zytolytische Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten beruht neben der Sekretion von Perforin auch auf der Interaktion von Fas mit Fas-Liganden (Lowin, 1994; Kägi et al., 1994). Die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose während der Toxoplasmose wurde in vivo bisher nicht weitgehend untersucht. Eine Studie mit Fas- und FasL-defizienten Mäusen untersuchte die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose während der akuten Infektion (Shen et al., 2001). Dabei wurde nach Infektion mit *T. gondii* nur eine geringfügig höhere Anzahl von Gewebezysten in Fas- und FasL-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Shen et al., 2001). Dies steht im Einklang mit Untersuchungen zur Perforin-vermittelten Apoptose und zeigt, dass zytotoxische Aktivitäten der CD8⁺-Zellen lediglich begrenzt zu der Kontrolle der akuten Phase der Infektion beitragen, während andere Abwehrmechanismen wie die Sekretion von IFN- γ weitaus bedeutendere Effektormechanismen darstellen.

Allerdings ist bei diesen Studien zu berücksichtigen, dass die auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Inhibierungsmechanismen von *T. gondii* zumindest die Fas-vermittelte Apoptose stark beeinträchtigen dürfte. Genaue Kenntnisse der Effektormoleküle von *Toxoplasma* zur Apoptoseinhibierung und die Möglichkeit, diese Effektormoleküle auszuschalten, könnte möglicherweise zu neuen Therapien beitragen, in der gezielt infizierte Zellen effizienter abgetötet werden und intrazelluläre Parasiten von Phagozyten aufgenommen werden. Dieser Ansatz wurde auch bereits als Beitrag zu einer Vakzinierung mit Toxoplasmen diskutiert, die durch Strahlung attenuiert wurden (James und Green, 2004.) Demnach könnten durch Bestrahlung attenuierte Toxoplasmen, die ihre Fähigkeit zur Invasion bewahrt haben (Hiramoto et al., 2002), deren Mechanismen zur Inhibierung der Apoptose jedoch gleichzeitig gehemmt werden, nach der Apoptose ihrer Wirtszelle phagozytiert werden und würden durch die Präsentation von *T. gondii*-spezifischen Antigenen auf antigen-präsentierenden Zellen die Immunantwort stimulieren (James und Green, 2004). Die Attenuierung von Parasiten durch Bestrahlung stellt jedoch eine sehr unsichere Vakzinmöglichkeit dar, da die notwendigerweise geringfügige Strahlungsdosis zur

Erhaltung der Invasionfähigkeit das Risiko beinhaltet, dass ein Anteil der Toxoplasmen nicht ausreichend attenuiert ist, sondern sich weiter replizieren und disseminieren könnte. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass UV-bestrahlte Toxoplasmen weiterhin in der Lage sind, die Apoptose zu inhibieren. Kürzlich konnte in einem vielversprechendem Ansatz gezeigt werden, dass die Vakzinierung von Mäusen mit rekombinantem Pseudorabies-Virus, der das immundominante SAG1-Oberflächenantigen exprimiert, zu einer effektiven Immunantwort führte (Liu et al., 2008). Dabei wurde neben einer starken Produktion von IL-12 und IFN- γ in vivo auch eine verstärkte Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten in vitro nachgewiesen (Liu et al., 2008). Diese Immunisierung induzierte einen partiellen Schutz (60%) gegen eine folgende Infektion mit dem virulenten RH-Stamm (Liu et al., 2008). Möglicherweise könnte die therapeutische Hemmung von Inhibierungsmechanismen der Apoptose in *T. gondii*-infizierten Zellen daher tatsächlich zu einer effizienteren Beseitigung des Parasiten durch zytotoxische T-Lymphozyten führen.

