

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

**Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf
die Expression IFN γ -regulierter Gene und die
Parasitenentwicklung in *Toxoplasma gondii*-infizierten
Makrophagen**

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

vorgelegt von

Kristina Sumpf

aus

Wolfenbüttel

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. C. Lueder
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. mult. T. Meyer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Datum der mündlichen Prüfung:	05.12.2017

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	1
1.1.2 Intrazelluläre Lebensweise von <i>T. gondii</i>	3
1.1.3 Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i> über den IFN γ -Signalweg.....	4
1.1.4 Immunmodulatorische Effekte von <i>T. gondii</i>	6
1.1.4.1 Einfluss auf Zytokinexpression	6
1.1.4.2 Einfluss auf Signalkaskaden	7
1.1.4.3 Einfluss auf das Chromatin-Remodelling	8
1.2 Toxoplasmose als gesundheitliches Risiko.....	9
1.2.1 Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten	9
1.2.2 Konnatale Infektion	10
1.2.3 Diagnostik	11
1.2.4 Screening.....	13
1.2.5 Therapie	13
1.3 Histondeacetylasen und Histondeacetylase-Inhibitoren	15
1.3.1 Physiologische Bedeutung von Histondeacetylasen	15
1.3.2 Histondeacetylase-Inhibitoren und ihre klinische Anwendung	16
1.4 Ziel der Arbeit	18

2	Material	20
2.1	Zellen und Parasiten	20
2.2	Laborgeräte	20
2.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.4	Reagenzien	22
2.5	Medien	23
2.5.1	Basismedien	23
2.5.2	RAW-Medium	23
2.5.3	L929-Medium	24
2.5.4	Toxoplasma-Medium	24
2.6	Puffer und Lösungen	24
2.6.1	Basispuffer	24
2.6.2	Immunfluoreszenztest	25
2.6.2.1	Fixierlösung	25
2.6.2.2	Blockierlösung	25
2.6.3	Durchflusszytometrie	25
2.6.3.1	Blockierlösung	25
2.6.3.2	FACS-Puffer	26
2.7	Antikörper	26
2.8	Kits	26
2.9	Software	27

3	Methoden	28
3.1	Zellkultur	28
3.1.1	RAW264.7-Kultur	28
3.1.2	<i>Toxoplasma-gondii</i> -Kultur	28
3.1.3	L929-Kultur.....	29
3.1.4	Aussaat der RAW264.7-Zellen für Infektionsversuche	30
3.1.4.1	Infektion, Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation	30
3.2	Transkriptmengen der primären Antwortgene IRF-1 und IRF-8 sowie des sekundären Antwortgens CIITA.....	31
3.2.1	Versuchsanlage	31
3.2.2	RNA-Isolation, DNase-Verdau und Reverse Transkription	32
3.2.3	Quantitative Real-Time PCR.....	32
3.3	Transkriptomanalyse.....	34
3.3.1	RNA-Gewinnung.....	35
3.3.2	Probenaufbereitung.....	35
3.3.3	Probenanalyse	36
3.4	Immunfluoreszenztest	37
3.4.1	Versuchsanlage	37
3.4.2	Fixierung der Zellen	38
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	38
3.5	DNA-Isolierung zum quantitativen Toxoplasma-Nachweis.....	40
3.5.1	Versuchsanlage	40
3.5.2	Isolierung genomischer DNA	41
3.5.3	Quantitative Real-Time PCR.....	41
3.6	Durchflusszytometrie.....	43

3.6.1	Versuchsanlage und Zellisolierung	43
3.6.2	Immunfluoreszenzfärbung und Fixierung.....	44
3.6.3	Durchflusszytometrische Analyse.....	46
3.7	Statistik.....	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Expression IFN γ -regulierter Gene in <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7	48
4.1.1	I-A/I-E-Expression.....	48
4.1.2	Untersuchung der Expression des sekundären Antwortgens <i>ciita</i> und der primären Antwortgene <i>irf1</i> und <i>irf8</i>	50
4.1.2.1	Expression des CIITA-Gens	50
4.1.2.2	Expression des IRF-1-Gens.....	51
4.1.2.3	Expression des IRF-8-Gens.....	52
4.1.3	Globaler Einfluss von MS-275 auf das IFN γ -regulierte Transkriptom von nicht infizierten und <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7	54
4.1.4	Expression primärer Antwortgene	59
4.1.4.1	IRF-codierende Gene	60
4.1.4.2	IRG-codierende Gene	62
4.1.5	Einfluss von MS-275 auf die Expression IFN γ -regulierter sekundärer Antwortgene in <i>T. gondii</i> -infizierten und nicht infizierten RAW264.7.....	63
4.1.5.1	<i>Ciita</i>	66
4.1.5.2	MHC-II-codierende Gene.....	66
4.1.5.3	Guanylat-bindende-Proteine.....	67
4.1.5.4	<i>Nos2</i>	68

4.1.6	Einfluss von MS-275 auf die Expression immunsuppressiver Gene in <i>T. gondii</i> -infizierten und nicht infizierten RAW264.7	70
4.1.6.1	Interleukin-10 und seine Rezeptoren	70
4.1.6.2	Interleukin-4 und sein Rezeptor	71
4.1.6.3	Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS)	72
4.1.6.4	TGF- β -Isoforme	73
4.2	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die intrazelluläre Entwicklung von <i>Toxoplasma gondii</i> in murinen Monozyten/ Makrophagen	75
4.2.1	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Parasitenvermehrung	75
4.2.1.1	Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von MS-275 auf den Anteil <i>T. gondii</i> -infizierter RAW264.7 in der Gesamtpopulation	75
4.2.1.2	Untersuchung des Einfluss von MS-275 auf die parasitäre Replikationsrate mittels qPCR	77
4.2.2	Untersuchung des Einflusses von HDAC-Inhibitoren auf die Replikationsrate und Invasionsfähigkeit von <i>T. gondii</i> in RAW264.7	79
4.2.2.1	Replikationsrate	79
4.2.2.2	Anteil infizierter Zellen an Gesamtkultur	80
5	Diskussion	83
5.1	Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Expression von primären und sekundären IFN γ -Antwortgenen	83
5.1.1	Primäre Antwortgene	83
5.1.2	Sekundäre Antwortgene	85
5.1.3	Mögliche weitere Wirkungen der HDAC-Inhibitoren	86
5.1.4	Schlussfolgerungen zur Regulation primärer und sekundärer Antwortgene durch HDAC-Inhibitoren in <i>Toxoplasma</i> -infizierten Makrophagen	90

5.2	Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Parasitenentwicklung in murinen Makrophagen	93
5.2.1	Einfluss immunsuppressiver Gene.....	94
5.2.2	Schlußfolgerungen zum Einfluss von MS-275 auf die Abwehrfähigkeit von RAW264.7 gegen <i>T. gondii</i>	96
5.3	Medikamentöser Einsatz von HDAC-Inhibitoren gegen <i>T. gondii</i> -Infektionen	97
6	Zusammenfassung	100
7	Literaturverzeichnis	103
III.	Abbildungsverzeichnis	114
IV.	Tabellenverzeichnis	116
V.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

I. Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
µl	Mikroliter
APC	Antigen-presenting cell, antigenpräsentierende Zelle
BAF	Brahma-associated factor, Brahma-assoziiertes Faktor
BRG-1	Brahma-related gene 1, Brahma-verwandtes Gen 1
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsmuster
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
FCS	Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, Charge 0214X
FDA	Food and Drug Administration, US-amerikanische Zulassungsstelle für Lebensmittel und Medikamente
GAS	Gamma-activated site, Gamma-aktivierte Stelle
GbP	guanylate binding protein, Guanylat-bindende-Protein, p65-GTPase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAT	Histonacetyltransferase
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HDAC	Histondeacetylase
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN γ	Interferon γ
IGeL	Individuelle Gesundheitsleistung
IL	Interleukin
IRG	Immunity related GTPase, Immunitäts-bezogene GTPase, p47-GTPase

JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharide
MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5, RIG-I-ähnlicher Rezeptor dsRNA-Helikase
MHCII	Major Histocompatibility complex II, Haupthistokompatibilitätskomplex II
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA, Boten-RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
p.i.	post infectionem
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
qPCR	Quantitative PCR
RIG-I	retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I-ähnlicher Rezeptor dsRNA-Helikase
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
Sek.	Sekunden
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSA	Trichostatin A

1 Einleitung

1.1 Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii ist ein weltweit verbreiteter intrazellulärer Parasit aus der Gruppe der Apikomplexa mit drei geographisch unterschiedlich verbreiteten, gut charakterisierten klonalen Linien (Wujcicka et al. 2014). Mit Abstand am häufigsten werden in Europa Haplotypen nachgewiesen, die zum Typ II gezählt werden (Ajzenberg et al. 2002) und als mittelmäßig virulent gelten (Hunter und Sibley 2012). Laut Robert Koch-Institut ist etwa die Hälfte der deutschen Bevölkerung infiziert, in der Altersgruppe über 50 Jahre sind mehr als 70 % seropositiv (Gilsdorf 2014).

1.1.1 Lebenszyklus von *T. gondii*

T. gondii ist zur geschlechtlichen Vermehrung auf einen Endwirt der Gattung *Felidae* angewiesen, als Zwischenwirte kommen nahezu alle warmblütigen Tiere, unter anderem der Mensch, in Betracht (Abbildung 1). Prinzipiell können alle kernhaltigen Zellen infiziert werden, allerdings befällt *T. gondii* verschiedene Zelltypen in Abhängigkeit von Wirt und Infektionsstadium unterschiedlich häufig (Długońska 2014). In Europa sind aufgrund ihrer Häufigkeit in erster Linie Hauskatzen als Endwirte relevant.

Die Infektion des Zwischenwirts erfolgt entweder über die orale Aufnahme von sporulierten Oozyten, zum Beispiel über kontaminiertes Wasser, Obst oder Gemüse, oder über den Verzehr zystenhaltigen Fleisches eines chronisch infizierten Zwischenwirts (Hill und Dubey 2002) (Abbildung 1). Innerhalb der Zwischenwirte findet die asexuelle Replikation von *T. gondii* statt; die sich schnell teilenden Parasiten werden Tachyzoiten

genannt. Ihre schnelle intrazelluläre Vermehrung führt zur Wirtszellyse und ist somit verantwortlich für die akute Erkrankung des Zwischenwirts. Parallel mit der einsetzenden Immunantwort des Wirtes differenziert der Parasit zum Ruhestadium (Bohne et al. 1999). Diese Parasiten werden Bradyzoiten genannt und bilden vor allem im Gehirn und in quergestreifter Muskulatur Gewebezysten. Ihr Durchmesser variiert von 10 – 150 µm, und sie enthalten hunderte bis tausende Bradyzoiten (Gross et al. 1996). Mit Bildung der Zysten geht die akute Infektion in eine persistierende, asymptomatische Infektion über, der Zwischenwirt erscheint äußerlich gesund. Vermutlich persistiert der Parasit in dieser Form bis zum Lebensende des Wirtes (Derouin und Pelloux 2008).

Frisst eine Katze einen *Toxoplasma*-infizierten Zwischenwirt, dringt *T. gondii* in die Enterozyten des felines Ileus ein. Hier findet die Gamogonie statt, es entstehen Mikro- und Makrogameten. Die Mikrogameten werden ins Darmlumen freigesetzt, während die Makrogameten im Enterozyten verbleiben. Die Mikrogameten invadieren über das Darmlumen neue Enterozyten und erreichen damit andere Makrogameten, wodurch eine genetische Diversifizierung erreicht wird. Aus der Verschmelzung von Mikro- und Makrogameten entwickeln sich zunächst diploide Oozysten, die mit dem Kot der Katze in die Umwelt abgegeben werden. Hier findet die Meiose statt. Die beiden haploiden Sporoblasten teilen sich anschließend mitotisch, sodass nach vollständiger Sporulation die Oozyste zweimal vier Sporozoiten enthält (Wenk und Renz 2003). Sporulierte Oozysten können im Erdboden Monate bis Jahre überleben (Dubey und Frenkel 1972) und können über verschiedene Arthropoden verbreitet werden, wodurch sich der Radius und mögliche Quellen für die Infektion von Zwischenwirten erweitert (Hill und Dubey 2002) (Abbildung 1). Während der ca. zweiwöchigen Patenz der Katze werden bis zu 600 Millionen Oozysten ausgeschieden (Wenk und Renz 2003). Da eine vorübergehende Immunität eintritt, sind gleichzeitig nur ca. ein Prozent der Katzenpopulation Ausscheider (Hill und Dubey 2002).

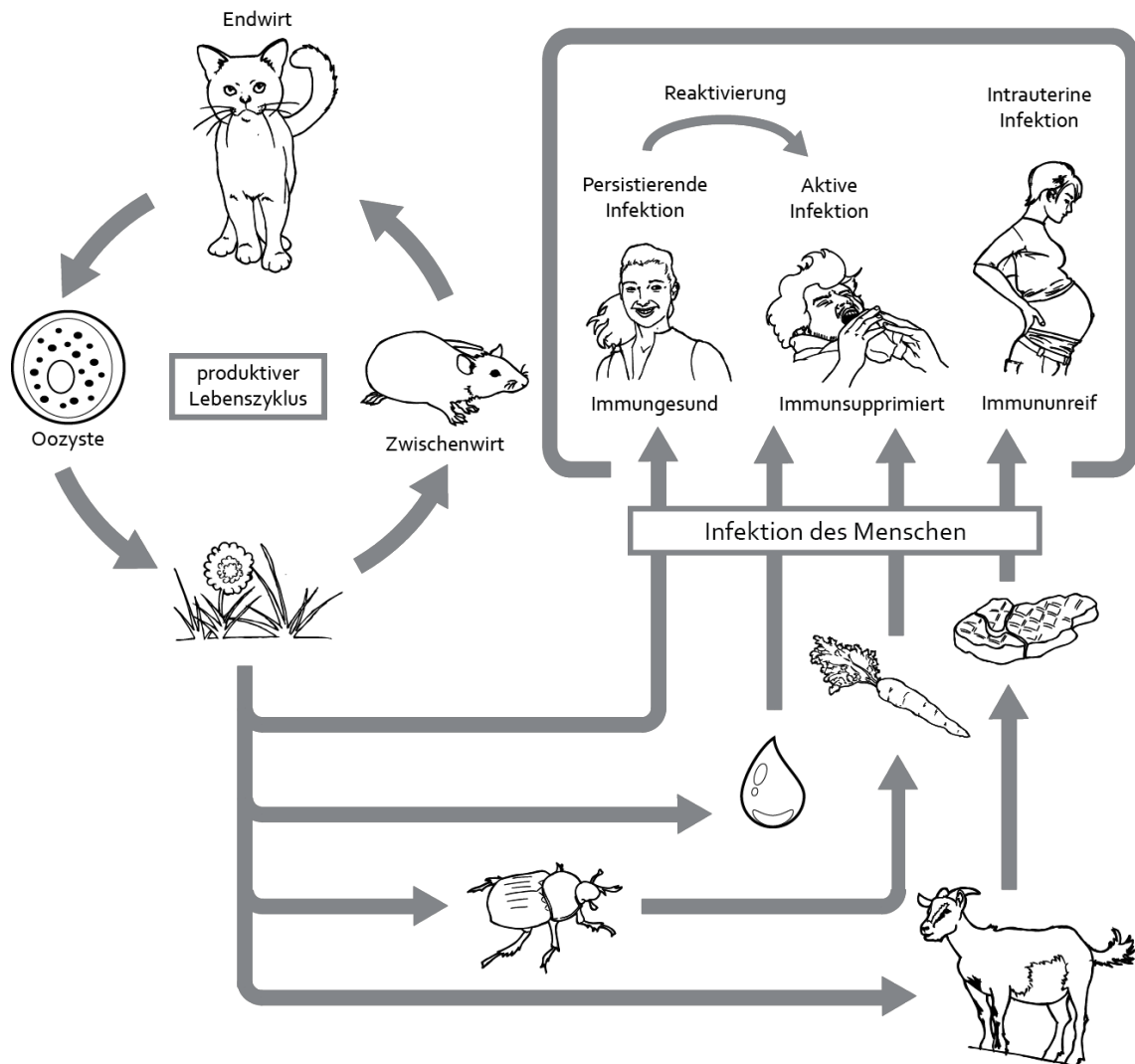


Abbildung 1 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* und Infektion des Menschen. Zur geschlechtlichen Vermehrung ist *T. gondii* auf Felidae angewiesen, während die ungeschlechtliche Vermehrung in nahezu allen gleichwarmen Tieren, inklusive des Menschen stattfinden kann. In Immungesunden geht die aktive Infektion rasch in eine latente Infektion über, der Parasit persistiert lebenslang im Wirt. Bei Immunsupprimierten kann eine Reaktivierung zur aktiven Infektion stattfinden. Infiziert sich eine Frau während der Schwangerschaft erstmalig, kann die Infektion auf den Fetus mit teils letalem Ausgang übergehen.

1.1.2 Intrazelluläre Lebensweise von *T. gondii*

Die Invasion der Wirtszelle ist ein aktiver Prozess und wird durch die Aktin-Myosin-basierte gleitende Beweglichkeit (eng. *gliding motility*) der Tachyzoiten ermöglicht. Durch die Invagination der Plasmamembran der Wirtszelle wird eine parasitophore Vakuole geschaffen, in der *T. gondii* verbleibt und sich vermehrt. Die Membran der parasitophoren Vakuole wird durch den Parasiten vielfältig modifiziert, wodurch zum

Beispiel die Fusion mit Lysosomen verhindert wird. Des Weiteren werden möglicherweise zur Nährstoffversorgung das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien der Wirtszelle rekrutiert. Nach mehreren mitotischen Teilungen wird die Zelle in einem ebenfalls aktiven Prozess rupturiert, und die freiwerdenden Tachyzoiten können benachbarte Zellen infizieren (Hunter und Sibley 2012).

1.1.3 Immunabwehr gegen *T. gondii* über den IFN γ -Signalweg

Die Erkennung von Tachyzoiten erfolgt unter anderem über die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4, die Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker parasitärer Proteine erkennen, sowie über TLR-11, der auf das Protein Profilin reagiert (Leng et al. 2009). Als Reaktion auf diese Stimuli bilden vor allem dendritische Zellen, aber auch Makrophagen und Neutrophile Interleukin-12 (IL-12). Dadurch wird die Differenzierung der Th1-CD4⁺ Subpopulation angeregt und die zelluläre Immunantwort aktiviert (Lang et al. 2006). IL-12 stellt so die Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem zellulärem Immunsystem dar. Des Weiteren stimuliert IL-12 natürliche Killerzellen und CD8⁺ T-Zellen, die unter anderem eine direkte zytotoxische Aktivität auf *T. gondii*-infizierte Zellen ausüben.