Es ist weitgehend anerkannt, dass intrazelluläre Pathogene durch induzierten Zellstress den intrinsischen Signalweg der Apoptose auslösen. Als Folge haben zahlreiche Pathogene Mechanismen entwickelt, den Zelltod ihrer Wirtszelle zu verhindern (Schaumburg et al., 2006; Häcker, 2002; Benedict et al., 2002). Effektormoleküle für die Inhibierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs wurden bereits für einige Viren identifiziert und gezeigt, dass ein Fehlen dieser Effektormoleküle die Induktion der Apoptose nach Infektion hervorruft (Fischer et al., 2006). Experimentelle Nachweise für eine Induktion der Apoptose durch Parasiten stehen allerdings noch am Anfang. An *Plasmodium berghei* konnte nach Deletion des Gens für das Oberflächenprotein P36p erfolgreich gezeigt werden, dass mit P36p-defizienten Plasmodien infizierte Hepatozyten signifikant höhere Level an Apoptose erreichten als mit dem Wildtyp infizierte Zellen (van Dijk et al., 2005). Auf die Antigenpräsentation von parasitären Molekülen im Kontext von Wirtszellapoptose wurde bereits als zusätzlicher Mechanismus für die Induktion der Immunabwehr durch Strahlungs-attenuierte Sporozoiten hingewiesen (Leiriao et al., 2005). Der Wirtszellapoptose nach Infektion mit P36p-defizienten Plasmodien wurde nun auch eine mögliche Beteiligung an der Induktion einer protektiven Immunabwehr durch genetisch-attenuierte Sporozoiten zugeschrieben (van Dijk et al., 2005).

Die weitere Aufklärung der Mechanismen, wie *T. gondii* intrinsische Apoptosesignalwege seiner Wirtszelle blockiert, könnte möglicherweise auch zu der Entwicklung therapeutischer Agenzien beitragen, die die Apoptoseinhibierung durch den Parasiten aufheben. In den letzten Jahren wurden in der Krebsforschung Medikamente entwickelt, die einer Überexpression anti-apoptotischer Moleküle entgegenwirken, um gezielt in Krebszellen Apoptose induzieren zu können (Oltersdorf et al., 2005; Tse et al., 2008). Das Agens ABT-

737 initiiert dabei z.B. nicht direkt die Apoptose, sondern erhöht den Effekt pro-apoptotischer Signale (Oltersdorf et al., 2005), unter anderem auch die TRAIL-induzierte Apoptose (Huang und Sinicrope, 2008). Daher ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, ob der *T. gondii*-induzierte anti-apoptotische Shift durch die Modulation der Bcl-2-Proteine in infizierten Wirtszellen durch derartige Agenzien aufgehoben werden könnte. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ABT-737 eine Regression von etablierten Tumoren bewirkt (Oltersdorf et al., 2005). Eine derartiges Therapeutikum könnte in der Therapie einer *T. gondii*-Infektion eine Reduktion der Replikation des Parasiten in der Wirtszelle und die darauffolgende verringerte Verbreitung im Organismus erzielen. Ein solches Agenz wäre allerdings wahrscheinlich lediglich als Unterstützung einer Therapie sinnvoll, die in der Lage ist, den Parasiten abzutöten, wie durch Hemmung essentieller Stoffwechselvorgänge des Parasiten. Eine gleichzeitige Aufhebung von Evasionsmechanismen wie die Apoptose-inhibierung könnte allerdings durch eine effizientere Eliminierung infizierter Zellen durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten oder durch stress-induzierte Apoptose und eine effizientere Antigenpräsentation zu einer verbesserten Immunantwort beitragen und eine Toxoplasmose-Therapie sinnvoll unterstützen.

5. Literatur

Ackerman AL, Cresswell P (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-84

Adams JM, Cory S (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6

Alexander J, Hunter CA (1998): Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem Immunol* 70, 81-102

Alnemri ES (1997): Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64, 33-42

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC (2000): Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345, 271-8

Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001): Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276, 11615-23

Arends, M und Willie A H (1991): Apoptosis: mechanisms and role in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32, 223-254

Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007): Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550-5

Barei B, (2007): Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3-Aktivität durch *Toxoplasma gondii*. Bachelorarbeit, Studiengang Molekulare Medizin, Medizinische Fakultät Göttingen

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B (1999): Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis* 31, 305-9

Benedict CA, Norris PS, Ware CF (2002): To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 3, 1013-8

Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC (2001): Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem* 276, 24223-31

Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T (1998): The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8, 779-82

Boothroyd JC, Grigg ME (2002): Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5, 438-42

Bouillet P, Strasser A. (2002): BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-74

Britt RH, Enzmann DR, Remington JS (1981): Intracranial infection in cardiac transplant recipients. *Ann Neurol* 9, 107-19

- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68
- Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY (2001): *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 167, 2193-201
- Buxton D (1998): Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* 29, 289-310
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-21
- Carmen JC, Hardi L, Sinai AP (2006): *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol* 8, 301-15
- Carruthers VB (2002): Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 81, 111-22
- Carruthers VB, Sibley LD (1997): Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73, 114-23
- Cerwenka A, Lanier LL (2001): Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1, 41-9
- Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 10, 293-6
- Channon JY, Miselis KA, Minns LA, Dutta C, Kasper LH (2002): *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 70, 6048-57
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403
- Clarke PG (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181, 195-213
- Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtél D, Tardieux I (2006): CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107, 309-16
- Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D (1997): Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 20317-20
- del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G (1997): Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-9
- Denkers EY, Gazzinelli RT (1988): Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11, 569-88

- Denkers EY, Yap G, Scharton-Kersten T, Charest H, Butcher BA, Caspar P, Heiny S, Sher A (1997): Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. J Immunol 159, 1903-8
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999): Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J Cell Biol 144, 891-901
- DosReis GA, Barcinski MA (2001): Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. Adv Parasitol 49, 133-61
- Dubey JP, Rommel M (1992): Abortions caused by protozoa in agricultural animals. Dtsch Tierarztl Wochenschr 99, 355-62
- Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA (1993): Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol Res 79, 402-8
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 68, 383-424
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391, 43-50
- Endo T, Pelster B, Piekarski G (1981): Infection of murine peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii* exposed to ultraviolet light. Z Parasitenkd 65, 121-9
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000): Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. Mol Cell Biol 20, 929-35
- Evengård B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson SA, Teär-Fahnehjelm K, Forsgren M, Gilbert R, Malm G (2001): Low incidence of *toxoplasma* infection during pregnancy and in newborns in Sweden. Epidemiol Infect 127, 121-7
- Feng P, Liang C, Shin YC, Xiaofei E, Zhang W, Gravel R, Wu TT, Sun R, Usherwood E, Jung JU (2007): A novel inhibitory mechanism of mitochondrion-dependent apoptosis by a herpesviral protein. PLoS Pathog 3, 174
- Fischer SF, Ludwig H, Holzapfel J, Kvansakul M, Chen L, Huang DC, Sutter G, Knese M, Häcker G (2008): Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. Cell Death Differ 15, 1532
- Fouts und Boothroyd, 2007. Cellular response to infection. In: *Toxoplasma*. Molecular and cellular biology. Herausgegeben von Aijoka und Soldati in Horizon Biosciences, Norfolk, UK
- Frenkel JK (1988): Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol Today 4, 273-8
- Friese K, Weigel M, Melchert F (1994): Diagnosis and therapy of congenital toxoplasmosis. Geburtshilfe Frauenheilkd 54, M99-101
- Gansz M (2008): Modulation von Fas/CD95-vermittelter Apoptose durch *Toxoplasma gondii*: Aktive Inhibierung oder nekrotischer Zelltod? Bachelorarbeit, Studiengang Molekulare Medizin, Medizinische Fakultät Göttingen

- Gao S, Fu W, Dürrenberger M, De Geyter C, Zhang H (2005): Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell Mol Life Sci* 62, 1015-24
- Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A (1992): Simultaneous depletion of CD4⁺- and CD8⁺-T-lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149, 175-80
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A (1991): Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146, 286-92
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Júnior R (1992): An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 114, 136-44
- Goebel S, Gross U, Lüder CG (2001): Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J Cell Sci* 114, 3495-505
- Goebel S, Lüder CG, Gross U (1999): Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med Microbiol Immunol* 187, 221-6
- Goebel S, Lüder CG, Lugert R, Bohne W, Gross U (1998): *Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells. *Tokai J Exp Clin Med* 23, 351-6
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC (2001): Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294, 161-5
- Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP (2001): Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184, 633-9
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998): Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17, 3878-85
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-911
- Gross U, Bohne W (1994): *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. *J Eukaryot Microbiol* 41, 10S-11S
- 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, 4511-6
- Gubbels MJ, Striepen B, Shastri N, Turkoz M, Robey EA (2005): Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 73, 703-11
- Häcker G, Fischer SF (2002): Bacterial anti-apoptotic activities. *FEMS Microbiol Lett* 211, 1-6
- Häcker G, Kirschnek S, Fischer SF (2006): Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Med Microbiol Immunol* 195, 11-9