Die Th1-Lymphozyten produzieren Interferon γ (IFN γ) und stimulieren damit Monozyten und Makrophagen sowie nicht-hämatopoetische Zellen (Hunter und Sibley 2012). Die Ligandenbindung an die IFN γ -Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 führt zur Dimerisierung sowie zur Autophosphorylierung und Aktivierung von Januskinasen (JAK1 und JAK2). Nach Phosphorylierung des IFN γ -Rezeptors binden Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1)-Proteine an den Rezeptor und werden anschließend durch die JAKs an Tyr⁷⁰¹ phosphoryliert. Dadurch wird eine Dimerisierung der STATs induziert und die STAT1-Dimere werden in den Kern transloziert (Rosowski et al. 2014). Für die volle Aktivität des Transkriptionsfaktors ist vermutlich außerdem eine zusätzliche nukleäre Phosphorylierung an Ser⁷²⁷ notwendig (Kim et al. 2007). STAT1 unterliegt einem dynamischen Kreislauf aus Phosphorylierung

und Transport in den Nukleus sowie Dephosphorylierung und Kernexport, wodurch eine Anpassung der Genexpression an die jeweils aktuelle extrazelluläre IFN γ -Konzentration gewährleistet wird (Rosowski et al. 2014).

Im Kern vermitteln STAT1-Dimere die Rekrutierung des Brahma-associated-factor-Komplexes (BAF); dieser enthält unter anderem die ATPase Brahma-related-gene 1 (BRG-1) und führt zu kovalenten Chromatin-Modifikationen. Für den Class-II-Transaktivator (CIITA)-Promotor IV wurde nachgewiesen, dass die Stimulation von Makrophagen mit IFN γ zu einer Hyperacetylierung der Histone H4 und H3 führt, wodurch die Bindung von STAT1-Dimeren an Gamma-activated-sites (GAS) innerhalb des CIITA-Promotors erleichtert wird (Lang et al. 2012). Die IFN γ -responsiven Gene werden in primäre und sekundäre Antwortgene unterteilt (Rosowski et al. 2014). Die Genprodukte der primären Antwortgene dienen häufig als zusätzliche Transkriptionsfaktoren für sekundäre Antwortgene, wodurch ein kaskadenartiger Effekt erzielt wird. IFN γ -regulierte Effektorgene codieren unter anderem für Proteine, die die infizierte Zelle zur Abwehr intrazellulärer Pathogene befähigt, zum Beispiel p47 GTPasen (Immunity-related GTPasen, IRG) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). p47 GTPasen spielen eine Rolle bei der Rupturierung der parasitophoren Vakuole von *T. gondii* und damit bei der intrazellulären Eradikation (Hunter und Sibley 2012). Die iNOS wirkt über die Generierung des Stickstoffradikals NO antiparasitär.

Zudem werden Proteine exprimiert, die der globalen Immunantwort dienen, beispielsweise wird die Hochregulation des MHCII-Komplexes in professionell Antigen-präsentierenden Zellen (Lang et al. 2012)) beziehungsweise dessen Induktion in Fibroblasten über IFN γ vermittelt (Kim et al. 2007).

Für die vollständige Eradikation der Tachyzoiten in Makrophagen ist neben dem IFN γ -Signal in der Regel noch ein zweites Signal notwendig. Besonders wichtig sind hierbei die Stimulation von TNF-Rezeptoren und CD40 (Hunter und Sibley 2012).

1.1.4 Immunmodulatorische Effekte von *T. gondii*

Die Balance zwischen Immunsuppression und Immuninduktion ist für die Überlebensstrategie von *T. gondii* essentiell. Die Suppression von proinflammatorischen Mechanismen ist zum einen wichtig, um ein intrazelluläres Überleben des Parasiten sicherzustellen. Zum anderen ist sie notwendig, um eine überschießende Immunreaktion und damit eine Immunpathologie des Wirts zu vermeiden, sodass ein dauerhaftes Überleben des Wirts und damit ein dauerhaftes Persistieren des Parasiten gewährleistet ist. Auf der anderen Seite ist die Aufrechterhaltung einer Restimmunität gegen den Parasiten für Wirt und Parasit notwendig, da ansonsten eine unkontrollierte Vermehrung des Parasiten zu schweren Gewebsschädigungen mit tödlichem Verlauf führen würde, wobei der Tod des Wirtes auch den Tod des Parasiten nach sich ziehen würde (Lang et al. 2006). Insofern greift *T. gondii* in diverse immunrelevante Prozesse ein. Hier sollen die zentralen Mechanismen kurz erläutert werden, darüber hinaus spielen aber noch weitere Prozesse eine wichtige Rolle bei der Parasiten-Wirt-Interaktion.

1.1.4.1 Einfluss auf Zytokinexpression

Das immunmodulierende Interleukin 10 vermindert die IFN γ -Produktion und schwächt die Th1-Antwort (Lang et al. 2006). Während einer *Toxoplasma*-Infektion wird IL-10 induziert. Des Weiteren wird STAT-3, das als Transduktor in der intrazellulären Weiterleitung des IL-10-Signals fungiert, abhängig von seinem Rezeptorsignal an einem singulären carboxyterminalen Tyrosinrest phosphoryliert (Butcher et al. 2005). Infolge der Interaktion mit beiden Mechanismen im IL-10-Signalweg wird die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF α unterdrückt (Butcher et al. 2005).

Zusätzlich wird die IL-12-Expression über die Induktion des Eikosanoid Lipoxin A₄ (LXA₄) vermindert, indem LXA₄ nach Rezeptorbindung die Herunterregulation des Chemokin-Rezeptors CCR5 bewirkt, womit eine Senkung der IL-12-Expression verbunden ist. Hierbei ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob es sich um einen induzierten Vor-

gang handelt oder um einen wirtsgesteuerten Regulationsvorgang (Lang et al. 2006). Auf der anderen Seite können *Toxoplasma* Typ-II-Stämme über das sekretierte Protein GRA15 die IL-12-Expression induzieren, wodurch in der Folge auch NFκB aktiviert wird und damit zur Makrophagenaktivierung führt (Hunter und Sibley 2012).

Die TNFα-Produktion unterliegt einer zusätzlichen, IL-10-unabhängigen Hemmung, indem *Toxoplasma* das antiinflammatorische Zytokin TGFβ induziert. Auch der Stimulus durch normalerweise stark pyogene Lipopolysaccharide (LPS) kann die Expression von TNFα nicht wiederherstellen (Lang et al. 2006).

1.1.4.2 Einfluss auf Signalkaskaden

T. gondii wirkt hemmend auf den IFNγ- und den NFκB-Signalweg und zielt damit auf die beiden zentralen Mechanismen zur Parasitenabwehr des Wirtes.

T. gondii greift auf verschiedenen Ebenen in den IFNγ-Weg ein. TGFβ wird als Antagonist der IFNγ-Produktion in NK-Zellen durch den Parasiten induziert. Die Suppressor-of-Cytokine-Signaling (SOCS) 1 und 3 werden ebenfalls vermehrt transkribiert, wobei SOCS-1 nur durch Typ-I-Stämme induziert wird, SOCS-3 auch durch Typ-II-Stämme. SOCS binden an phosphorylierte Januskinasen und verhindern damit kompetitiv die STAT-Aktivierung (Leng et al. 2009). Außerdem werden zytoplasmatische und nukleäre Phosphatasen aktiviert, die JAK- und STAT-Proteine deaktivieren können (Leng et al. 2009). Ein weiterer Mechanismus zur Inhibierung des IFNγ-Signalwegs ist die verstärkte Bindung von STAT1 an die DNA, wodurch das dynamische Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem, DNA-gebundenem STAT1 und unphosphoryliertem, freien STAT-1 verändert wird und die IFNγ-regulierte Genexpression verringert wird (Rosowski et al. 2014).

Der NFκB-Weg wird als Reaktion auf mikrobielle Bestandteile sowie zellulären Stress aktiviert, beispielsweise durch die Ligandenbindung an Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Er vermittelt die Expression wichtiger Effektormoleküle zur Parasitenabwehr; hier gibt es eine gewisse Redundanz zu denen des IFNγ-Signalwegs, beispielsweise kann die

induzierbare NO-Synthase durch beide Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Des Weiteren fungiert NFκB als Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Zytokine wie die bereits genannten IL-12 und TNFα. Normalerweise führt die Ligandenbindung an einen TLR zur Phosphorylierung einer Inhibitor-of-NFκB-Kinase (IKK), die wiederum den Inhibitor-of-NFκB phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau führt. Dadurch dissoziiert der Inhibitor vom NFκB-Dimer, und es kann in den Nukleus transloziert werden. Für den Kernimport ist außerdem noch die Phosphorylierung von RelA, einem der möglichen Monomere von NFκB, notwendig. Dieser Schritt wird durch *T. gondii* blockiert, wodurch das Eintreten in den Kern verhindert wird. Dieser Effekt scheint allerdings nur die ersten sechs Stunden nach Infektion anzuhalten, danach konnte wieder eine Bindung an die DNA nachgewiesen werden (Leng et al. 2009). Trotzdem bleibt die oben beschriebene Inhibierung der Genexpression von TNFα bestehen (Lang et al. 2006). Konträr dazu aktivieren *Toxoplasma*-Typ-II-Stämme wie oben beschrieben NFκB über Gra15 (Hunter und Sibley 2012).

1.1.4.3 Einfluss auf das Chromatin-Remodelling

T. gondii greift spezifisch in das Gleichgewicht zwischen Histonacetylierung und -deacetylierung an den Promotoren verschiedener immunrelevanter Gene ein und verschiebt es zu Gunsten der Deacetylierung, wodurch die Expression der Gene vermindert wird.

Dies wurde unter anderem für den TNF α-Promotor nachgewiesen; *T. gondii* bewirkt hier eine verminderte Acetylierung an Histon 3 (H3) (Leng et al. 2009). Am CIITA-Promotor IV reduziert *T. gondii* die Histon-4-Acetylierung um über 90 % und führt ebenfalls zu einer geringeren H3-Acetylierung (Lang et al. 2012). CIITA ist ein essentieller Coaktivator für die Expression der MHCII-Gene und ist somit unmittelbar für die Präsentation phagozytierter Antigene durch professionell Antigen-präsentierende Zellen verantwortlich (antigen presenting cells, APC) und damit an der Aktivierung des erworbenen Immunsystems beteiligt. Des Weiteren ist die H3- und H4-

Acetylierung an den Promotoren der Gene *h2eβ* und *gbp2* vermindert. Das *h2eβ*-Gen kodiert für einen Teil des MHCII-Komplexes, *gbp2* kodiert für das „Interferon-induced guanylate-binding-protein 2“, also Interferon-induziertes Guanylat-bindende-Protein 2, das als p65-GTPase an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt ist (NM_010260). Mit der verminderten Histonacetylierung an den Promotoren dieser Gene geht jeweils auch deren verminderte Expression einher.

Für den durch IFN γ regulierten CIITA-Promoter IV konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *Toxoplasma*-infizierten Makrophagen mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 die Acetylierung der Histone deutlich steigerte und sich damit einhergehend auch die CIITA-Expression und nachfolgend die MHC II-Expression normalisierte (Lang et al. 2012).

1.2 Toxoplasmose als gesundheitliches Risiko

Die durch *T. gondii* verursachte Erkrankung wird als Toxoplasmose bezeichnet. In Europa ist der Verlauf bei Immungesunden meist asymptomatisch, oder sie äußert sich mit milden, unspezifischen Symptomen. Häufigstes Krankheitszeichen sind Lymphknotenschwellungen, zusätzlich können Fieber, Muskelschmerzen, Hals- und Kopfschmerzen sowie Abgeschlagenheit auftreten (Hill und Dubey 2002). Der Erreger persistiert nach der akuten Erkrankung ein Leben lang in Form von Zysten im Wirt. Ein ernsthaftes gesundheitliches Problem stellt *T. gondii* für Immunsupprimierte sowie für Ungeborene im Mutterleib dar (Derouin und Pelloux 2008).

1.2.1 Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten

AIDS-Patienten mit einer CD4+-Zahl unter 100/mm³ entwickeln das Risiko einer Reaktivierung der latenten *Toxoplasma*-Infektion. Hauptmanifestation ist hierbei die *Toxoplasma*-Enzephalitis, die zu 95 % auf eine Reaktivierung einer bestehenden Infektion zurückzuführen ist (Luft und Remington 1992). Die Enzephalitis verläuft multifokal

nekrotisierend, betroffen sind häufig der Thalamus sowie Basalganglien und Hirnstamm. Entsprechend der Lokalisation treten fokale Symptome wie Hemiparese oder -plegie, Sensibilitäts- und Gesichtsfeldausfälle sowie Tremor, Hirnnervenschädigungen, fokale Krampfanfälle und schwere Kopfschmerzen auf. Generalisierte Symptome sind Schwäche, Lethargie, Desorientierung und Verwirrungszustände bis hin zum Koma. Begleitend können zerebrale Ödeme, Vaskulitiden und Blutungen vorkommen (Luft und Remington 1992; Hill und Dubey 2002). Vor Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) entwickelten etwa 25 – 50 % der AIDS-Patienten eine *Toxoplasma*-Enzephalitis (Luft und Remington 1992). Trotz der verringerten Prävalenz in Europa und Nordamerika stellt die *Toxoplasma*-Enzephalitis eine der wichtigsten Differentialdiagnosen bei raumfordernden Läsionen bei AIDS-Patienten dar (Abgrall et al. 2001).

Weitere durch Toxoplasmose gefährdete Personen sind die Empfänger von Organtransplantaten sowie allogener hämatopoetischer Stammzellen. Bei der Transplantation fester Organe kann entweder die Infektion durch das Spenderorgan übertragen werden oder die bereits bestehende Infektion des Empfängers durch die therapieinduzierte Immunsuppression reaktiviert werden (Derouin und Pelloux 2008). Besonders gefährdet sind seronegative Patienten, die ein Herz eines seropositiven Spenders erhalten, da die Herzmuskulatur von Zysten befallen sein kann. Auftretende Symptome sind akute Myokarditis, Enzephalitis und Pneumonie. Bei der Transplantation anderer Organe besteht nur ein sehr geringes Risiko einer primären Infektion (Derouin und Pelloux 2008).

1.2.2 Konnatale Infektion

Die konnatale Infektion des Ungeborenen kann dann auftreten, wenn sich die Mutter im Laufe der Schwangerschaft erstmals mit *T. gondii* infiziert oder eine chronische Infektion reaktiviert wird. Bei chronisch infizierten Schwangeren besteht keine Gefahr, da die vorhandenen Antikörper den Embryo/ Fetus vor einer Infektion schützen (Jones

et al. 2003). Laut Robert Koch-Institut wurden im Jahr 2014 sechs Kinder mit bestätigter konnataler Toxoplasmose gemeldet (Gilsdorf 2015). Diese Zahl gibt allerdings nicht das volle Ausmaß von gesundheitlicher Beeinträchtigung durch konnatale *Toxoplasma*-Infektionen wieder, da nur diejenigen Fälle erfasst wurden, die bei Geburt klinisch auffällig waren. Teilweise entwickeln sich Symptome erst deutlich später, unter Umständen kann die Erstmanifestation erst zwischen dem zwanzigsten und dreißigsten Lebensjahr auftreten (Gilbert et al. 1999). Insofern dürfte die Anzahl derjenigen, die gesundheitlich von einer *Toxoplasma*-Infektion beeinträchtigt sind, die genannte Zahl um ein Vielfaches übersteigen.

Die pränatale *Toxoplasma*-Infektion wird klassischerweise mit der Trias aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Retinochoriditis beschrieben. Eine Kombination aller Symptome liegt allerdings nur bei ca. 2% der Fälle vor (Groß 2006). Zudem sind die auftretenden Symptome davon abhängig, in welchem Trimenon der Fetus infiziert wird. Je früher in der fetalen Entwicklung eine Infektion erfolgt, desto schwerwiegender sind die Symptome. Gegenläufig dazu ist das Risiko einer diaplazentaren Übertragung. Unter der in Deutschland üblichen Therapie beträgt die Übertragungsrate während des ersten Trimenons 1,3 %, im zweiten Trimenon 10,6 % und im letzten Trimenon 21,7 %. Etwa ein Drittel der infizierten Kinder ist bei Geburt klinisch auffällig (Hotop et al. 2012).

Später auftretende Beeinträchtigungen, die auf eine pränatale Infektion zurückzuführen sind, sind unter anderem mentale Retardierung, Epilepsie und ophthalmologische Probleme (Jones et al. 2003).

1.2.3 Diagnostik

Bei Erwachsenen, vor allem bei schwangeren Frauen, wird die Diagnose serologisch gestellt, IgM-Antikörper weisen auf eine akute Infektion hin, während das alleinige Vorhandensein von IgG-Antikörpern auf eine latente und damit inaktive Infektion hindeutet. Allgemein wird davon ausgegangen, dass etwa ein halbes Jahr nach der

Infektion kein IgM-Titer mehr nachweisbar ist, dies kann aber von Patient zu Patient erheblich variieren, sodass auch bei einer inaktiven Infektion noch ein IgM-Titer nachweisbar bleiben kann. Daher kann als Abklärungsverfahren die Avidität der IgG-Antikörper bestimmt werden. Ist die Avidität niedrig, so handelt es sich am wahrscheinlichsten um eine akute Infektion, ist die Avidität hoch, liegt entweder eine abklingende oder eine latente Infektion mit persistierendem IgM-Titer vor (Seedat 2009).

Die Diagnose einer fetalen Infektion kann unter Umständen über eine Amniozentese gestellt werden, wobei ein positiver Befund beweisend ist, ein negativer Befund eine Infektion jedoch nicht vollständig ausschließen kann. Diese Untersuchung ist nur vor Therapiebeginn möglich, da sonst falsch-negative Resultate auftreten können, zudem muss die mütterliche Infektion seit mindestens vier Wochen bestehen. Darüber hinaus darf sie nicht vor der 16. SSW durchgeführt werden. In Deutschland ist die Amniozentese nicht Teil des normalen Diagnoseschemas, in der Regel wird nach serologischem Status der Mutter therapiert (Seedat 2009).

Die Diagnose einer *Toxoplasma*-Infektion des Neugeborenen wird serologisch durch den Nachweis von IgM und/oder IgA-Antikörpern gegen den Parasiten gestellt. Da diese nicht plazentagängig sind, kann eine Leihimmunität durch die Mutter ausgeschlossen werden. Erfolgte pränatal eine Behandlung der Mutter mit Sulfadiazin-Pyrimethamin, muss eine serologische Verlaufskontrolle über sechs bis zehn Monate erfolgen, da hier therapiebedingt die immunologische Reaktion gebremst sein kann (Seedat 2009).