- Häcker G, Weber A (2007): BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? Arch Biochem Biophys 462, 150-5
- Håkansson S, Charron AJ, Sibley LD (2001): *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J 20, 3132-44
- Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hieny S, Shearer GM, Sher A (1991): CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. J Immunol 147, 2310-6
- Halonen SK, Weidner E (1994): Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. J Eukaryot Microbiol 41, 65-71
- Hasnain SE, Begum R, Ramaiah KV, Sahdev S, Shajil EM, Taneja TK, Mohan M, Athar M, Sah NK, Krishnaveni M (2003): Host pathogen interactions during apoptosis. J Biosc 28, 349-358
- Hauser WE Jr, Sharma SD, Remington JS (1982): Natural killer cells induced by acute and chronic *toxoplasma* infection. Cell Immunol 69, 330-46
- Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-6
- Hiramoto RM, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF Jr (2002): 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. Vaccine 20, 2072-81
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ (1997): Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. Proc Natl Acad Sci USA 94, 12401-6
- Huang S, Sinicrope FA (2008): BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. Cancer Res 68, 2944-51
- Huang DC, Strasser A (2000): BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. Cell 103, 839-42
- Hung RWY, Chow AW (2004): Dissecting the "end game": Clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis. Med Clin Exp 27, 324-344
- Hunter CA, Remington JS (1994): Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. J Infect Dis 170, 1057-67
- Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, Merry A, Chen S, Núñez G (1998): Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. J Biol Chem 273, 8705-10
- Israelski DM, Remington JS (1993): Toxoplasmosis in patients with cancer. Clin Infect Dis 17, S423-35
- James ER, Green DR (2004): Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. Trends Parasitol 20, 280-7
- Janku J. (1923). Pathogenesa a patologicka anatomie tak nazvaného vrozeného nálezem parazitu v sitnici. Cas Lek Ces 62: 1021-7

- Jenum PA, Kapperud G, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J (1998): Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Epidemiol Infect* 120, 87-92
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I (1990): *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 641-6
- Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P (1994): Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-30
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999): Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9, 601-4
- Kaufmann SH, Hengartner MO (2001): Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11, 526-34
- Keller P, Schaumburg F, Fischer SF, Häcker G, Gross U, Lüder CG (2006): Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 258, 312-9
- Nicolle C und Manceaux L (1909): Sur un protozoaire nouveau du gondi. *CR Hebd. Séances Acad Sci* 148, 369-372
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57
- Khan IA, Ely KH, Kasper LH (1994): Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 152, 1856-60
- Kim JY, Ahn MH, Jun HS, Jung JW, Ryu JS, Min DY (2006): *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation. *Yonsei Med J* 47, 862-9
- Kim L, Denkers EY (2006): *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *J Cell Sci* 119, 2119-26
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-88
- Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever-Bonnet H (1986): Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1, 254-6
- Krahenbuhl JL und Remington JS (1992): Immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. In: Immunology of parasitic infections. Cohen S und Warren KS, eds. Blackwell Scientific Publications. London, p356
- Kumar S, Colussi PA (1999): Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24, 1-4
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005): BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-35

- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002): Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-42
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S (1998): Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273, 16589-94
- Kyes S, Horrocks P, Newbold C (2001): Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* 55, 673-707
- Labbé K, Saleh M (2008): Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 15, 1339-49
- Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A (2006): BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* 13, 1325-38
- Lang C, Gross U, Lüder CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 100, 191-203
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006): Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847-51
- Langermans JA, van der Hulst ME, Nibbering PH, van Furth R (1992): Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun* 60, 5107-12
- Leiriao P, Mota MM, Rodriguez A (2005): Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. *J Infect Dis* 191, 1576-81
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-92
- Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ (2005): Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 12, 1008-14
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89
- Li R, Boehm AL, Miranda MB, Shangary S, Grandis JR, Johnson DE (2007): Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia* 9, 801-11
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B (1998): Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 72, 8586-96

- Lingelbach K, Joiner KA (1998): The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111, 1467-75
- Liu Q, Gao S, Jiang L, Shang L, Men J, Wang Z, Zhai Y, Xia Z, Hu R, Zhang X, Zhu XQ (2008): A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. *Microbes Infect*, in press
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J (1994): Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-2
- Lüder CG, Algnier 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, 833-44
- Lüder CG, Gross U (2005): Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 289, 219-37
- Lüder CG, 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, 308-16
- Lüder CG, Seeber F (2001): *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int J Parasitol* 31, 1355-69
- Lüder CG, 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, 1475-84
- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS (1984): Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 252, 913-7
- Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, Bourland DD 3rd, Uttamchandani R, Fuhrer J, Jacobson J, et al. (1993): Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N Engl J Med* 329, 995-1000
- Luft BJ, Remington JS (1992): Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211-22
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-90
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW (2002): *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 18, 198-201
- Martins L und Earnshaw WC (1997): Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biol* 7, 111-114
- McGavin, D.D.M.: Ophthalmologie in the tropics and subtropics; in: Manson's tropical diseases; hrsg. v. Cook, G.C.; WB Saunders Company, London 1996, 278.