Bei Immunsupprimierten sollte ein direkter Erregernachweis vorgenommen werden, da die Fähigkeit zur humoralen Immunantwort stark eingeschränkt sein kann. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass das Untersuchungsmaterial möglichst aus dem betroffenen Kompartiment stammt (Seedat 2009).

1.2.4 Screening

Bisher umstritten ist der epidemiologische Nutzen von Screeningprogrammen. Während beispielsweise in Österreich und Frankreich eine Untersuchung auf Toxoplasmose zum regulären Vorsorgeprogramm während der Schwangerschaft zählt, wird in Deutschland der Toxoplasmosestest als so genannte „Individuelle Gesundheitsleistung“ (IGeL) gelistet, deren Kosten dementsprechend nicht durch gesetzliche Krankenkassen übernommen werden. Auch der vom Medizinischen Dienst des Spitzenverbandes Bund der Krankenkassen betriebene „IGeL-Monitor“ rät von der Durchführung des Tests ab. Die Datenlage sei nicht ausreichend, ob durch den Test und die nachfolgende Therapie die endgültige Morbidität durch *T. gondii* tatsächlich gesenkt werden könne. Daher überwiege vermutlich der Schaden, der durch weitergehende Diagnostik und Therapie hervorgerufen würde, insbesondere wird das Risiko eines Aborts bei einer Amniozentese hervorgehoben (Eikermann et al. 2012). Dem widerspricht allerdings das Deutsche Konsiliarlaboratorium für Toxoplasmose und kritisiert, dass die einbezogenen Studien in erster Linie aus dem französischen Raum stammen und ihnen somit ein anderes Therapieschema zugrunde liege. In Deutschland sei die Rate der durchgeführten invasiven Diagnostik deutlich geringer. Ausschlaggebend sei außerdem, dass der frühzeitige Therapiebeginn das Risiko einer fetalen Schädigung effektiv reduzieren könne (Groß 2012).

1.2.5 Therapie

Zur Therapie der akuten Toxoplasmose stehen das Makrolid-Antibiotikum Spiramycin sowie die Folsäureantagonisten Sulfadiazin und Pyrimethamin zur Verfügung. Letztere werden aufgrund ihrer synergistischen Wirkung im Normalfall gemeinsam verabreicht. Die Gabe von Folsäureantagonisten birgt das Risiko einer Knochenmarksdepression, weshalb begleitend Folsäure gegeben wird. Diese Folsäurevorstufe kann die Säugtierrmembran passieren, nicht jedoch die Parasitenmembran (Luft und Remington 1992).

Die in Deutschland übliche Therapie zur Behandlung der konnatalen Toxoplasmose ist die Gabe von Spiramycin bis zur 16. Schwangerschaftswoche (SSW), danach wird eine Kombinationstherapie aus Sulfadiazin und Pyrimethamin plus Folsäure für insgesamt vier Wochen angewendet. Erfolgte eine mütterliche Infektion nach der 16. SSW, wird die Therapie mit Folsäureantagonisten auf sechs Wochen ausgedehnt. Sollte ein positiver Erregernachweis in der Amnionflüssigkeit gestellt werden, so wird bis zur 36. SSW therapiert. Im Fall von nachgewiesenen Symptomen des Fetus wird die Therapie bis zum Geburtstermin fortgeführt. Ziel der vorgeburtlichen Therapie ist, zum einen die Übertragung des Parasiten auf den Fetus zu verhindern und zum anderen die intrauterine Therapie des Fetus, falls sich eine diaplazentare Transmission nicht verhindern ließ (Groß 2006).

Ein infiziertes Neugeborenes wird in jedem Fall behandelt, um ein Risiko später auftretender Schäden zu vermeiden, auch wenn zum Zeitpunkt der Geburt keine klinischen Symptome vorliegen. Die Therapiedauer richtet sich dabei nach Vorhandensein und Schwere von Symptomen und bewegt sich zwischen drei Monaten bei asymptomatischen Säuglingen bis hin zu einem Jahr bei schwer betroffenen Kindern. Des Weiteren wird eine regelmäßige neurologische und ophthalmologische Untersuchung infizierter Kinder empfohlen (Groß 2006).

Alle bisherigen Therapiemöglichkeiten sind nur gegen die replikativ aktiven Tachyzoiten wirksam, die latente Infektion ist aufgrund des niedrigen Metabolismus der Bradyzoiten nicht behandelbar (Hill und Dubey 2002). Vor dem Hintergrund einer möglichen Reaktivierung bei einer (temporären) Immunsuppression und immer wieder diskutierten psychologischen Auswirkungen einer persistierenden *T. gondii*-Infektion sowie Assoziationen zu erhöhten Risiken für diverse Erkrankungen (Abdoli und Dalimi 2014; Flegr et al. 2014) erscheint auch die Eradikation von bereits inaktiven Infektionen sinnvoll.

Nach wie vor kommt der Prävention die größte Bedeutung bei der Verhinderung von Schäden durch *T. gondii* zu. Schwangeren Frauen wird davon abgeraten, rohes Fleisch zuzubereiten und zu verzehren, ebenso sollte Gartenarbeit nur mit Handschuhen

durchgeführt werden sowie die Nähe zu Katzen und insbesondere die Reinigung von Katzenthoiletten sollten grundsätzlich vermieden werden (Groß 2006).

1.3 Histondeacetylasen und Histondeacetylase-Inhibitoren

1.3.1 Physiologische Bedeutung von Histondeacetylasen

Histondeacetylasen spielen bei der Organisation des Chromatins eine zentrale Rolle. Ohne post-translationale Modifikationen sind Histone durch ihren hohen Gehalt an basischen Aminosäuren positiv geladen und interagieren daher in enger räumlicher Nähe mit dem negativen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Dadurch kondensiert die DNA zusammen mit den assoziierten Proteinen zum sogenannten Heterochromatin. Für die Transkription von Genen ist die Formierung von Euchromatin notwendig, das heißt eine Lockerung der Histon-DNA-Bindung, wodurch Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II an die DNA binden können (Montenarh 2007). Die Regulierung der Histon-DNA-Assoziierung wird über verschiedene Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der positiv geladenen Aminosäurereste erzielt. Die spezifischen Muster von Modifikationen der Histone wird auch als Histon-Code bezeichnet und bestimmt die Transkriptionsaktivität an einer DNA-Sequenz. Acetylierungen werden im Wesentlichen mit einer verminderten DNA-Kondensation und einer gesteigerten Transkription in Verbindung gebracht (Leng et al. 2009). Das Ausmaß der Histonacetylierung wird durch die Aktivität von Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDAC) bestimmt. Histondeacetylasen können gerichtet zu Orten der Transkription rekrutiert werden, beispielsweise als Teil von Co-Repressoren oder Multi-Protein-Transkriptionskomplexen (Villagra et al. 2010).

In Säugetierzellen kommen 18 Histondeacetylasen vor, die in vier Klassen eingeteilt werden. Klasse I, II und IV werden als klassische Histondeacetylasen bezeichnet, Mitglieder der Klasse III werden als Sirtuine bezeichnet. Klassische Histondeacetylasen

sind Zink-abhängig, während Sirtuine auf NAD^+ für ihre katalytische Aktivität angewiesen sind. Mitglieder der Klasse I werden ubiquitär exprimiert, während die anderen Klassen gewebsspezifisch vorkommen (Witt et al. 2009).

Histondeacetylasen sind in ihrer Aktivität nicht auf Histone beschränkt, sondern deacetylieren auch Nicht-Histon-Proteine wie zum Beispiel RelA, p53 und α -Tubulin und regulieren damit auch die Aktivität dieser Proteine auf post-translationaler Ebene (Witt et al. 2009; Villagra et al. 2010). Die Aktivität von Histondeacetylasen unterliegt ebenfalls Regulationsvorgängen. Proinflammatorische Signalwege wie der des JAK/STAT1 und der des NF κ B führen zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau von HDAC1, wodurch die hemmende Wirkung der Histondeacetylase auf die Genexpression antagonisiert wird (Villagra et al. 2010). Somit wirken HDAC-Inhibitoren agonistisch zur IFN γ -Stimulierung. Da *T. gondii* das Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung des Chromatins am pIV-Promotor von *ciita* zugunsten der deacetylierten Form verschieben, üben HDAC-Inhibitoren einen transkriptionsfördernden Einfluss auf die *ciita*-Expression in *T. gondii*-infizierten murinen Makrophagen aus (siehe Abschnitt 1.1.4.3, Lang et al. 2012).

1.3.2 Histondeacetylase-Inhibitoren und ihre klinische Anwendung

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI) werden nach ihrer chemischen Struktur in sechs Gruppen eingeteilt. Sie umfassen kurzkettige Fettsäuren, Hydroxamsäuren, zyklische Peptide, Benzamide, Ketone und einige weitere, die sich keiner der genannten Kategorien zuordnen lassen (Konsoula et al. 2011). Ihre Wirkweise beruht auf der Interaktion mit dem Zinkatom im katalytischen Zentrum der Histondeacetylasen der Klassen I, II und IV (Villagra et al. 2010). Die meisten HDAC-Inhibitoren sind nicht spezifisch, sondern gelten entweder als globale HDAC-Inhibitoren oder hemmen gruppenweise. Ein Beispiel für globale HDAC-Inhibitoren ist der bereits von der FDA (Food and Drug Administration, US-amerikanische

Zulassungsbehörde) zugelassene Inhibitor SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid, Handelsname Vorinostat) (Villagra et al. 2010). Allerdings kursieren hierüber verschiedene Angaben, einige Autoren gehen auch von einer Klasse-I-Spezifität aus (McManamy et al. 2013). MS-275 (Handelsname Entinostat) aus der Gruppe der Benzamide zählt als Klasse-I-spezifisch (McManamy et al. 2013; Wightman et al. 2013).

Aktuell ist die therapeutische Anwendung von HDAC-Inhibitoren gegen maligne Erkrankungen am weitesten fortgeschritten, allerdings wird auch an ihrer Anwendung gegen Autoimmunerkrankungen (Roger et al. 2011; Zhang und Schluesener 2012), das HI-Virus (Wightman et al. 2013) und gegen *Plasmodium falciparum* (Sumanadasa et al. 2012) gearbeitet. Die Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren gegen maligne Zellen wird auf die proapoptotische, differenzierungsfördernde und Zellzyklus-arretierende Wirkung sowie die Inhibierung der Tumorangiogenese und der Metastasierung zurückgeführt (Mombelli et al. 2011). Dabei sind maligne Zellen empfindlicher gegenüber diesen Effekten als normale Zellen (Villagra et al. 2010), wodurch ein therapeutischer Einsatz überhaupt möglich ist. Das bisher bekannte Risikoprofil gilt, verglichen mit anderen antineoplastischen Therapeutika, als vertretbar (Konsoula et al. 2011).

Das Nebenwirkungsprofil von MS-275 basierend auf klinischen Phase-I-Studien, umfasst Anorexie, Nausea, Durchfälle, Kopfschmerzen, Erschöpfungsgefühl und Somnolenz, Hypoalbuminämie, Hypophosphatämie und -natriämie sowie Thrombozyto-, Neutro- und Leukopenie (Ryan et al. 2005; Subramanian et al. 2010). Des Weiteren kam es außerdem zu vermehrten bakteriellen Infektionen, insbesondere durch *Staphylococcus aureus*, zur Reaktivierung fungaler Pneumonien sowie in einem Fall zur Reaktivierung einer Herpes-zoster-Infektion (Ryan et al. 2005; Gojo et al. 2006). Allerdings stammten diese Beobachtungen zu einem großen Teil aus einer Studie mit Leukämie-Patienten, weshalb einer Beurteilung, ob diese Fälle durch die MS-275-Gabe ausgelöst wurden oder die Grunderkrankung ursächlich war, schwer zu treffen ist. Eine neuere Studie gibt an, dass es zu keinen schweren Infektionen gekommen sei (Gore et al. 2008). In Phase-II-Studien reduzierten sich registrierte Nebenwirkungen auf die

genannten gastrointestinalen Beschwerden, Anämie, Abgeschlagenheit und Hypophosphatämie (Subramanian et al. 2010).

In vivo und in vitro wurde nachgewiesen, dass von HDAC-Inhibitoren ein antinflammatorischer Effekt ausgeht. Dies gilt sowohl für bakterielle Infektionen als auch für Autoimmunerkrankungen (Mombelli et al. 2011; Zhang und Schluesener 2012). Beeinträchtigt ist beispielsweise die Phagozytose und die Eradikation phagozytierter Bakterien, die Reaktion auf Toll-like-Rezeptor-Liganden sowie die Interleukinausschüttung (Mombelli et al. 2011; Roger et al. 2011). Des Weiteren verändert sich unter Einfluss von MS-275 der Phänotyp von M1-Makrophagen in Richtung M2-Makrophagen und der Anteil regulatorischer T-Zellen in Lymphknoten steigt, während der Anteil von T-Helferzellen im peripheren Blut sinkt (Zhang und Schluesener 2012). Auf der anderen Seite werden in Anwesenheit des HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) auch einige proinflammatorische Gene stärker exprimiert, wie beispielsweise die Gene für IL-12 und den IL-12-Rezeptor (Roger et al. 2011).

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser Dissertation soll der Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf das IFN γ -regulierte Transkriptom muriner Makrophagen während Infektionen mit *T. gondii* untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei, inwiefern die Erkenntnis, dass HDAC-Inhibitoren die IFN γ -induzierte Expression von sekundären Antwortgenen in *T. gondii*-infizierten Makrophagen wiederherstellen können, auch auf primär durch IFN γ regulierte Antwortgene übertragbar ist. Bisher wurde der Effekt von HDAC-Inhibitoren auf die Expression des primären Antwortgens *irf1* nur in humanen embryonalen Nierenzellen untersucht, wobei kein Effekt gefunden wurde (Rosowski et al. 2014). Aufgrund des divergierenden Ansprechens der Zelltypen auf IFN γ sind hier allerdings Zweifel hinsichtlich der Allgemeingültigkeit dieser Resultate angebracht (Kota et al. 2006; Kim et al. 2007). Die Erkenntnis, ob auch die Expression der primären

Antwortgene mittels einer Modifikation des Acetylierungsstatus ihrer Promotoren durch *T. gondii* vermindert ist, ließe weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Parasiten-Wirt-Interaktion zu.

Darüber hinaus soll geprüft werden, wie sich das veränderte Transkriptom auf die Fähigkeit der Makrophagen zur Parasitenabwehr auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass MS-275 in *T. gondii*-infizierten RAW264.7 einen positiven Effekt auf die IFN γ -induzierte MHCII-Expression ausübt, wodurch eine verbesserte Immunantwort seitens des adaptiven Immunsystems zu erwarten wäre (Lang et al. 2012). Allerdings ist, wie bereits oben beschrieben, die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf das Expressionsmuster sehr komplex und darüber hinaus bestehen weitere physiologische Funktionen von Histondeacetylasen, deren Ausmaß und Bedeutung noch nicht aufgeklärt ist. Daher muss durchaus in Betracht gezogen werden, dass trotz einer verbesserten Antwort auf IFN γ die Makrophagen schlechter in der Lage sind, eine Infektion mit *T. gondii* zu kontrollieren. In eine kritische Betrachtung der Ergebnisse muss ferner einbezogen werden, dass HDAC-Inhibitoren auch eine Wirkung auf die Epigenetik des Parasiten haben können (Bougdour et al. 2009). Von dem *Toxoplasma*-Verwandten *Plasmodium falciparum* ist bekannt, dass unter anderem die Expression von Virulenzfaktoren durch Histondeacetylasen reguliert wird (Sumanadasa et al. 2012). Insofern bedarf es experimenteller Untersuchungen, um den Effekt von HDAC-Inhibitoren auf die Abwehrfähigkeit von murinen Makrophagen gegen *T. gondii* beurteilen zu können.

2 Material

2.1 Zellen und Parasiten

Zelllinie	Bezugsquelle
L929	Institutseigene Charge
NTE	Institutseigene Charge
PTG-luc/GFP	Antonio Barragan, Stockholm, Schweden
RAW264.7	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland

2.2 Laborgeräte

Laborgeräte	Modellbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	BB 6220 CU	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Deckgläschen für Zählkammer, 22 ^x 22 mm	Deckgläser für Haemocytometer	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Bioscience Deutschland GmbH
Fragmentanalysegerät	FragmentAnalyzer TM	Advanced Analytical Technologies, Inc., Heidelberg, Deutschland
Glaspipetten (5,10 & 20 ml)	-	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Hochdurchsatz-Sequenziergerät	HiSeq2000	Illumina, Inc., San Diego, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	-	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland

Laborgeräte	Modellbezeichnung	Hersteller
Mikroskope <ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur, Zellzahlbestimmung 	Axiostar Plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur, Zellbeurteilung 	Leica DMIL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop 	Leica TCS SP2	Leica Microsystems GmbH
Neubauer-Zählkammer	Neubauer CE	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetten 0,5 – 10 µl 2 – 20 µl 10 – 10 µl 100 – 1000 µl	Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler	Schüttler MTS 4	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Spektrophotometer	1. NanoDrop 1000 2. NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Thermocycler	LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Thermoschüttler	1. Thermomixer compact 2. ThermoMixer C	Eppendorf AG
Vortexmischer	Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur 	Megafuge 2.0RS	Heraeus Holding GmbH
<ul style="list-style-type: none"> • Tischzentrifuge 	Centrifuge 5424	Eppendorf AG

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Herstellerbezeichnung	Hersteller
1,5-ml-Reaktionsgefäße	• Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
	• CellStar Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
15-ml-Reaktionsgefäße	Röhre 15 ml	Sarstedt AG & Co.
50-ml-Reaktionsgefäße	Röhre 50 ml	Sarstedt AG & Co.
6-, 12-, 24- und 96-Wellplatten	Gewebekulturplatten	Greiner Bio-One
Deckgläschen, rund, 16 mm Durchmesser	-	Gerhard Menzel GmbH
FACS-Röhrchen	Reagenzgläser starkwandig, 35 x 6 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Objektträger	SuperFrost [®] , geschliffen	Gerhard Menzel GmbH
Pasteurpipetten	Pasteur Capillary Pipettes Long Size, 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdB R Laborglaswaren, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen		Sarstedt AG & Co.
1. 100-1000 µl	1. Biosphere [®] FilterTip 1000	
2. 2-100 µl	2. Biosphere [®] FilterTip 100	
3. 0.5-10 µl	3. Biosphere [®] FilterTip 20	
Zellkulturflaschen	Gewebekulturflasche	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen	Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One
Zellschaber, steril	Zellschaber M,L	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.4 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA

Reagenz	Hersteller
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
MS-275	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Rekombinantes murines Interferon γ (IFN γ)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
RNase-Inhibitor, RNasin	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2.5 Medien

2.5.1 Basismedien

Medium	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640)	Biochrom AG

2.5.2 RAW-Medium

Konzentration	Inhaltsstoff	Hersteller
100 U/ml, 100 μ g/ml	Penicillin, Streptomycin	Biochrom AG
10 μ M	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom AG
1 μ M	Natriumpyruvat	Biochrom AG
2,5 g/l	Glukose	Merck KGaA
10 %	Fetales Kälberserum	Biochrom AG
	in RPMI 1640	Biochrom AG

2.5.3 L929-Medium

<i>Konzentration</i>	<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Hersteller</i>
100 U/ml, 100 µg/ml	Penicillin, Streptomycin	Biochrom AG
1-fach konzentrierte	Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
1 µM	Natriumpyruvat	Biochrom AG
1 %	Fetales Kälberserum	Biochrom AG
	in DMEM	Biochrom AG

2.5.4 Toxoplasma-Medium

<i>Konzentration</i>	<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Hersteller</i>
100 U/ml, 100 µg/ml	Penicillin, Streptomycin	Biochrom AG
1 %	Fetales Kälberserum	Biochrom AG
	in RPMI 1640	Biochrom AG

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Basispuffer

<i>Puffer</i>	<i>Hersteller</i>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG

2.6.2 Immunfluoreszenztest

2.6.2.1 Fixierlösung

Konzentration	Inhaltsstoff	Hersteller
4 %	Paraformaldehyd	Merck KGaA
0,1 M	Natriumcacodylat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.6.2.2 Blockierlösung

Konzentration	Inhaltsstoff	Hersteller
1 %	Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
0,1 mg/ml	Saponin	Sigma-Aldrich
	in PBS, steril, pH 7,4	Biochrom AG

2.6.3 Durchflusszytometrie

2.6.3.1 Blockierlösung

Konzentration	Inhaltsstoff	Hersteller
1 %	Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol GmbH
1 mg/ml	Normales Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove (Pennsylvania), USA
0,1 %	Natriumazid (NaN_3)	Merck KGaA
	in PBS, pH 7,4	Biochrom AG

2.6.3.2 FACS-Puffer

Konzentration	Inhaltstoff	Hersteller
1 %	Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol GmbH
0,1 %	NaN ₃	Merck KGaA
	in PBS, pH7,4	Biochrom AG

2.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
DyLight™488-konjugiertes AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
M5/114 (Anti- Maus-I-A/I-E-Ratten-IgG2b)	Institutseigen, basierend auf Hybridomas von ATCC
Normales Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
R-Phycoerythrin-konjugiertes AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Esel Anti-Ratte IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
A95-1 (Anti-Trinitrophenol-Ratten-IgG2b)	Becton Dickinson GmbH
Anti- <i>T. gondii</i> -Kaninchenserum RS 7.2	Institutseigen

2.8 Kits

Name	Verwendungszweck	Hersteller
AMPD1 Sigma DNase I	DNase-Verdau	Sigma-Aldrich
Genelute Mammalian Total RNA Miniprep Kit	RNA-Isolation	Sigma-Aldrich
Omniscript® Reverse Transcription Kit	Reverse Transkription / cDNA-Synthese	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	DNA-Isolierung	Qiagen
SYBR Green FastStart DNA Master ^{Plus} Set	Quantitative Real-Time PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.9 Software

<i>Programm</i>	<i>Verwendungszwecke</i>	<i>Hersteller</i>
Statistica 12.0	Kalkulierung des p-Werts = 0,05	StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg, Deutschland
Cell Quest Pro	Analyse der Durchflusszytometrie-Daten	Becton Dickinson GmbH
LightCycler Software 3.5	Erstellung der Schmelzkurven der qPCR	Roche Diagnostics GmbH
NanoDrop 2000/2000c Software	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung	Thermo Scientific
Excel	Berechnung Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler, Erstellung von Diagrammen	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Leica Confocal Software	Aufnahme der Bilder im Immunfluoreszenztest	Leica Microsystems GmbH

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank Klasse II durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets bei 37 °C und 5 % CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre. Vor jeder Subkultivierung wurden die bestehenden Zellkulturen mikroskopisch auf Kontaminationen hin untersucht. Die beschriebenen Subkultivierungen wurden alternierend im Abstand von drei und vier Tagen durchgeführt.

3.1.1 RAW264.7-Kultur

Für die Versuche wurde die murine Zelllinie RAW264.7 verwendet. Hierbei handelt es sich um leukämoide Monozyten, die aus einem Lymphom einer Abelson-Maus-Leukämie-Virus-infizierten Maus isoliert wurden (Raschke et al. 1978). Die Kultivierung erfolgte in 200-ml-Zellkulturflaschen (Greiner Bio One). Zur Subkultivierung wurden die bestehenden Kulturen abgeschabt, aus mehreren Flaschen vereinigt und resuspendiert. Anschließend wurden je 1,5 ml Zellsuspension in die Flaschen zurückgegeben, was etwa $1,245 \cdot 10^6$ Zellen entspricht und mit 30-35 ml RAW-Medium aufgefüllt.

3.1.2 *Toxoplasma-gondii*-Kultur

Für die meisten Versuche mit Ausnahme der Durchflusszytometrie wurden acht bis 15 Tage alte Tachyzoiten des *Toxoplasma* Typ II Stamms NTE verwendet. Die NTE-Linie stammt aus einem *Toxoplasma*-infizierten HIV-Patienten und wurde zur genetischen Homogenisierung doppelt kloniert (Gross et al. 1991). Für FACS-Analysen wurden Tachyzoiten des Typ II-Stamms PTG-luc verwendet, da diese das Green Fluorescent

Protein (GFP) exprimieren, wodurch sie fluoreszenzspektroskopisch nachweisbar waren. Die beiden Stämme wurden in demselben Medium kultiviert, zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen mit dem jeweils anderen Parasitenstamm wurden dennoch getrennte Flaschen Medium angesetzt.

Die Parasiten wurden mit der tumorösen Fibroblastenzelllinie L929 ko-kultiviert, hierfür wurden sieben bis 14 Tage alte L929/*Toxoplasma*-Kulturen verwendet, wobei von etwa ein bis zwei Milliarden Parasiten pro Vertiefung ausgegangen wird. Für die Subkultivierung wurden jeweils fünf Vertiefungen benutzt.

Die Ko-Kulturen wurden in Zwölf-Well-Platten (Greiner Bio One) angelegt. In horizontaler Ausrichtung wurde je eine Reihe mit fünf, vier und drei Tropfen der L929-Suspension bestückt, vertikal wurden dreimal sechs Tropfen, sechsmal vier Tropfen und dreimal zwei Tropfen *Toxoplasma*-Suspension verwendet. Durch dieses Vorgehen wurde ein Gradient des Infektionsverhältnis von 10:1 ($2,25 * 10^6$ zu $0,245 * 10^6$) bis hin zu 48:1 ($6,75 * 10^6$ zu $0,1407 * 10^6$) erzeugt. Dieser Abschätzung liegt die Annahme zugrunde, dass ein mit einer Glaspipette erzeugter Tropfen 37,5 µl entspricht und eine Vertiefung der L929/NTE-Subkultur insgesamt ca. 500 µl enthält. Nach Vorlage von L929 und Zugabe des Parasiten wurden alle Vertiefungen auf ungefähr 500 µl aufgefüllt.

3.1.3 L929-Kultur

Die L929-Kulturen wurden in 6-Well-Platten (Greiner Bio One) in jeweils vier Milliliter Medium angezogen. Zur Subkultivierung wurden sie mit einem Teflonspatel abgeschabt, gepoolt und dabei resuspendiert. Sechs bis acht Tropfen Zellsuspension wurden pro Vertiefung zur Aufrechterhaltung der L929-Kulturen verwendet, wobei in einem Milliliter ca. $1,25 * 10^6$ Zellen enthalten waren und somit in acht Tropfen (entsprach ca. 300 µl) etwa $0,375 * 10^6$ L929 enthalten waren. Die Wells wurden mit vier Milliliter L929-Medium aufgefüllt.

3.1.4 Aussaat der RAW264.7-Zellen für Infektionsversuche

Zur Anlage der Versuchskulturen wurden RAW264.7 aus zwei bis drei Flaschenkulturen mit einem Einmalzellschaber abgeschabt, resuspendiert und gepoolt. Zur Isolierung wurde die Zelllösung bei 400 g für fünf Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 2.0 RS), der Überstand verworfen und die Zellen in zehn Milliliter RAW-Medium gewaschen. Diese Lösung wurde erneut mit den genannten Parametern zentrifugiert und das Pellet in drei Milliliter Medium resuspendiert. Hiervon wurde eine 1:5 Verdünnung in RAW-Medium erstellt, die wiederum im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau verdünnt wurde, um in der nachfolgenden Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer tote Zellen von vitalen unterscheiden zu können. Entsprechend der Konzentration wurde nun das benötigte Volumen für die gewünschte Zellzahl berechnet.

3.1.4.1 Infektion, Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation

Die Infektion der RAW264.7-Zellen erfolgte jeweils 24 Stunden nach Aussaat. Zur Infektion wurden die Parasiten aus den oben beschriebenen L929/*Toxoplasma-gondii*-Kulturen durch differenzielle Zentrifugation gewonnen. Dafür wurden zunächst die Wirtszellen durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 34 g abgetrennt und danach die Parasiten aus dem Überstand bei 1314 g für zehn Minuten (Megafuge 2.0 RS) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in zehn Milliliter RAW-Medium gewaschen, erneut bei 1314 g zehn Minuten zentrifugiert und die Parasiten in einem Milliliter RAW-Medium resuspendiert. Die Konzentration der Parasitensuspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, hierfür wurde eine 1:50-Verdünnung verwendet. Im Anschluss daran wurde das benötigte Volumen für die jeweils gewünschte Zellzahl errechnet und die RAW264.7 damit infiziert.

Eine Stunde post infectionem (p.i.) wurden die Kulturen mit 2 μ M MS-275 in DMSO oder 2 μ M Natriumbutyrat in Wasser behandelt. Aufgrund der potentiell zellschädigenden Wirkung des DMSO wurde die Kontrollgruppe mit derselben Konzentration reinem DMSO behandelt.

Drei Stunden nach Infektion wurde ein Teil der Ansätze mit 100 U/ml rekombinantem murinem IFN γ stimuliert. Bei denjenigen Kulturen, die für 42 oder 48 Stunden kultiviert wurden, wurde die Stimulation mit IFN γ nach 24 Stunden wiederholt. In einigen Versuchen wurden zusätzlich drei Stunden p.i. 10 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS) zugegeben.

3.2 Transkriptmengen der primären Antwortgene IRF-1 und IRF-8 sowie des sekundären Antwortgens CIITA

Mithilfe der Reversen Transkription und der quantitativen „Real-Time PCR“ (RT-qPCR) wurde die Regulation von primär durch IFN γ induzierten Genen bzw. von nachfolgend (sekundär) regulierten Genen in Anwesenheit von HDAC-Inhibitoren in infizierten und nicht infizierten RAW264.7 quantifiziert.

3.2.1 Versuchsanlage

Zu diesem Zweck wurden 6-Well-Platten mit je $1 \cdot 10^6$ RAW264.7 pro Vertiefung beimpft und 24 Stunden lang in 2,5 ml RAW-Medium kultiviert. Ein Teil der Vertiefungen wurde anschließend mit $1,2 \cdot 10^7$ *T. gondii* versetzt und alle Wells mit RAW-Medium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt.

Eine Stunde nach Infektion wurden vier Ansätze (je zwei infizierte und nicht infizierte) als Kontrolle lediglich mit DMSO behandelt, weitere vier Ansätze wurden mit 2 μ M MS-275 behandelt, und weitere vier mit 2 μ M Natriumbutyrat. Zwei Stunden danach wurden je ein Ansatz infizierte und nicht infizierte Zellen mit 100 U/ml IFN γ stimuliert.

3.2.2 RNA-Isolation, DNase-Verdau und Reverse Transkription

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurde die Gesamt-RNA mithilfe des Silica-membran-basierten Genelute Mammalian Total RNA Miniprep Kit isoliert. Die Isolierung wurde nach Anleitung des Kits durchgeführt; lediglich wurden 350 µl Lyse-Puffer statt der vorgeschlagenen 250 µl verwendet. Nach der RNA-Isolation wurde genomische DNA mit amplifikationsgeeigneter DNase I entsprechend den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) verdaut.

Die mRNA wurde unter Verwendung des Omniscript[®] Reverse Transcription Kit entsprechend Herstellerangaben (Qiagen) in cDNA umgeschrieben; die Inkubationszeit der Reversen Transkriptase wurde jedoch um eine halbe Stunde auf 90 Minuten erhöht.

Im Regelfall wurden 2 µg RNA pro Reaktionsansatz verwendet, die hierfür notwendige Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit dem Nanodrop 1000 oder Nanodrop 2000 vorgenommen.

3.2.3 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Real-Time PCR wurde das SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} Set verwendet. Das Reaktionsgemisch des Kits enthält unter anderem den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I, dNTPs und eine modifizierte Taq-DNA-Polymerase. Ein Reaktionsansatz beinhaltet folgende Komponenten:

9 µl	PCR-geeignetes Wasser (im Kit enthalten)
1 µl	5 µM Vorwärtsprimer
1 µl	5 µM Rückwärtsprimer
4 µl	Reaktionsgemisch (im Kit enthalten)
5 µl	1:2 oder 1:20 verdünnte cDNA

Jede cDNA-Probe wurde in zwei Verdünnungen zwischen 1:2 und 1:50 mithilfe des LightCyclers amplifiziert und die Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus gemessen. Bei der Berechnung der IFN γ -induzierten Hochregulation der Genexpression in Ab- oder Anwesenheit von HDAC-Inhibitoren bei nicht infizierten und *T. gondii*-infizierten RAW264.7 wurde die Expression von β -Aktin als Referenz benutzt.

Neben *irf1* und *irf8* als direkt von IFN γ -regulierten Genen wurde auch die Hochregulation von dem sekundär regulierten Gen *ciita* als interne Kontrolle gemessen, bei dem die weitgehende Aufhebung des inhibitorischen Effekts des Parasiten bereits gezeigt wurde (Lang et al. 2012).

Für die qPCR wurden folgende Primer verwendet:

<i>Gen</i>	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>
<i>irf1</i>	5'-GGTCCCAAGCCAGTGAAATG-3'	5'-TAGTCAAGAGTCACGCCAAGG-3'
<i>irf8</i>	5'-CCTGTCCAGCTCCATACCC- 3'	5'-TCTGCCCTGTTGTGTACTG-3'
<i>ciita</i>	5'-GTGAGCGCTGGTAGACAGAAC-3'	5'-GCCTTTTGGTTCACACCCAGG-3'
<i>actb</i>	5'-GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC-3'	5'-TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG-3'

Für die Lightcycler-Amplifikation wurden folgende Parameter angewendet:

	<i>irf1</i>	<i>irf8</i>	<i>ciita</i>	<i>actb</i>
Denaturierung				
- Durchläufe	1	1	1	1
- Inkubationszeit	10 Minuten	10 Minuten	10 Minuten	10 Minuten
- Temperatur	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Amplifikation				
- Durchläufe	45	45	45	45
- Inkubationszeit	10 / 10 / 12 Sek.	10 / 10 / 15 Sek.	10 / 10 / 12 Sek.	10 / 10 / 20 Sek.
- Temperatur	95 / 66 / 72 °C	95 / 62 / 72 °C	95 / 68 / 72 °C	95 / 60 / 72 °C
Schmelzkurve				

	<i>irf1</i>	<i>irf8</i>	<i>ciita</i>	<i>actb</i>
- Durchläufe	1	1	1	1
- Inkubationszeit	0 / 15 / 0 Sek.	0 / 15 / 0 Sek.	0 / 15 / 0 Sek.	0 / 15 / 0 Sek.
- Temperatur	95 / 66 / 99 °C	95 / 62 / 99 °C	95 / 68 / 99 °C	95 / 60 / 99 °C
Abkühlen				
- Durchläufe	1	1	1	1
- Inkubationszeit	30 Sekunden	30 Sekunden	30 Sekunden	30 Sekunden
- Temperatur	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C

3.3 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse gibt einen vollständigen Einblick über die Genexpression einer Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde diese Methode genutzt, um den Einfluss des HDAC-Inhibitors MS-275 auf die IFN γ -regulierte Genexpression in *Toxoplasma*-infizierten und nicht infizierten RAW264.7 Zellen zu untersuchen. Zusätzlich zu der beschriebenen mRNA-Detektion mittels RT-qPCR sollte dadurch unter anderem auch ein Überblick über die Regulation weiterer primär durch IFN γ -regulierter Antwortgene in infizierten RAW264.7 unter MS-275-Behandlung gewonnen werden. Des Weiteren fand eine Validierung der Ergebnisse der RT-qPCR statt.

Die Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit dem Transkriptomlabor der Universität Göttingen durchgeführt. Dort wurde die eigentliche Analyse vorgenommen, während Zellkultur, Gewinnung der RNA sowie die Auswertung der Rohdaten selbst durchgeführt wurden.

3.3.1 RNA-Gewinnung

Die RNA-Isolation für die Transkriptomanalyse erfolgte aus je fünf Ansätzen:

Probe	RAW264.7	<i>T. gondii</i>	MS-275	IFN γ
1	+	-	-	-
2	+	-	-	+
3	+	+	-	+
4	+	-	+	+
5	+	+	+	+

Die Ansätze entsprachen im Wesentlichen denen der Versuche für die Expressionsanalyse mittels RT-qPCR, und es wurde daher bereits isolierte RNA der entsprechenden Ansätze verwendet. Dabei wurde jeweils RNA von vier biologischen Replikaten ausgewählt, von denen die Proben von je zwei Replikaten vereinigt wurden, um die Kosten der High-Throughput-RNA-Sequenzierung zu reduzieren. Es wurden Replikate für die Transkriptomanalyse ausgewählt, die zum einen in der photometrischen Bestimmung keine größeren Verunreinigungen aufwiesen und die zum anderen nach RT-qPCRs konsistente Resultate geliefert hatten.

3.3.2 Probenaufbereitung

Wie bereits erwähnt, wurde Probenaufbereitung und High-Throughput mRNA-Sequenzierung im Transkriptomanalyselabor der Universität Göttingen durchgeführt, ihr grundlegendes Prinzip soll zum besseren Verständnis hier kurz dargelegt werden.