- McKee AS, Dzierszynski F, Boes M, Roos DS, Pearce EJ (2004): Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 173, 2632-40
- Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W (2001): Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell* 25, 53-9
- Métrailler-Ruchonnet I, Pagano A, Carnesecchi S, Ody C, Donati Y, Barazzone Argiroffo C (2007): Bcl-2 protects against hyperoxia-induced apoptosis through inhibition of the mitochondria-dependent pathway. *Free Radic Biol Med* 42, 1062-74
- Molestina RE, Payne TM, Coppens I, Sinai AP (2003): Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci* 116, 4359-71
- Montoya JG und Remington JS (1996): Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 23, 277-82
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-76
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD (1999): Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 190, 1783-92
- Mordue DG, Sibley LD (1997): Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol* 159, 4452-9
- Nakaar V, Ngô HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA (2003): Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 116, 2311-20
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ (1998): *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160, 1824-30
- Nelson MM, Jones AR, Carmen JC, Sinai AP, Burchmore R, Wastling JM (2008): Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 76, 828-44
- Nicolson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43
- Ockert G (1994): Epidemiologie der *Toxoplasma*-Infektion. Toxoplasmose-Erreger und Krankheit. Pohle HD und Remington JS. Gräefeling, Socio Medico Verlag, 30-42
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC (1998): Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*. 1998 17, 384-95
- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang

- H, Fesik SW, Rosenberg SH (2005): An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677-81
- Orlofsky A, Somogyi RD, Weiss LM, Prystowsky MB (1999): The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J Immunol* 163, 412-9
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ (1988): Acute phase *toxoplasma* abortions in sheep. *Vet Rec* 142, 480-2
- Patra AK, Na SY, Bommhardt U (2004): Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins. *J Immunol* 172, 4812-20
- Payne TM, Molestina RE, Sinai AP (2003): Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116, 4345-58
- Persson EK, Agnarson AM, Lambert H, Hitziger N, Yagita H, Chambers BJ, Barragan A, Grandien A (2007): Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179, 8357-65
- Pfefferkorn ER, Eckel M, Rebhun S (1986): Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol* 20, 215-24
- Pohle H.D. (1994): Toxoplasmose bei Immunsuppression, in: Toxoplasmose – Erreger und Krankheit. Pohle HD und Remington JS. Gräefeling, Socio Medico Verlags GmbH
- Puthalakath H, Strasser A. (2002): Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell death Differ* 9, 505-512
- Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-36
- Rodriguez J, Lazebnik Y (1999): Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-84
- Roux C, Desmont G, Mulliez N, Gaulier M, Tufferaud G, Marmor D, Herbillon A (1976): Toxoplasmosis and pregnancy. Evaluation of 2 years of prevention of congenital toxoplasmosis in the maternity ward of Hôpital Saint-Antoine (1973-1974). *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 5, 249-64
- Saeij JP, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC (2006): Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780-3
- Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2006): Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281, 29652-9
- Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C (1990): Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343, 170-3
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C (1993): Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131-6

- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-87
- Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME (1999): Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-8
- Scharton-Kersten T, Caspar P, Sher A, Denkers EY (1996): *Toxoplasma gondii*: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 84, 102-14
- Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Lüder CG (2006): Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology* 132, 69-85
- Schimmer AD, Hedley DW, Chow S, Pham NA, Chakrabarty A, Bouchard D, Mak TW, Trus MR, Minden MD (2001): The BH3 domain of BAD fused to the Antennapedia peptide induces apoptosis via its alpha helical structure and independent of Bcl-2. *Cell Death Differ* 8, 725-33
- Schinzl A, Kaufmann T, Schuler M, Martinalbo J, Grubb D, Borner C (2004): Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J Cell Biol* 164, 1021-32
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA (1994): The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 509-13
- Scott P (1993): IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260, 496-7
- Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ, Joiner KA, Coppens I (2005): Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic* 6, 1125-41
- Shapira S, Speirs K, Gerstein A, Caamano J, Hunter CA (2002): Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185, 66-72
- Sharma SD, Shepard D, Remington JS (1986): Antibodies to immune response gene products inhibit the IgM and IgG antibody response but not the development of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell Immunol* 98, 323-32
- Shen DF, Matteson DM, Tuailon N, Suedekum BK, Buggage RR, Chan CC (2001): Involvement of apoptosis and interferon-gamma in murine toxoplasmosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2031-6
- Shen Y, Shenk TE (1995): Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 5, 105-11
- Sher A, Collazzo C, Scanga C, Jankovic D, Yap G, Aliberti J (2003): Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res* 27, 521-8
- Sher A, Oswald IP, Hieny S, Gazzinelli RT (1993): *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150, 3982-9
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. (2007): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nat Cell Biol* 9, 550-5
- Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y (2000): Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 4309-18