Als vorbereitender Schritt wurde eine Qualitätskontrolle der RNA mittels Fragment-Analyse durchgeführt, wobei die Degradation der RNA anhand der Fragmentlängen der ribosomalen RNA bewertet wurde. Die Fragmentlängen wurden mithilfe von Gelkapillaren in dem Gerät FragmentAnalyserTM bestimmt. Die Ergebnisse wurden als RNA Quality Indicator (RQN) ausgegeben, der Idealwert beträgt 10,0 bis zu einem Wert von 7,0 kann die Transkriptomanalyse durchgeführt werden.

Nach einem zufriedenstellenden Ergebnis der Qualitätsanalyse mit RQN-Werten zwischen 8,0 und 10,0 wurde die sogenannte „Library“ aus den RNA-Proben synthetisiert. Dabei wurde zuerst die mRNA aus der Gesamtmenge der RNA isoliert, indem der Poly-A-Schwanz der eukaryontischen mRNA an komplementäre Oligo-dTs gebunden wurde, die an magnetische Partikel gekoppelt waren und so aufgereinigt werden konnten. Im Anschluss daran wurde die mRNA fragmentiert. Dies geschah mithilfe von divalenten Kationen und aufsteigender Temperatur. Im nächsten Schritt wurden die mRNA-Fragmente mittels reverser Transkriptase und Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben, der komplementäre Strang zur cDNA wurde dann durch Polymerase I synthetisiert, während die verbleibende RNA mittels RNase H enzymatisch abgebaut wurde. Daran anschließend wurde eine einzelne Adenosinbase zur Endreparation angefügt. Danach wurden Adapteroligomere an die 5' und am 3'-Enden ligiert, die zur eigentlichen Analyse im Illumina-Verfahren notwendig waren.

3.3.3 Probenanalyse

Die Analyse erfolgte mit dem Gerät HiSeq2000. Dies ist eine Sequenzierungstechnik, bei der während der Synthese eines neuen DNA-Strangs das jeweils zuletzt gebundene Nukleotid mithilfe fluoreszenzmarkierter Nukleotide und hochauflösenden Kameras detektiert wird.

Die mit Adaptoren versehenen cDNA-Fragmente werden auf ein Durchflussmodul gegeben, auf dessen Oberfläche sich zu den Adaptoren komplementäre Primer befinden, wodurch die cDNA-Fragmente auf ihr gebunden wurden. Darauf folgt die sogenannte „Brücken-Amplifikation“ - die endständigen Adapteroligomere binden an noch freie oberflächengebundene Primer, wodurch eine Art Bogen entsteht. Nach Zugabe von freien Nukleotiden und einer DNA-Polymerase beginnt die Amplifikation ausgehend vom 3'-Ende des oberflächenständigen Primers. Hiernach erfolgt die Denaturierung des entstandenen Doppelstrangs und der Vorgang wiederholt sich. Durch Wiederholungen der Amplifikation entstehen auf der Oberfläche des

Durchflussmoduls Cluster, die jeweils auf ein einziges Ursprungsmolekül zurückzuführen sind.

Zum Sequenzierungsansatz werden nach einem Denaturierungsschritt DNA-Polymerase, Primer und die vier verschieden markierten Nukleotide zugegeben. Die fluoreszenzmarkierten Nukleotide dienen gleichzeitig als Terminatoren, sodass an jedes DNA-Molekül nur ein Nukleotid angefügt werden kann. Danach erfolgen die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe und die Detektion des Signals. Da alle DNA-Stränge eines Clusters das gleiche Nukleotid binden, befindet sich das Signal im detektierbaren Bereich. Anschließend wird der gebundene Farbstoff chemisch gelöst, wodurch das jeweils nächste Nukleotid binden und detektiert werden kann.

3.4 Immunfluoreszenztest

Mithilfe des Immunfluoreszenztests sollte untersucht werden, ob eine mögliche Hochregulation von primär und sekundär IFN γ -regulierten Genen in infizierten Makrophagen die Fähigkeit der Makrophagen zur Parasitenabwehr beeinflusst. Als Parameter für eine effektive Infektabwehr wurden die intrazelluläre Replikationsrate - dargestellt anhand der Anzahl Parasiten pro Vakuole - sowie der Anteil infizierter Wirtszellen bestimmt.

3.4.1 Versuchsanlage

Für den Immunfluoreszenztest wurden 75.000 RAW264.7-Zellen pro Vertiefung in zwei 24-Well-Platten ausgesät. Vierundzwanzig Stunden danach wurden alle Ansätze mit Tachyzoiten der *T. gondii*-Linie NTE im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1 infiziert. Je ein Drittel der Ansätze wurde 1 Stunde später mit MS-275 oder Natriumbutyrat in einer Konzentration von 2 μ M behandelt, der Kontrollgruppe wurde dasselbe Volumen

DMSO in gleicher Verdünnung zugegeben wie den HDAC-Inhibitor-behandelten Ansätzen. Ein Teil der Zellen wurde außerdem drei Stunden p.i. und 27 Stunden p.i mit 100 U/ml IFN γ stimuliert, ein Teil mit 100 U/ml IFN γ und 10 ng/ml LPS, wobei auch hier 27 Stunden p.i mit IFN γ nachstimuliert wurde. Die restlichen Zellen blieben unstimuliert, sodass jede mögliche Kombination aus Inhibitorbehandlung und Stimulation gegeben war. In zwei Einzelversuchen wurde außerdem der alleinige Effekt von LPS geprüft.

	<i>Mock (DMSO)</i>	<i>MS-275</i>	<i>Natriumbutyrat</i>
-	1A	2A	3A
IFN γ	1B	2B	3B
IFN γ & LPS	1C	2C	3C
LPS	1D	2D	3D

3.4.2 Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden 24 und 48 Stunden p.i. fixiert. Dazu wurden sie zweimal in je 0,5 ml sterilem PBS pro Vertiefung gewaschen. Durch die Zugabe von je 0,3 ml 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumcacodylat (pH 7,4) pro Vertiefung für eine Stunde wurden die RAW264.7 auf den Deckgläschen fixiert. Anschließend wurde erneut zweimal in je 0,5 ml PBS gewaschen und die Zellen wurden dann mit je 1 ml PBS überschichtet und bei 4 °C bis zu weiteren Verarbeitung gelagert. Die anschließende Färbung der Zellen konnte unter unsterilen Bedingungen erfolgen.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden zehn Minuten mit je 0,5 ml 50 mM NH $_4$ Cl in PBS pro Vertiefung inkubiert, anschließend wurde für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran und zur Absättigung unspezifischer

Proteinbindestellen wurden dann 0,3 ml 0,1 mg/ml Saponin, 1 % BSA in PBS (Blockierlösung) pro Vertiefung für eine Stunde zugeben. Als Primärantikörper wurde ein institutseigenes Kaninchen-Antiserum gegen Toxoplasmen-Antigene verwendet. Das Serum wurde 1:2000 in Blockierlösung verdünnt, und es wurde je 0,3 ml Antikörperlösung pro Vertiefung verwendet. Nach einer Stunde wurden die Zellen dreimal für je zehn Minuten mit 1 ml 0,1 mg/ml Saponin in PBS pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurden sie mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörperfragmenten DyLight™488-konjugiertes F(ab')₂ Esel anti-Kaninchen IgG eine Stunde lang inkubiert. Die Antikörperfragmente wurden hierfür 1:200 in der Blockierlösung verdünnt und die Deckgläschen mit der Zellseite in 30 µl der Antikörperlösung auf Parafilm gelegt. Nachdem die Deckgläschen wieder in die Vertiefungen der 24-well-Platte überführt worden waren, folgten drei Waschschrte identisch zu denen nach Inkubation mit dem Primärantikörper. Danach wurde für zehn Minuten mit 1 ml PBS gewaschen. Um die Gesamtzellpopulation sichtbar zu machen, wurden anschließend die Nukleinsäuren der Zellen für vier Minuten lang mit 5 µg/ml Propidiumiodid in PBS gefärbt und danach die Zellen zweimal je fünf Minuten mit 1 ml PBS pro Vertiefung gewaschen.

Zum Schluss wurden die Deckgläschen kurz in vollentsalztem Wasser gespült, die Flüssigkeit vorsichtig abgetupft und die Deckgläschen an der Luft leicht angetrocknet, bevor sie mit der Zellseite nach unten in 10 µl Mowiol pro Deckgläschen auf Objektträgern eingebettet wurden. Die Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei 4 °C gelagert. Sie wurden mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie oder konfokaler Laserscanmikroskopie mit einem Leica TCS SP2 analysiert.

3.5 DNA-Isolierung zum quantitativen Toxoplasma-Nachweis

Zur Validierung des Immunfluoreszenztest wurde eine Quantifizierung von *T. gondii* mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt und die genomische DNA von *T. gondii* nach 4, 24 und 48 Stunden p.i. in RAW264.7-Kulturen nachgewiesen.

3.5.1 Versuchsanlage

Für die unterschiedlichen Zeitpunkte der DNA-Isolierung wurden jeweils 7 unterschiedlich behandelte Proben entsprechend dem folgenden Schema angelegt.

Probe	RAW264.7	<i>T. gondii</i>	MS-275	IFN γ	LPS
1	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	-	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	-

Dazu wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte $1 \cdot 10^6$ RAW264.7 in 2,5 ml RAW-Medium ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Makrophagen im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1 mit *T. gondii* infiziert, wobei von einer Verdoppelung der leukämoiden Makrophagen innerhalb von 24 Stunden ausgegangen wurde. Pro Vertiefung wurde darum mit $3 \cdot 10^6$ Parasiten infiziert. Eine Stunde nach der

Infektion wurden die Zellen mit 2 μM MS-275 behandelt, zwei Stunden danach wurden die Makrophagen mit 100 U/ml IFN γ alleine oder zusammen mit 10 ng/ml LPS stimuliert.

3.5.2 Isolierung genomischer DNA

Vier, 24 und 48 Stunden p.i. wurde aus den Zellen die genomische DNA isoliert, hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, ein Milliliter PBS pro Vertiefung zugegeben, und die Zellen abgeschabt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zur nachfolgenden DNA-Isolierung wurde das Silicamembran-basierte QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit verwendet; dabei wurde das Herstellerprotokoll zur Isolierung von DNA aus Zellkulturen weitestgehend angewendet, einzig der erste Zentrifugationsschritt wurde mit 400 g statt 300 g durchgeführt.

3.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR wurde, wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben, das SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} Set (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Ein Reaktionsansatz von 20 μl Gesamtvolumen enthielt die folgenden Bestandteile:

13,50 μl	PCR-geeignetes Wasser (im Kit enthalten)
0,25 μl	12 μM Primer „Toxo 9“ (Reischl et al. 2003)
0,25 μl	12 μM Primer „Toxo 11“ (Reischl et al. 2003)
4,00 μl	Reaktionsgemisch (im Kit enthalten)
2,00 μl	Genomische DNA

Die genannten Primer dienen der Amplifikation des 529-bp-Fragments, das hochrepetitiv im Genom von *T. gondii* vorkommt und somit einen sensitiven Nachweis ermöglicht (Reischl et al. 2003). Für die Ermittlung der „Crossing points“ und zur Erstellung der Schmelzkurve wurden folgende Amplifikationsbedingungen verwendet:

	<i>T. gondii</i>-529-bp-Fragment
Denaturierung	
- Durchläufe	1
- Inkubationszeit	10 Minuten
- Temperatur	95 °C
Amplifikation	
- Durchläufe	45
- Inkubationszeit	10 / 10 / 10 Sek.
- Temperatur	95 / 62 / 72 °C
Schmelzkurve	
- Durchläufe	1
- Inkubationszeit	20 / 20 / 0 Sek.
- Temperatur	95 / 62 / 95 °C
Abkühlen	
- Durchläufe	1
- Inkubationszeit	10 Sekunden
- Temperatur	40 °C

Eine Normalisierung auf die Menge des murinen β -Aktins wurde für einen der Versuche durchgeführt. Da sich allerdings keine nennenswerten Unterschiede in den Ergebnissen ergaben, wurde bei den folgenden Versuchen von diesem Schritt abgesehen.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente ebenfalls der Bestimmung der Parasitendichte innerhalb der *Toxoplasma*-infizierten RAW264.7-Zellen und stellte damit eine weitere Methode zur Untersuchung der Replikationsrate von *T. gondii* in An- und Abwesenheit von MS-275 dar.

Um die Parasiten mittels des Durchflusszytometers (FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) detektieren zu können, wurde die Mutante eines *Toxoplasma*-Typ-II-Stamms verwendet, der das grün-fluoreszierende-Protein (GFP) exprimiert (PTG-luc/GFP). Des Weiteren wurden auf der Oberfläche der RAW264.7 die MHC-II-Moleküle I-A/I-E mittels spezifischer Antikörper gefärbt, um mögliche Unterschiede in der MHC-II-Oberflächenexpression zwischen *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten Zellen identifizieren zu können.

3.6.1 Versuchsanlage und Zellisolierung

Pro Ansatz wurden je $5 \cdot 10^6$ RAW264.7-Zellen in Zellkulturschalen mit 92 mm Durchmesser in 9 ml RAW-Medium ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit dem Stamm PTG-luc/GFP im Verhältnis 3:1 infiziert, dies entsprach $3 \cdot 10^7$ Parasiten pro Zellkulturschale, da sich die Wirtszellen nach 24 Stunden etwa verdoppelt hatten. Eine Stunde p.i. wurden die Zellen entweder mit 2 μ M MS-275 oder als Kontrollansätze mit DMSO behandelt, drei Stunden p.i. wurden die Zellen mit 100 U/ml IFN γ stimuliert und 27 Stunden p.i. mit IFN γ restimuliert.

	RAW264.7	<i>T. gondii</i>	MS-275	IFN γ
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	-	-	+
4	+	+	-	+

	RAW264.7	<i>T. gondii</i>	MS-275	IFNγ
5	+	-	+	-
6	+	+	+	-
7	+	-	+	+
8	+	+	+	+

Zweiundvierzig Stunden nach Infektion der RAW264.7 wurden sie mit Zellschabern abgeschabt und resuspendiert. Anschließend wurden sie bei 400 g und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml RAW-Medium gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und die Zellen dann in 1 ml RAW-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt; hierfür wurde die Zelllösung im Verhältnis 1:2 mit 0,1 % Trypanblau vermischt, um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Für die Zellzahlbestimmung wurden allerdings tote Zellen mit einbezogen.

Von jeder Probe wurden drei Färbeansätze mit je $0,5 \cdot 10^6$ RAW264.7 untereinander auf eine 96-Well-Platte mit V-förmigen Vertiefungen transferiert. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 400 g für fünf Minuten zentrifugiert und wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung weiterbehandelt.

3.6.2 Immunfluoreszenzfärbung und Fixierung

Einer der drei aus einer Probe stammende Färbeansatz wurde jeweils als Negativkontrolle belassen, der zweite wurde jeweils mittels M5/114-Antikörper und PE-anti-Ratte-IgG gefärbt und der dritte Ansatz wurde jeweils als Isotypenkontrolle angelegt.

Nachdem der Überstand mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt worden war, wurden die Zellpellets in je 50 μ l Blockierlösung (1 % BSA, 1 mg/ml normales Maus-Gammaglobulin, 0,1 % NaN_3 in PBS, Ph 7,4) mittels Plattenschüttler (Schüttler MTS 4)

resuspendiert. Das enthaltene Natriumazid sollte die Endozytose der I-A/I-E-Moleküle, die den Primärantikörper gebunden hatten, verhindern. Das murine IgG sollte Fc-Rezeptoren der Makrophagen blockieren, sodass falsch positive Signale, die auf eine Bindung des primären Antikörpers an die Fc-Rezeptoren zurückzuführen waren, verhindert wurden. Das BSA blockierte unspezifische Proteinbindungsstellen. Die leukämoiden Makrophagen wurden nun 30 Minuten lang auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C bei 400 g für fünf Minuten zentrifugiert und die Pellets danach entweder mit 50 µl FACS-Puffer (ungefärbte Negativkontrolle), 2 µg/ml I-A/I-E-spezifischen primärem Antikörper M5/114 oder 2 µg/ml des Isotypkontrollantikörpers A95-1, jeweils verdünnt in FACS-Puffer, resuspendiert. Als Isotypkontrolle wird ein Antikörper desselben Isotyps (hier Ratte IgG2b) wie der Primärantikörper ohne natürliches Hapten auf der Zielzelle (hier Trinitrophenol) verwendet, weshalb kein spezifisches Signal des Antikörpers zu erwarten ist. Sollte trotzdem ein Signal detektiert werden, so kann dies auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers unabhängig von seiner variablen Kette zurückgeführt werden. Dieses Bindungsverhalten kann auf den Primärantikörper übertragen werden, womit die unspezifische Hintergrundfärbung einer Messung abgeschätzt werden kann. Die Ansätze wurden nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurden die RAW264.7, wie oben angegeben, zentrifugiert und das Pellet dreimal mit je 100µl FACS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers vom letzten Waschschrift wurden die Zellen in 50 µl des Sekundärantikörpers (R-Phycoerythrin-konjugiertes AffiniPure F(ab')₂ Fragment Esel anti-Ratte IgG (H+L)) inkubiert. Der Antikörper wurde 1:50 in FACS-Puffer verdünnt. Phycoerythrin fluoresziert rot und kann so in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle wurde anstatt des Sekundärantikörpers mit demselben Volumen FACS-Puffer versetzt. Alle Ansätze wurden 30 Minuten lang auf Eis und lichtgeschützt inkubiert. Auch alle folgenden Arbeiten wurden möglichst lichtgeschützt durchgeführt. Danach wurden die RAW264.7 erneut zentrifugiert und dreimal mit je 100 µl FACS-Puffer, wie oben beschrieben, gewaschen.

Nach dem letzten Waschen wurde erneut zentrifugiert und jedes Zellpellet mit insgesamt 300 µl 1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) resuspendiert und die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen überführt.

3.6.3 Durchflusszytometrische Analyse

Die Analyse der GFP-Signalstärke und der I-A/I-E-Expression wurde mithilfe des Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortiergeräts BD FACSCalibur sowie des zugehörigen Computerprogramms CellQuest Pro durchgeführt. Pro Probe wurden 10 000 Zellen untersucht, wobei eine Flussrate zwischen 200 und 300 Ereignissen pro Sekunde angestrebt wurde. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der jeweiligen Fluoreszenz - FL1-H entsprach dem GFP-Signal und FL2-H dem I-A/I-E-Signal – sowie die Quadrantenstatistik des Dot Plots aus dem logarithmierten Parameter FL1-H auf der X-Achse und dem logarithmierten Parameter FL2-H auf der y-Achse herangezogen.