- Sibley LD (2003): *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. Traffic 4, 581-6
- Sibley LD, Boothroyd JC (1992): Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature 359, 82-5
- Sibley LD, Krahenbuhl JL, Weidner E (1985): Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 49, 760-4
- Sinai AP, Joiner KA (2001): The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. J Cell Biol 154, 95-108
- Smith JE (1995): A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 25, 1301-9
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol 144, 281-92
- Smith JE (1995): A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 25, 1301-9
- Sobell HM (1985): Actinomycin and DNA transcription. Proc Natl Acad Sci USA 82, 5328-31
- Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR (2005): Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. Science 310, 66-7
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998): Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. Mol Cell 1, 949-57
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD (2005): Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. J Biol Chem 280, 38729-39
- Su J, Wang G, Barrett JW, Irvine TS, Gao X, McFadden G (2006): Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. J Virol 80, 1140-51
- Subauste CS, Dawson L, Remington JS (1992): Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 176, 1511-9
- Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS (1991): Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. J Immunol 147, 3955-9
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N (2000): Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell 103, 645-54
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS (1988): Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 240, 516-8
- Suzuki Y, Remington JS (1988): Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. J Immunol 140, 3943-6
- Suzuki Y, Remington JS (1993): Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. Res Immunol 144, 66-7

- Takahashi M, Saito H, Okuyama T, Miyashita T, Kosuga M, Sumisa F, Yamada M, Ebinuma H, Ishii H (1999): Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J Hepatol* 31, 315-22
- Thompson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6
- Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao Y, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW (2008): ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 68, 3421-8
- van der Woude MW, Bäuml AJ (2004): Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17, 581-611
- van Dijk MR, Douradinha B, Franke-Fayard B, Heussler V, van Dooren MW, van Schaijk B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Mota MM, Waters AP, Janse CJ (2005): Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12194-9
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999): Cell death in development. *Cell* 96, 245-54
- Vutova P, Wirth M, Hippe D, Gross U, Schulze-Osthoff K, Schmitz I, Lüder CG (2007): *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell Microbiol* 9, 1556-70
- Vyssokikh M, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jürgensmeier J, Schreiner D, Brdiczka D (2004): The intra-mitochondrial cytochrome c distribution varies correlated to the formation of a complex between VDAC and the adenine nucleotide translocase: this affects Bax-dependent cytochrome c release. *Biochim Biophys Acta* 1644, 27-36
- Weber A, Paschen SA, Heger K, Wilfling F, Frankenberg T, Bauerschmitt H, Seiffert BM, Kirschnek S, Wagner H, Häcker G (2007): BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Cell Biol* 177, 625-36
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001): Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-30
- Weinrauch Y, Zychlinsky A (1999): The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53, 155-87
- Williams GT (1994): Role of apoptosis in the immune system. *Biochem Cell Biol* 72, 447-50
- Willis SN, Adams JM (2005): Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-25
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005): Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-305
- Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW (1980): Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma infection*. *Pediatrics* 66, 767-74

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997): Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281-92

Wuillème-Toumi S, Trichet V, Gomez-Bougie P, Gratas C, Bataille R, Amiot M (2007): Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 865-9

Wyllie AH (1985): The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res* 5, 131-6

Publikationen

Fachartikel:

Schaumburg F., Hippe D., Vutova P., Lüder C.G.K. (2006). Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology*, 132 Suppl:S69-85.

Vutova P., Wirth M., Hippe D., Gross U., Schulze-Osthoff K., Schmitz I., Lüder C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell Microbiol*, 9: 1556-1570.