3.7 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Versuchsdaten aus mindestens drei unabhängigen Versuchswiederholungen; aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurde das arithmetische Mittel gebildet. Die in der RT-qPCR zur Bestimmung der Expression von *irf1*, *irf8* und *ciita* ermittelten Quotienten aus den beiden Verdünnungen einer Probe wurden ebenfalls gemittelt. Als Fehlerindikator wurde der Standardfehler herangezogen. Die Signifikanz der Daten wurde mittels eines gruppierten unabhängigen t-Tests geprüft, hierfür wurde das Programm STATISTICA benutzt. p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet.

Die Ergebnisse der RT-qPCR wurden außerdem im Verfahren nach Dixon auf Ausreißer getestet. Für Ausreißer nach oben wurde der zweithöchste Wert von dem potentiellen Ausreißer subtrahiert und durch die Differenz aus potentiellstem Ausreißer und niedrigstem Wert dividiert. Für mögliche Ausreißer nach unten wurde äquivalent mit dem zweitniedrigstem Wert und dem niedrigsten Wert (potentieller Ausreißer) verfahren. Der gebildete Quotient wurde dann mit festgelegten Signifikanzschranken verglichen, die vom gewünschten Signifikanzniveau (hier $p = 0,05$) und der Stichprobengröße abhängig sind. Bei Überschreitung dieser Signifikanzschranken wurde der entsprechende Wert als Ausreißer klassifiziert und nicht mit in die Auswertung einbezogen. Vier Werte wurden so als Ausreißer identifiziert und daher nicht berücksichtigt. Außerdem mussten sieben andere aufgrund einer mangelnden Reaktion der nicht infizierten Zellen auf IFN γ aus der Versuchsreihe ausgeschlossen werden, da hier der Verdacht bestand, dass die RAW264.7-Zellen nicht mehr ihr ursprüngliches Expressionsmuster zeigten. Nach der Verwendung eines frischen Zellaliquots fand wieder eine normale Reaktion auf IFN γ statt

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Expression IFN γ -regulierter Gene in *T. gondii*-infizierten RAW264.7

4.1.1 I-A/I-E-Expression

Lang et al. haben nachgewiesen, dass *T. gondii* die IFN γ -induzierte I-A/E-Expression stark mindert. MS-275 verstärkte die IFN γ -Antwort der Monozyten/ Makrophagen, sodass die Hemmung durch den Parasiten antagonisiert wurde (Lang et al. 2012). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden.

Die Stimulation mit IFN γ bewirkte in den nicht infizierten RAW264.7 einen signifikanten Anstieg des Anteils der I-A/I-E-exprimierenden Zellen. Bei Infektion mit *T. gondii* wurde hingegen keine signifikante Steigerung des Anteils I-A/I-E-exprimierender Makrophagen nach IFN γ -Stimulation festgestellt (Abbildung 2B). In Mock-behandelten Kulturen sank der Anteil auf ca. ein Viertel der nicht infizierten Makrophagen, während er sich in Anwesenheit von MS-275 nur um etwa 10 % verringerte (Abbildung 2B). Zudem war im Vergleich zu den entsprechenden Mock-behandelten Proben der Anteil der I-A/I-E-exprimierenden RAW264.7 in Anwesenheit von MS-275 jeweils signifikant erhöht (Abbildung 2C). In nicht infizierten, unstimulierten Monozyten/ Makrophagen-Kulturen verzehnfachte MS-275 den Anteil der I-A/I-E-exprimierenden RAW264.7. Nach IFN γ -Stimulation ist der Anteil in MS-275-behandelten Kulturen etwa 1,7-fach so hoch wie in Mock-behandelten Makrophagen/ Monozyten (Abbildung 2C).

T. gondii hat auf die Basalexpression sowohl in den Mock- als auch auf die MS-275-behandelten Makrophagen kaum Einfluss, lediglich die durch IFN γ -induzierte Expressionssteigerung ist durch den Parasiten herunterreguliert (Abbildung 2A, B, C).

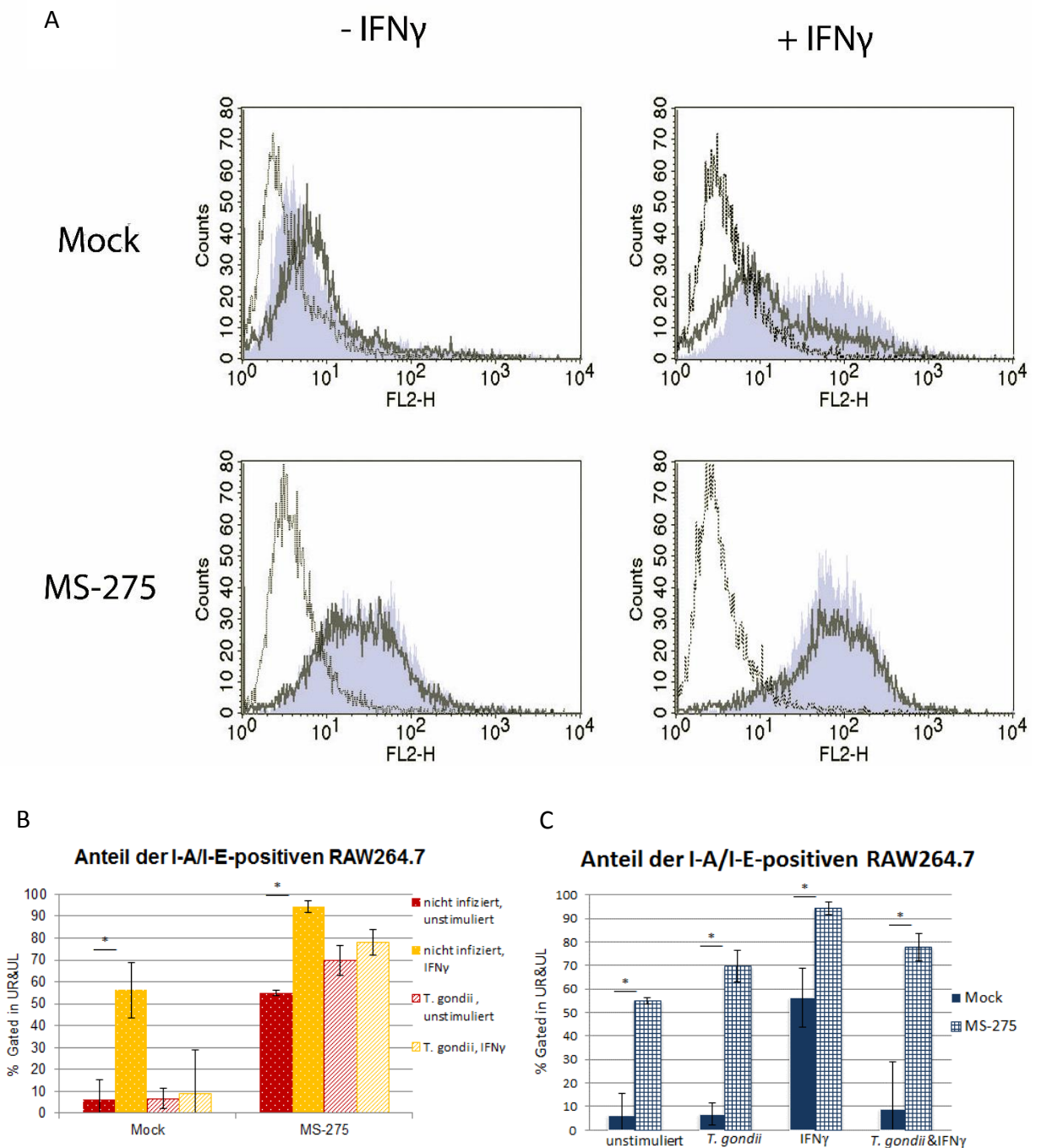


Abbildung 2 Darstellung der I-A/I-E-Expression in RAW264.7 mittels Durchflusszytometrie. Vierundzwanzig Stunden nach Aussaat wurden die RAW264.7 mit dem Typ-II-Stamm PTG-luc/GFP infiziert, 1 h p.i. mit MS-275 oder DMSO als Mock behandelt und gegebenenfalls 3 h und 27 h p.i. mit IFN γ stimuliert. Zweiundvierzig Stunden p.i. wurden die Monozyten/Makrophagen mittels Primär- und Sekundärantikörper gefärbt beziehungsweise als Negativ- oder Isotypenkontrolle angelegt und anschließend mit 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert. **A** Overlays der I-A/I-E-Expression bei nicht infizierten und infizierten RAW264.7. Der hellgrau gefüllte Graph bildet die nicht infizierte RAW264.7-Kultur ab, der dunkelgraue Graph die infizierte Probe und der helle gestrichelte Graph zeigt die Isotypenkontrolle **B** und **C** Gegenüberstellung der I-A/I-E-Expression von Mock- und MS-275-behandelten RAW264.7. Dargestellt sind jeweils die Werte der gefärbten Proben abzüglich der Werte der Isotypenkontrolle. Signifikante Unterschiede sind markiert (* $p < 0,05$).

4.1.2 Untersuchung der Expression des sekundären Antwortgens *ciita* und der primären Antwortgene *irf1* und *irf8*

Die Expression des Interferon- γ -regulierten sekundären Antwortgens *ciita* sowie der primären Antwortgene *irf1* und *irf8* wurden mittels RT-qPCR gemessen. Hierfür wurden die RAW264.7 24 Stunden nach Aussaat mit *T. gondii* infiziert, eine Stunde p.i. mit 2 μ M MS-275 oder Natriumbutyrat behandelt und drei Stunden p.i. mit 100 U/ml IFN γ stimuliert. Vierundzwanzig Stunden p.i. wurde die RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Mithilfe spezifischer Primer wurde die seriell verdünnte cDNA amplifiziert und deren relativer Gehalt durch Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffs SYBRgreen mit doppelsträngiger DNA quantitativ bestimmt. Anschließend wurde der Gehalt von den jeweils korrespondierenden nicht-stimulierten und IFN γ -stimulierten Zellen miteinander verglichen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse einzelner Proben herzustellen, wurden die Werte des Zielgens auf die jeweiligen Werte der mit β -Aktin-Primern amplifizierten Ansätze normiert; hierzu wurde folgende Formel angewendet, wobei E gleich 2 gesetzt wurde:

$$Ratio = \frac{E^{\Delta Zielgen (unstimuliert-stimuliert)}}{E^{\Delta Referenz (unstimuliert-stimuliert)}}$$

Die so errechneten Quotienten von je zwei Verdünnungen einer Probe wurden gemittelt, die Mittelwerte wurden anschließend im Verfahren nach Dixon auf Ausreißer hin überprüft.

4.1.2.1 Expression des CIITA-Gens

In vorherigen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit MS-275 die IFN γ -induzierte Expression von sekundären Antwortgenen in *T. gondii*-infizierten Zellen wiederherstellt (Lang et al. 2012). Diese Ergebnisse konnten in den durchgeführten Versuchen wiederholt werden. Während DMSO-behandelte infizierte RAW264.7 lediglich 12,82 % der CIITA-mRNA von nicht infizierten Makrophagen

enthielten, exprimierten MS-275-behandelte Zellen nach Infektion noch 83,99 % der IFN γ -induzierten CIITA-mRNA (Abbildung 3). Die Steigerung der *ciita*-Expression nach IFN γ -Stimulation fiel in MS-275-behandelten Makrophagen allerdings insgesamt deutlich geringer aus als in den DMSO-Kontrollen (Abbildung 3).

Neben MS-275 wurde auch der Histondeacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat eingesetzt. Der Inhibitor verhinderte eine signifikante Reduktion der IFN γ -induzierten *ciita*-Expressionssteigerung nach Infektion mit *T. gondii* wie sie in DMSO-behandelten Kontrollen auftrat (Abbildung 3). Allerdings verminderte *T. gondii* in Gegenwart von Natriumbutyrat die *ciita*-Expression mit 84,9 % ähnlich stark wie in DMSO-behandelten Kontrollen. Im Gegensatz zu MS-275 hemmte Natriumbutyrat die Steigerung des CIITA-mRNA-Levels nach Stimulation mit IFN γ nicht signifikant (Abbildung 3).

4.1.2.2 Expression des IRF-1-Gens

Die IFN γ -regulierte Expression des primären Antwortgens *irf1* wurde durch den Parasiten in Gegenwart des HDAC-Inhibitors MS-275 stärker gehemmt als in Mock-behandelten Kontrollzellen. So war in Mock-behandelten Monozyten die durch IFN γ induzierte IRF-1-mRNA nach Infektion auf 43,16 % nicht infizierter Zellen reduziert, während in Anwesenheit von MS-275 eine Reduktion durch *T. gondii* auf 30,48 % nicht infizierter Zellen gemessen wurde (Abbildung 3). Damit war zwar in Anwesenheit von MS-275 die Differenz zwischen infizierten und nicht infizierten Makrophagen/ Monozyten höher, insgesamt exprimierten MS-275-behandelte RAW264.7 *irf1* nach IFN γ -Stimulation stärker als die DMSO-Kontrollen. Die Erhöhung des IRF-1-mRNA-Levels war in nicht infizierten Zellen in Gegenwart des HDAC-Inhibitors ungefähr zweieinhalbfach so groß wie in der DMSO-Kontrolle (Abbildung 3).

In Natriumbutyrat-behandelten RAW264.7 bewirkte die *T. gondii*-Infektion eine Verminderung auf 65 % der IFN γ -regulierten Expression von nicht infizierten Makrophagen/ Monozyten. Somit wurde ein positiver Effekt des Inhibitors auf die IFN γ Antwort verglichen mit den Mock-behandelten Makrophagen/ Monozyten festgestellt.

Auch hier war die IFN γ -induzierte Expressionssteigerung von nicht stimulierten zu stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 3).

4.1.2.3 Expression des IRF-8-Gens

Die IFN γ -induzierte Expression von *irf8* in *T. gondii*-infizierten RAW264.7 ähnelt der von *irf1*. In der *T. gondii*-infizierten DMSO-Kontrolle wird die Expression auf 37,91 % der nicht infizierten RAW264.7 signifikant reduziert. In Anwesenheit von MS-275 beträgt die verbleibende Expressionssteigerung nur noch 29,61 % der nicht infizierten Monozyten und ist damit ebenso signifikant vermindert (Abbildung 3).

Für Natriumbutyrat zeigte sich, wie auch bei *irf1*, eine Antagonisierung des inhibitorischen Effekts des Parasiten, nach Behandlung mit dem Inhibitor betrug die IFN γ bedingte Expressionssteigerung noch 77,76 % der nicht infizierten Zellen (Abbildung 3).

Ebenso wie für die *irf1*-Expression ließ sich auch bei der *irf8*-Expression die Beobachtung machen, dass die Menge der IFN γ -induzierten mRNA sowohl bei nicht infizierten als auch bei infizierten RAW264.7 in Anwesenheit von MS-275 erhöht war. In den nicht infizierten Makrophagen ist die mRNA-Menge im Vergleich zu den Mock-behandelten RAW264.7 signifikant höher. Im Verhältnis zur Kontrolle beeinträchtigt der Parasit allerdings die Aufwärtsregulation der *irf8*-Expression mehr als in der DMSO-Kontrolle, sodass zwar die IFN γ -induzierte Steigerung der mRNA-Menge größer ist, der Prozentsatz, der nach Infektion verbleibt, jedoch geringer ist (Abbildung 3).

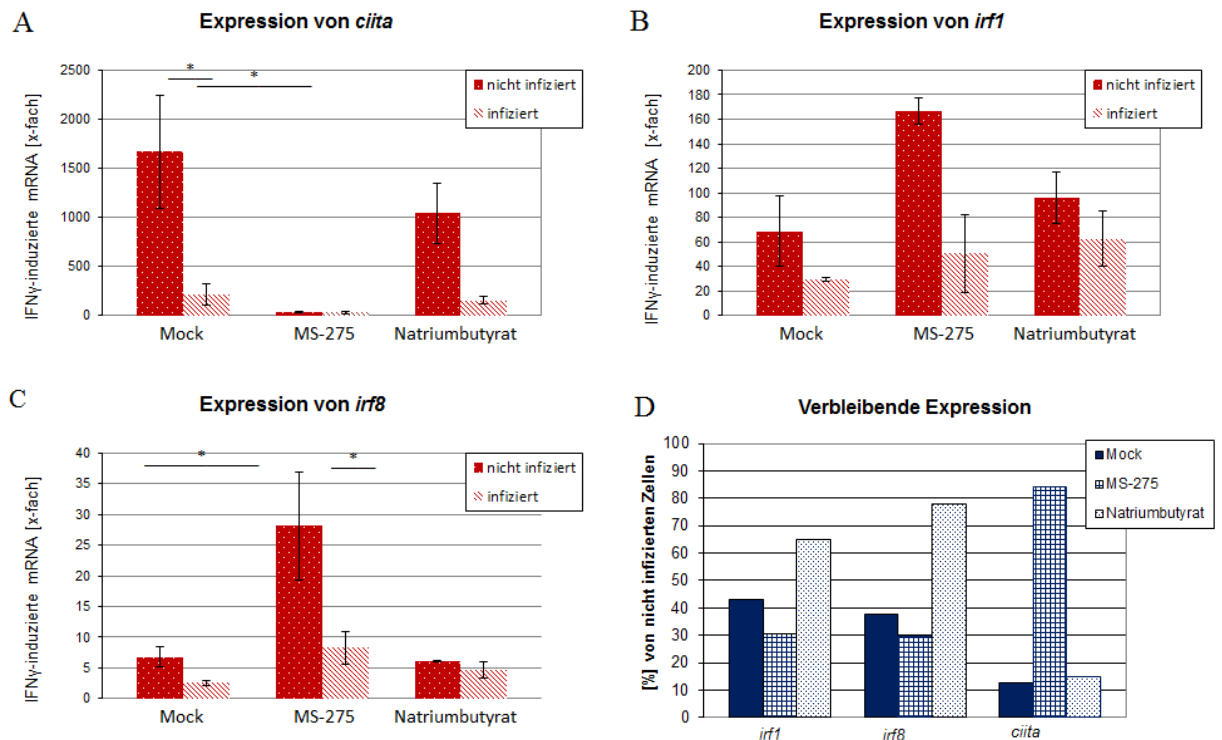


Abbildung 3 Expression des sekundären Antwortgens *ciita* und der primären Antwortgene *irf1* und *irf8*. Die RAW264.7 wurden im Verhältnis 6:1 mit *T. gondii* infiziert, eine Stunde darauf entsprechend mit den HDAC-Inhibitoren MS-275 oder Natriumbutyrat behandelt oder als Kontrolle mit DMSO behandelt und nach weiteren zwei Stunden wurde die Stimulation mit IFN γ vorgenommen. Vierundzwanzig Stunden p.i. wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese mittels quantitativer RealTime PCR auf die Menge an *ciita*, *irf1* und *irf8* cDNA analysiert. Zur Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurden die Ergebnisse auf β -Aktin normalisiert:

$$\text{Ratio} = \frac{E^{\Delta\text{Zielgen}} (\text{unstimuliert} - \text{stimuliert})}{E^{\Delta\text{Referenz}} (\text{unstimuliert} - \text{stimuliert})}$$

A-C Dargestellt ist die mittlere IFN γ -induzierte Hochregulation \pm SEM ($n = 5$) des jeweils benannten Gens in infizierten und nicht infizierten RAW264.7 in DMSO-behandelten Kontrollen und unter Einfluss von MS-275 und Natriumbutyrat. Signifikante Unterschiede sind markiert (* $p < 0,05$). **D** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der *irf1*, *irf8* und *ciita* cDNA in *T. gondii*-infizierten Zellen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren oder nach Mock-Behandlung vergleichend zu den jeweiligen nicht infizierten Zellen, deren cDNA-Mengen 100 % gesetzt wurden.