Debierre-Grockiego F., Hippe D., Schwarz R.T., Lüder C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. *Apoptosis*, 12:781-90.

Hippe D., Gais A., Groß U., Lüder C.G.K. (2007). Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*. In: Rupp, S., Sohn, K. und Hauser, N. (Eds). *Methods in Molecular Biology: Host-Pathogen Interactions*. Humana Press., Totowa, NJ, USA.
DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5_19

Hippe D., Lytovchenko O., Schmitz I., Lüder C.G.K. (2008). Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. *Infect Immun*. 76 (7):2905-12

Hippe D., Weber A., Zhou L., Häcker G., Lüder C.G.K. (2008). *T. gondii* prevents BimS-induced apoptosis by inhibition of Bax- and Bak-activation. Manuskript in Vorbereitung

Kongreßbeiträge:

Hippe D., Vutova P., Häcker G., Groß U., Lüder C.G.K. (2006). Inhibition of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*.
22. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Wien, 22.-25.02.2006.

Hippe D., Vutova P., Häcker G., Groß U., Lüder C.G.K. (2006). *Toxoplasma gondii* inhibits host cell apoptosis triggered by both intrinsic and extrinsic proapoptotic signals. 58. Jahrestagung der DGHM, Würzburg; 01-04.10.2006.

Hippe D., Häcker G., Lüder C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* interferes with the mitochondrial amplification loop during Fas-induced apoptosis. Statusworkshop der Fachgruppe eukaryontische Krankheitserreger der DGHM, Stuttgart; 23.-24.02.2007.

Hippe D., Häcker G., Groß U., Lüder C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* employs different mechanisms to inhibit the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. 4th Annual Action Workshop, COST Action 857: Apicomplexan Biology in the Post-Genomic Era, Korsika (Frankreich), 04.-07.05.2007.

Hippe D., Vutova P., Häcker G., Groß U., Lüder C.G.K. (2007). Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii*: Diverse strategies to ensure parasite survival. 1st Three Countries Joint Meeting: Physiopathology of intracellular diseases, Strasbourg (Frankreich), 14 – 16.06.2007.

Hippe D., Weber A., Gross U., Häcker G., Lüder C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* inhibits activation and oligomerisation of proapoptotic Bax during Bims-induced apoptosis. 59. DGHM-Jahrestagung, Göttingen, 30.09.- 04.10.2007.

Hippe D., Lüder C.G.K. (2007). Inhibitory mechanisms on host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii*. COST Action 857: Apicomplexan Biology in the post genomic area. Third PhD retreat Genf, 19.-20.11.2007

Hippe D., Weber A., Zhou L., Gross U., Häcker G., Lüder C.G.K. (2008). Targeting the intrinsic apoptotic pathway: Inhibition of Bax- and Bak activation by *Toxoplasma gondii*. 23 Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg, 05-07.03.2008.

Hippe D., Weber A., Zhou L., Gross U., Häcker G., Lüder C.G.K. (2008). A direct interaction of *Toxoplasma gondii* with its host cell leads to inhibition of Bax- and Bak activation within the intrinsic pathway of apoptosis. 16th Japanese–German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Göttingen, 24-29.09.2008.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Hippe
Geburtsdatum und -ort: 01.03.1978 in Göttingen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Promotion

30.10.2008 Promotion zum Dr. rer.nat. an der Georg-August-Universität Göttingen

2005 – 2008 Anfertigung einer naturwissenschaftlichen Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen zum Thema: Mechanismen der Inhibierung von Wirtszellapoptose durch *Toxoplasma gondii*.

01.11.06 – 31.10.08 Promotionsstipendium der Karl-Enigk-Stiftung

01.05. – 31.10.06 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für medizinische Mikrobiologie in Göttingen

Studium

01.10.98 – 20.01.05 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Immunologie und Biochemie

Titel der Diplomarbeit: Einfluss von *Toxoplasma gondii* auf die Expression und Funktionalität des Protoonkogens *c-myc* in infizierten Wirtszellen

01.04. – 31.07.98 Auslandsaufenthalt in Edmonton, Kanada

01.09.97 – 31.03.98 Freiwilliges soziales Jahr im Matthias-Claudius-Stift, Göttingen

Schulbildung

13.06.97 Abitur am math.-naturwissenschaftlichen Max-Planck-Gymnasium in Göttingen