4.1.3 Globaler Einfluss von MS-275 auf das IFN γ -regulierte Transkriptom von nicht infizierten und *T. gondii*-infizierten RAW264.7

Mithilfe der genomweiten Transkriptomanalyse wurde untersucht, ob MS-275 zu einer generell verbesserten IFN γ -Antwort in *T. gondii*-infizierten RAW264.7 führt. Hierbei war von besonderem Interesse, ob sich allgemeine Aussagen über die Beeinflussung von primären und sekundären Antwortgenen nach IFN γ -Stimulation durch den Parasiten in An- und Abwesenheit von MS-275 treffen lassen. Die genomweite Transkriptomanalyse sollte damit die Analysen mittels RT-qPCR ergänzen und erweitern. Die Versuchsansätze entsprachen im Wesentlichen denen der RT-qPCR. Dabei wurden je zwei biologische Replikate der einzelnen Versuchsansätze gepoolt und je zwei RNA-Pools pro Probe mittels High-Throughput-mRNA-Sequenzierung analysiert. Um die Anzahl der notwendigen Sequenzierungen zu begrenzen, wurden bis auf den unbehandelten Kontrollansatz allerdings nur IFN γ -stimulierte Proben (jeweils infiziert und nicht infiziert bzw. MS-275 oder Mock-behandelt) analysiert. Dadurch konnte, anders als bei der RT-qPCR, die IFN γ -regulierte Genexpression nach Infektion oder MS-275-Behandlung nicht aufgrund eines Quotienten von IFN γ -stimulierten zu unstimulierten RAW264.7 berechnet werden. In Abbildung 4A ist eine „Heatmap“ der 50 am stärksten durch IFN γ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle regulierten Gene in den fünf unterschiedlichen Proben dargestellt. In Anwesenheit von MS-275 waren eine Reihe von IFN γ -regulierten Genen verstärkt hochreguliert, während einige weniger stark hochreguliert oder sogar herunterreguliert wurden als in Zellen ohne MS-275-Behandlung (Abbildung 4A). In *T. gondii*-infizierten RAW264.7 zeigte sich eine deutliche Inhibierung der Genexpression im Vergleich zu den nicht infizierten leukämoiden Makrophagen. In MS-275-behandelten RAW264.7 war der inhibierende Effekt des Parasiten auf die 50 am stärksten durch IFN γ regulierten Gene sogar deutlich stärker als in Mock-behandelten RAW264.7 (Abbildung 4A). Dies zeigte, dass der HDAC-Inhibitor MS-275 den inhibitorischen Effekt von *T. gondii* auf die IFN γ -Antwort von Monozyten/ Makrophagen nicht generell vermindert oder sogar aufhebt.

B

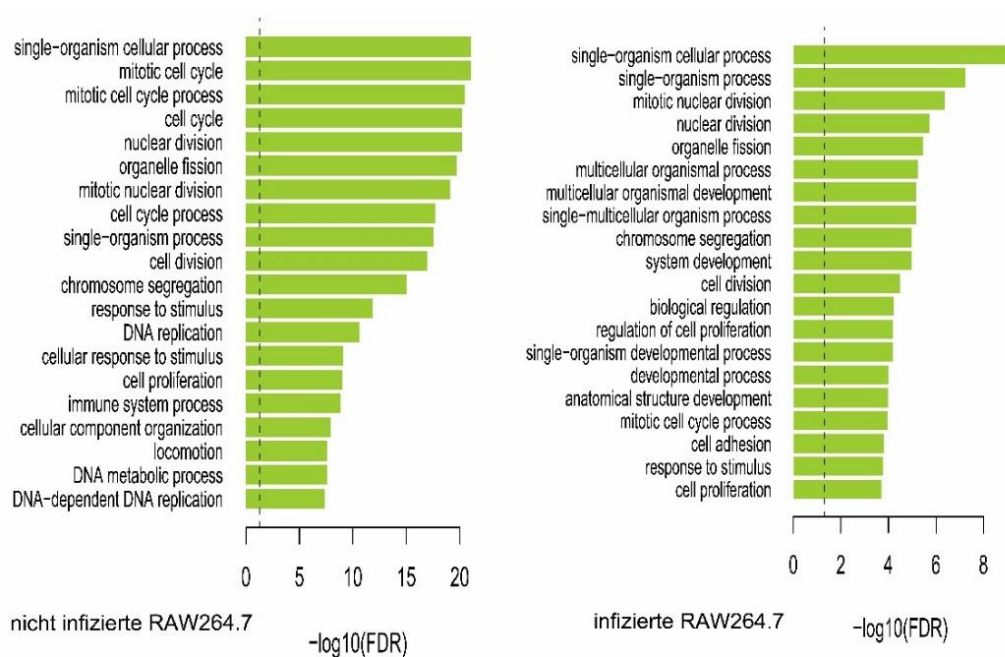


Abbildung 5 A Vergleich der 50 am stärksten durch MS-275 regulierten Gene in IFN γ -stimulierten nicht infizierten und T. gondii-infizierten RAW264.7, jeweils verglichen zur Mock-behandelten, IFN γ -stimulierten Kontrolle. Von jedem Ansatz wurden zwei RNA-Pools von jeweils zwei biologischen Replikaten sequenziert. Blau = reprimiert, gelb = induziert. **B** Biologische Prozesse, die in IFN γ -stimulierten nicht infizierten und infizierten RAW264.7 durch MS-275 im Vergleich zu den jeweiligen Mock-behandelten, IFN γ -stimulierten Zellen überdurchschnittlich stark beeinflusst wurden. Die biologischen Prozesse wurden durch „Gene-Ontology“-Analysen identifiziert; gezeigt sind jeweils die 20 Prozesse die aufgrund der kleinsten ‚false-discovery-Raten‘ (dargestellt als $-\log_{10}(\text{FDR})$ durch MS-275 besonders stark reguliert wurden.

Biological process (GO-term)	Biologischer Prozess (Übersetzung)	Nicht infiziert	infiziert
Anatomical structure development	Entwicklung anatomischer Struktur	-	+
Biological replication	Biologische Replikation	-	+
Cell adhesion	Zelladhäsion	-	+
Cell cycle	Zellzyklus	+	-
Cell cycle process	Zellzyklusprozess	+	-
Cell division	Zellteilung	+	+
Cell proliferation	Zellproliferation	+	+
Cellular component organization	Zelluläre Kompartimentorganisierung	+	-
Cellular response to stimulus	Zelluläre Antwort auf einen Stimulus	+	-

<i>Biological process (GO-term)</i>	<i>Biologischer Prozess (Übersetzung)</i>	<i>Nicht infiziert</i>	<i>infiziert</i>
Chromosome segregation	Chromosomentrennung	+	+
Developmental process	Entwicklungsprozess	-	+
DNA metabolic process	DNA-Metabolismus	+	-
DNA replication	DNA-Replikation	+	-
DNA-dependent DNA replication	DNA-abhängige DNA-Replikation	+	-
Immune system process	Immunsystem-Prozess	+	-
Locomotion	Lokomotion	+	-
Mitotic cell cycle	Mitotischer Zellzyklus	+	-
Mitotic cell cycle process	Mitotischer Zellzyklus-Prozess	+	+
Mitotic nuclear division	Mitotische Kernteilung	+	+
Multicellular organismal development	Multizelluläre Organismus-Entwicklung	-	-
Multicellular organismal process	Multizellulärer Prozess auf Organismus-Ebene	-	-
Nuclear division	Kernteilung	+	+
Organelle fission	Organellenteilung	+	+
Regulation of cell proliferation	Regulation der Zellproliferation	-	+
Response to stimulus	Stimulus-Antwort	+	+
Single-multicellular organism process	Multizellulärer Prozess auf Organismus-Ebene	-	+
Single-organism cellular process	Zellulärer Prozess eines einzelnen Organismus (ohne Involvierung eines anderen Organismus)	+	+
Single-organism developmental process	Entwicklungsprozess	-	+
Single-organism process	Einzel-Organismus-Prozess	+	+
System development	Systementwicklung	-	+

Tabelle 1 Übersicht über die durch MS-275 besonders deutlich regulierten biologischen Prozesse in IFN γ -stimulierten, nicht infizierten und *T. gondii*-infizierten RAW264.7.7

4.1.4 Expression primärer Antwortgene

Neben dem generellen Einfluss von MS-275 auf das Transkriptom in *Toxoplasma*-infizierten Zellen war der Einfluss auf durch IFN γ regulierte primäre und sekundäre Antwortgene für diese Arbeit von besonderem Interesse. Zur Auswertung wurden zunächst die Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) herangezogen, da sie eindeutig als primäre Antwortgene charakterisiert sind (Boehm et al. 1997). Des Weiteren wurde die Expression der Immunitäts-bezogenen GTPasen (IRGs oder p47-GTPasen) untersucht, die direkt durch STAT-1 induziert werden und nicht von IRF-1 abhängig sind (Boehm et al. 1998).

Gen	Mock	IFN γ	<i>T. gondii</i> + IFN γ	MS-275 + IFN γ	<i>T. gondii</i> + MS-275 + IFN γ
<i>irf1</i>	514	32131	10545	34750	11373
<i>irf2</i>	1735	4726	2713	4734	2313
<i>irf3</i>	935	1037	570	952	784
<i>irf4</i>	51	25	60	157	244
<i>irf5</i>	3421	7082	4735	6953	3766
<i>irf6</i>	1,4	0,5	0,4	7,4	13
<i>irf7</i>	111	10745	21536	6334	9853
<i>irf8</i>	2885	24063	7860	47681	13449
<i>irf9</i>	479	1835	1843	1667	1219
<i>irga6/ligp1</i>	28	61344	1128	76441	13009
<i>Irgb6/Tgtp1</i>	2,5	2527	417	9532	1368

Gen	Mock	IFN γ	T. gondii + IFN γ	MS-275 + IFN γ	T. gondii + MS-275 + IFN γ
<i>Irgb10/Gm12250</i>	3,2	4883	1028	6153	1035
<i>Irgd/ifi47</i>	194	10110	3880	11513	2555
<i>irgm1</i>	494	24294	7242	23653	4512
<i>irgm2</i>	89	9030	2905	18516	3267
<i>irgm3/igtp</i>	76	18368	5728 8	52212	9201

Tabelle 2 Expression primärer IFN γ -Antwortgene unter Einfluss von MS-275 in IFN γ -stimulierten Toxoplasma-infizierten und nicht infizierten RAW264.7 im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle. Die Expressionsdaten wurden durch High-Throughput-RNA-Sequenzierung gewonnen, angegeben sind die Mittelwerte (n=2) der normalisierten Anzahl reads pro Millionen reads.

4.1.4.1 IRF-codierende Gene

Neun IRF sind derzeit in Maus und Mensch bekannt, andere Wirbeltiere exprimieren außerdem IRF-10 und IRF-11 (Huang et al. 2010).

IRF-1 ist an der Aktivierung eines breiten Spektrums der sekundären IFN γ -Antwortgene beteiligt. Beispielsweise wird die IFN γ -induzierte Expression der iNOS, der Guanylat-bindende-Proteine (Gbps, p65-GTPasen) und der 2'-5'- Oligoadenylat-Synthetase (2'-5'-OAS) über IRF-1 vermittelt. Zudem ist die IL-12-Produktion in Makrophagen von IRF-1 abhängig (Paun und Pitha 2007). IRF-2 hat eine hohe Sequenzanalogie zu IRF-1 und wirkt durch die Bindung an dieselben Erkennungssequenzen antagonistisch zu IRF-1 (Paun und Pitha 2007). IRF-3 wird konstitutiv exprimiert und wird durch Typ-I-Interferone in einer positiven Rückkopplungsschleife potenziert (Kuwata et al. 2002). Gemeinsam mit IRF-7, das nur in Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird, spielt es eine zentrale Rolle bei der Virusabwehr. *Irf4* wird ausschließlich in lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert und ist für die Differenzierung hämatopoetischer Zellen von Bedeutung (Gauzzi et al. 2005; Cai et al. 2013). IRF-8 weist strukturell eine hohe Übereinstimmung mit IRF-4 auf und ist auch an Differenzierungsprozessen der

hämatopoetischen Zellen beteiligt. In Kombination mit IRF-1 induziert IRF-8 wichtige Gene für die Makrophagen-differenzierung und die Makrophagen-gesteuerte Entzündung (Paun und Pitha 2007). IRF-5 nimmt eine zentrale Stellung in der Signalweiterleitung von TLR4 ein und reguliert dadurch die Expression von Typ-I-Interferonen und anderen proinflammatorischen Zytokinen. Als Heterodimer mit IRF-3 wirkt es transkriptionsfördernd, in Kombination mit IRF-7 inhibiert es die Expression der Typ-I-Interferone (Yu et al. 2014). IRF-6 spielt eine zentrale Rolle bei der Keratozytendifferenzierung, ein Knock-Out verläuft bereits embryonal letal (Paun und Pitha 2007). IRF-9 ist ebenfalls an der Virusabwehr beteiligt und spielt eine zentrale Rolle für die Typ-I-Interferon-vermittelte Immunantwort (Paun und Pitha 2007).

IFN γ bewirkte in RAW264.7 eine deutliche Expressionssteigerung von *irf1*, *irf2*, *irf5*, *irf7*, *irf8* und *irf9*. *Irf3* wurde nur geringfügig durch IFN γ induziert, während *irf4* und *irf6* nach IFN γ -Stimulation im Vergleich zur Kontrolle reprimiert wurden. *Irf1*, *irf2*, *irf3*, *irf5*, und *irf8* wurden in *T. gondii*-infizierten Monozyten/ Makrophagen nach IFN γ -Stimulation im Vergleich zu nicht infizierten Zellen vermindert exprimiert, die *irf6* und *irf9*-Expression wurde durch den Parasiten nicht beeinflusst, und *irf4* und *irf7* wurden nach Infektion jeweils etwa doppelt so stark exprimiert wie in nicht infizierten, IFN γ -stimulierten Zellen. Nach Behandlung mit MS-275 war der hemmende Einfluss von *T. gondii* auf die IFN γ -induzierte Expression von *irf1*, *irf2*, *irf5* und *irf8* nicht wesentlich beeinflusst (Tabelle 2, Abbildung 6). Die Hemmung der *irf3*-Expression durch *T. gondii* wurde in Gegenwart von MS-275 dagegen deutlich vermindert und auch *irf6* wurde durch MS-275 in infizierten Zellen hochreguliert. Die IFN γ -regulierte Expression von *irf4*, *irf7* und *irf9* in Gegenwart von *T. gondii* wird durch den HDAC-Inhibitor abgeschwächt (Tabelle 2, Abbildung 6). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass MS-275 die *Toxoplasma*-vermittelte Hemmung der IFN γ -induzierten Expression von IRF-codierenden Genen nur im Falle von *irf3* vermindert.

4.1.4.2 IRG-codierende Gene

Immunitäts-bezogene GTPasen (IRG) akkumulieren an der parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii* und rupturieren sie, wodurch die enthaltenen Parasiten absterben und die Wirtszelle nachfolgend ebenfalls nekrotisch wird (Zhao et al. 2009). Allerdings können *Toxoplasma*-Typ-I-Stämme verschiedene IRG phosphorylieren, wodurch ihre Akkumulation an der Membran der PV verhindert wird, was zur erheblich höheren Virulenz der Typ-I-Stämme verglichen mit Typ-II- und -III-Stämmen beiträgt (Steinfeldt et al. 2010; Hunter und Sibley 2012). Für die hier in die Auswertung einbezogenen IRG wurde in früheren Arbeiten eine wichtige Rolle bei der *T. gondii*-Abwehr gezeigt (Zhao et al. 2009; Hunn et al. 2011). IRGM1 kommt dabei eine Sonderrolle zu, da es sich nicht an die PV anlagert, sondern an der Regulation der Makrophagenmotilität beteiligt ist (Henry et al. 2010; Khaminets et al. 2010). Die Expression aller IRG wurde durch IFN γ deutlich hochreguliert, während *T. gondii* die IFN γ -induzierte Transkription der IRG-codierenden Gene stark reprimierte (Tabelle 2, Abbildung 6). In infizierten RAW264.7 betrug die verbleibende mRNA-Menge zwischen 16,5 % und 38,4 % der nicht infizierten, ebenfalls stimulierten leukämoiden Makrophagen. In nicht infizierten Zellen war in Anwesenheit von MS-275 die Expression der IRG-codierenden Gene entweder nahezu unverändert oder im Vergleich zu Mock-behandelten IFN γ -stimulierten RAW264.7 erhöht; die maximale Steigerung betrug das 3,8-Fache der mRNA von Mock-behandelten, stimulierten Zellen. Im Vergleich zu Mock-behandelten, stimulierten Monozyten/ Makrophagen wurden in MS-275-behandelten, stimulierten RAW264.7 die Expression der IRG-codierenden Gene durch den Parasiten mindestens ebenso so stark, teilweise sogar noch deutlich stärker gehemmt. Da die IFN γ -induzierte Expression der IRG jedoch zum Teil durch MS-275 hochreguliert wurde (siehe oben), waren einige der Gene nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor in infizierten RAW264.7 stärker exprimiert als in Mock-behandelten infizierten Zellen (Tabelle 2).

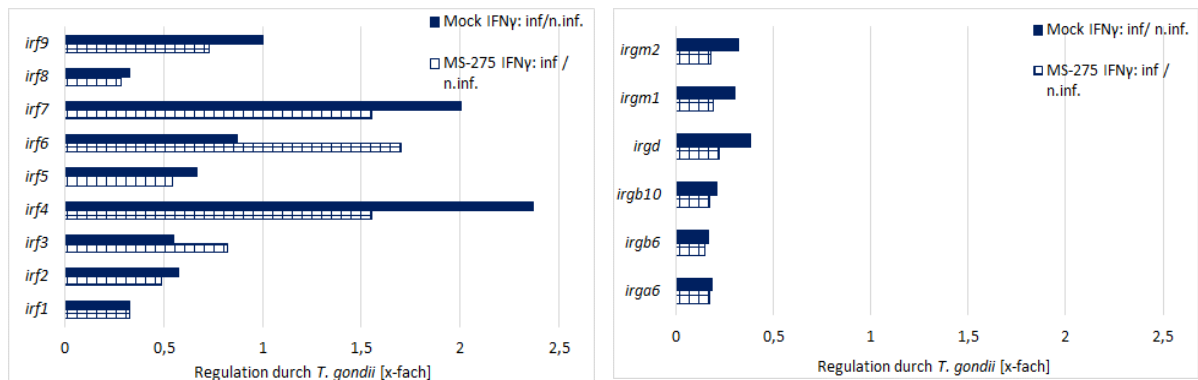


Abbildung 6 Toxoplasma-vermittelte Regulation primärer IFN γ -Antwortgene in Mock- und MS-275-behandelten RAW264.7. RAW264.7 wurden 24 Stunden nach Aussaat mit *T. gondii* infiziert, eine Stunde p.i. mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 oder als Kontrolle mit DMSO Mock-behandelt und drei Stunden p.i. mit IFN γ stimuliert. Vierundzwanzig Stunden p.i. wurde die RNA isoliert und mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptomanalyse wurde durch High-Throughput Sequenzierung durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Verhältnis der Expression von IRF-Genen (links) und IRG-Genen (rechts) von Toxoplasma-infizierten zu nicht infizierten IFN γ -stimulierten RAW264.7-Zellen in Anwesenheit (gestrichelte Balken) oder Abwesenheit (blaue Balken) von MS-275. Die Quotienten wurden aus den Werten der Tabelle 2 berechnet.

4.1.5 Einfluss von MS-275 auf die Expression IFN γ -regulierter sekundärer Antwortgene in *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten RAW264.7

Gen	Mock	IFN γ	<i>T. gondii</i> + IFN γ	MS-275 + IFN γ	<i>T. gondii</i> + MS-275 + IFN γ
<i>ciita</i>	2,3	1233	141	3842	496
<i>gbp11</i>	0	186	46	522	149
<i>gbp2</i>	56	68685	23690	129049	34338
<i>gbp3</i>	6,7	6411	3411	8198	2990
<i>gbp4</i>	40	45321	9112	114490	18732

Gen	Mock	IFN γ	T. gondii + IFN γ	MS-275 + IFN γ	T. gondii + MS-275 + IFN γ
<i>gbp6</i>	1,59	1573	465	3744	548
<i>gbp7</i>	14	13807	5337	24381	5138
<i>gbp8</i>	3,2	3155	1313	3679	1227
<i>gbp9</i>	2,7	2966	1223	5693	1548
<i>h2aa</i>	8,9	2270	470	28393	6614
<i>h2ab1</i>	20	1851	420	12715	3282
<i>h2bl</i>	82	302	221	310	229
<i>h2d1</i>	16631	63258	43124	78035	49114
<i>h2dma</i>	361	3128	1062	6488	2314
<i>h2dmb1</i>	2,1	596	92	2535	566
<i>h2dmb2</i>	16	392	62	1793	432
<i>h2eb1</i>	8,4	2219	487	21663	5377
<i>h2k1</i>	9733	34771	25476	39274	27438
<i>h2k2</i>	679	2381	1810	2716	1903
<i>h2m3</i>	449	1147	1298	796	941
<i>h2oa</i>	23	60	42	408	215
<i>h2ob</i>	86	219	211	1462	990

Gen	Mock	IFN γ	T. gondii + IFN γ	MS-275 + IFN γ	T. gondii + MS-275 + IFN γ
<i>h2q1</i>	182	651	530	728	544
<i>h2q10</i>	1276	4057	2872	4959	3239
<i>h2q2</i>	834	2843	1992	3373	2147
<i>h2q3</i>	4	14	14	17	9,28
<i>h2q4</i>	1399	5663	3601	4916	3230
<i>h2q5</i>	599	2135	1843	2695	2138
<i>h2q6</i>	1907	6426	5233	7490	5735
<i>h2q7</i>	57	231 9	225	299	308
<i>h2t10</i>	90	409	378	986	607
<i>h2t22</i>	342	1986	1675	3620	2280
<i>h2t23</i>	894	16705	8564	11520	5650
<i>h2t24</i>	105	4444	6651	1827	1928
<i>h2t3</i>	0,3	2,59	3,3	86	34
<i>nos2</i>	82	7215	8490	4827	6071

Table 3 Expression sekundärer IFN γ -Antwortgene unter Einfluss von MS-275 in IFN γ -stimulierten Toxoplasma-infizierten und nicht infizierten RAW264.7. Mittels High-Throughput-RNA-Sequenzierung wurden die zugrunde liegenden Expressionsdaten ermittelt, hier dargestellt sind die Mittelwerte ($n=2$) der normalisierten Anzahl reads pro Millionen reads. Dabei wurden solche sekundären Antwortgene ausgewählt, für die entweder eine Expressionshemmung durch T. gondii bekannt ist oder deren Genprodukte an der Parasitenabwehr beteiligt sind.

4.1.5.1 *Ciita*

CIITA fungiert als essentieller Coaktivator der MHC-II-Transkription (Muhlethaler-Mottet und Berardino 1998). Die Expression von *ciita* wurde in nicht infizierten RAW264.7 durch IFN γ mehr als 500-fach gesteigert (Tabelle 3). In Anwesenheit von MS-275 und IFN γ war die Transkriptmenge sogar über 1500-fach höher als in Zellen der unstimulierten DMSO-Kontrolle. In *T. gondii*-infizierten RAW264.7-Zellen war die Expression in beiden Fällen stark gesenkt. In DMSO-behandelten Monozyten/ Makrophagen wurde durch IFN γ nur etwa 11 % der CIITA-mRNA von nicht infizierten Zellen exprimiert, in MS-275-behandelten Zellen mit knapp 13 % nur geringfügig mehr (Tabelle 3, Abbildung 7). Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangswerte enthielten MS-275-behandelte infizierte RAW264.7 absolut jedoch etwa die vierfache Menge an CIITA-mRNA des DMSO-behandelten Äquivalents (Tabelle 3). Dies zeigte, dass die Behandlung mit MS-275 zwar die IFN γ -regulierte Transkription von *ciita* auch in Gegenwart von *T. gondii* deutlich steigerte, dass die relative Parasiten-induzierte Hemmung der Expression aber nicht vermindert war.

4.1.5.2 *MHC-II-codierende Gene*

In RAW264.7 werden diverse Gene exprimiert, die für Teile des MHC-II-Komplexes bzw. dessen Regulation codieren. Proteine des MHC-II-Komplexes präsentieren phagozytierte Antigene, wodurch der MHC II-Komplex damit von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der erworbenen zellulären und humoralen Immunantwort ist. Alle untersuchten MHC-II-Gene wurden in RAW264.7 durch IFN γ -Stimulation hochreguliert (Tabelle 3). Das Ausmaß der Regulation schwankte zwischen einer etwa 290-fachen Steigerung der mRNA für H2-DMb1 und einer etwa zweieinhalbfachen Steigerung der mRNA für H2-M3. Die Expression der meisten Gene wurde durch *T. gondii*-Infektion herunterreguliert, sie betrug zwischen 15,8 % und 97,2 % der Expressionsstärke in nicht infizierten Zellen nach IFN γ -Stimulation (Tabelle 3, Abbildung 7). Einige Gene (*h2t3*, *h2t24*, *h2m3*) wurden in *Toxoplasma*-infizierten RAW264.7 nach IFN γ -Stimulation allerdings auch stärker exprimiert als in nicht infizierten Zellen, die maximale Steigerung betrug 149,66 % der mRNA-Menge der nicht infizierten, IFN γ -stimulierten RAW264.7. MS-275 förderte in nicht infizierten Zellen die IFN γ -induzierte

Expression von etwa der Hälfte der MHC-II-codierenden Gene zum Teil sehr deutlich, der stärkste synergistische Effekt wurde auf die Expression des H2-T3-Gens mit einer fast 35-fachen Steigerung ausgeübt. Die IFN γ -induzierte Expression der anderen Gene wurde entweder nur geringfügig durch MS-275 gesteigert (1,13-fach bis 1,82-fach) oder wurde durch den HDAC-Inhibitor sogar herunterreguliert (Tabelle 3). Auf die *T. gondii*-beeinflusste IFN γ -abhängige Expression der meisten H2-Gene hatte MS-275 keinen nennenswerten Effekt. Die Expression des H2-DMb1- und H2-Dmb2-Gens wurde jeweils etwa anderthalbfach gesteigert, während die *h2t3*-Expression in *T. gondii*-infizierten RAW264.7 um etwa 60 % durch die Anwesenheit von MS-275 reduziert wurde. Fünf weitere Gene wurden zwischen 0,67 und 0,75-fach herunterreguliert (Abbildung 7). Insgesamt steigerte MS-275 die IFN γ -induzierte Expression der meisten H2-Gene in nicht infizierten Monozyten/ Makrophagen, während es sich in den *T. gondii*-infizierten Zellen MS-275 überwiegend negativ auf die IFN γ -induzierte Expression auswirkte. Die absolute Expression der meisten Gene war aber auch hier durch die MS-275-Behandlung verglichen mit den Mock-behandelten RAW264.7 deutlich gesteigert.

4.1.5.3 Guanylat-bindende-Proteine

Die Gruppe der Guanylat-bindende-Proteine (GBPs oder p65 GTPasen) sind an der Abwehr der *Toxoplasma*-Infektion beteiligt. Versuche mit „Knock-Out“-Mutanten haben gezeigt, dass eine Defizienz im murinen GBP-2-Gen ausreicht, um die Abwehrfähigkeit gegenüber *T. gondii* deutlich einzuschränken (Degrandi et al. 2013).

Alle GBPs wurden in nicht infizierten RAW264.7 durch IFN γ stark hochreguliert (Tabelle 3). In infizierten Monozyten/Makropagen war die IFN γ -induzierte Expression von GBPs im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen um 47 % - 75 % vermindert (Tabelle 3, Abbildung 7). In nicht infizierten RAW264.7 wurden alle GBP-Gene in Anwesenheit von MS-275 stärker exprimiert als in den Mock-behandelten RAW264.7, der maximale synergistische Effekt von MS-275 betrug das 2,8-Fache von Mock-behandelten, IFN γ -stimulierten Zellen (*gbp11*). In infizierten Zellen blieb die IFN γ -induzierte Expression auch in Gegenwart von MS-275 deutlich reprimiert; meist war die Parasiten-induzierte Hemmung der IFN γ -vermittelten Expression nach Behandlung mit MS-275 sogar

stärker als in Mock-behandelten Zellen (Tabelle 3, Abbildung 7). Die absoluten mRNA-Mengen von GBP-2, -4, -6, -9 und -11 waren aber dennoch in infizierten Zellen, die mit MS-275 behandelt worden waren, größer als in Mock-behandelten, infizierten Zellen. Die Transkriptmengen von GBP-3,-7 und -8 waren dagegen nach Behandlung von infizierten RAW264.7 mit MS-275 im Vergleich zu Mock-behandelten Zellen gleich oder sogar weiter erniedrigt (Tabelle 3).

4.1.5.4 *Nos2*

Die NO-Synthase 2 oder induzierbare NO-Synthase (iNOS) generiert das zytotoxische Stickstoffmonoxid (NO) und leistet damit einen Beitrag zur Abtötung phagozytierter Pathogene (Kota et al. 2006). Die iNOS ist durch IFN γ induzierbar, die Stimulation bewirkte in nicht infizierten RAW264.7 eine Expressionssteigerung auf etwa das 88-Fache (Tabelle 3). Interessanterweise hatte *T. gondii* weder in Mock-behandelten, noch in MS-275-behandelten Makrophagen einen repressiven Effekt auf die *nos2*-Expression (Tabelle 3, Abbildung 7). MS-275 hemmte die IFN γ -induzierte iNOS-Expression, in Anwesenheit von MS-275 sank die mRNA-Menge in nicht infizierten Zellen auf knapp 67 % der Mock-behandelten RAW264.7, in *Toxoplasma*-infizierten Zellen auf etwa 70 % (Tabelle 3).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse deutlich, dass MS-275 zwar die Transkriptmengen von vielen primär und sekundär durch IFN γ regulierten Genen erhöht, dass MS-275 die durch *Toxoplasma* vermittelte relative Hemmung der IFN γ -regulierten primären und sekundären Antwortgene aber nicht deutlich verändert.

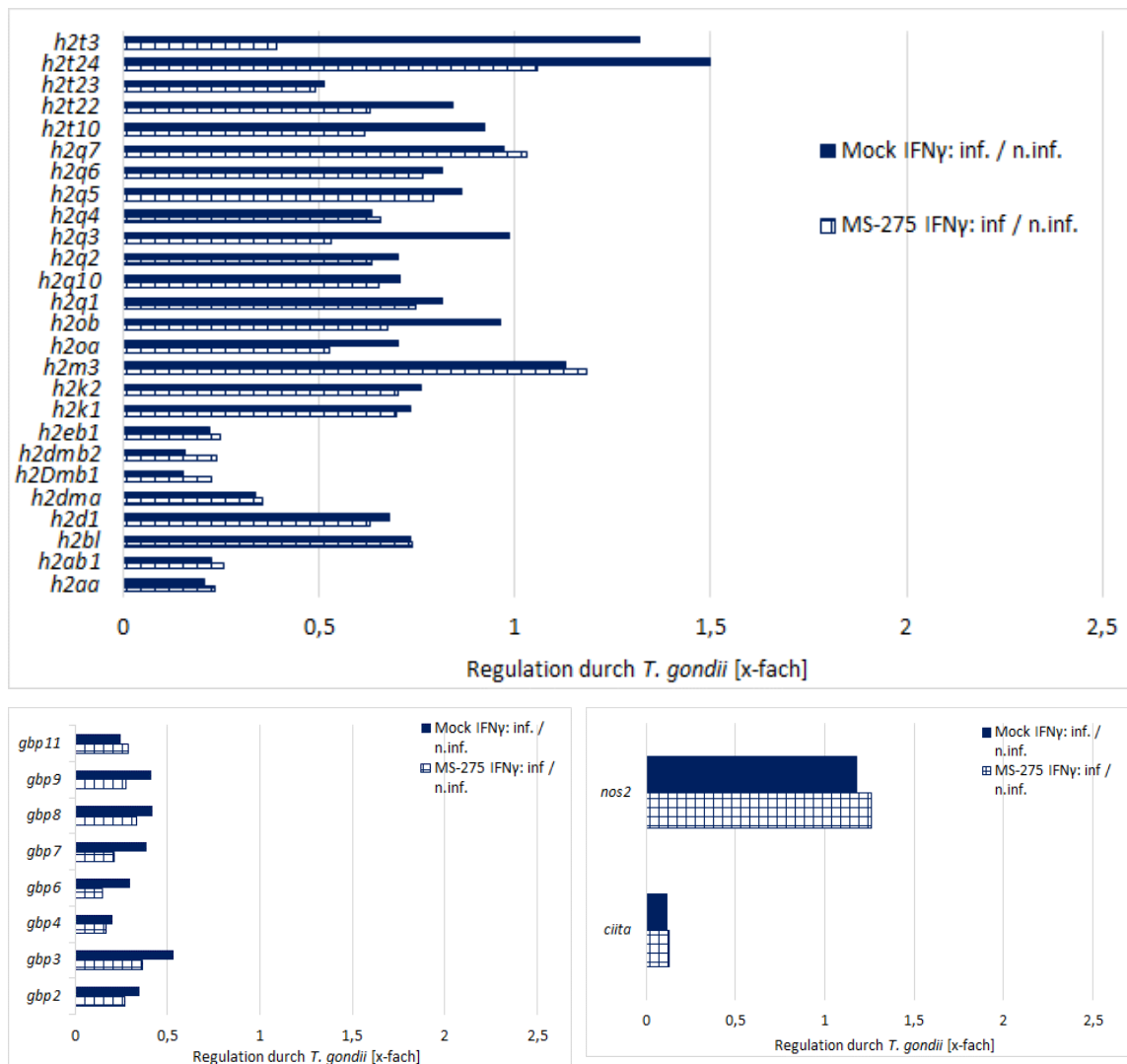


Abbildung 7 Toxoplasma-vermittelte Regulation sekundärer IFN γ -Antwortgene in Mock- und MS-275-behandelten RAW264.7. Vierundzwanzig Stunden nach ihrer Aussaat wurden RAW264.7 mit *T. gondii* infiziert, eine Stunde darauf wurden sie mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 oder als Kontrolle mit DMSO Mock-behandelt und drei Stunden p.i mit IFN γ stimuliert. Die RNA wurde 24 Stunden p.i. isoliert und mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptomanalyse wurde mithilfe einer High-Throughput Sequenzierung durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Verhältnis der Expression von Toxoplasma-infizierten zu nicht infizierten IFN γ -stimulierten RAW264.7-Zellen in Anwesenheit (gestrichelte Balken) oder Abwesenheit (blaue Balken) von MS-275 für MHCII-codierende Gene (oben), GBP-Gene (unten links) und *nos2* und *ciita* (unten rechts). Die Quotienten wurden aus den Werten der Tabelle 3 berechnet.

4.1.6 Einfluss von MS-275 auf die Expression immunsuppressiver Gene in *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten RAW264.7

Da HDAC-Inhibitoren in vivo und in vitro eine immunsuppressive Wirkung hervorrufen können (siehe 1.3.2), wurde hier auch untersucht, inwiefern die Expression ausgewählter immunsuppressiver Gene in *T. gondii*-infizierten und/ oder mit IFN γ -stimulierten Monozyten/ Makrophagen durch MS-275 beeinflusst wird.

Gen	-	IFN γ	<i>T. gondii</i> + IFN γ	MS-275 + IFN γ	<i>T. gondii</i> + MS-275 + IFN γ
<i>cish</i>	13	1,7	1,6	2,8	2,7
<i>il10</i>	0	2,5	4,6	16	21
<i>il10ra</i>	2233	5884	2760	5057	1909
<i>il10rb</i>	1617	1346	1208	844	970
<i>il4</i>	15	2,9	10	16	14
<i>il4ra</i>	289	2822	1160	4455	1738
<i>socs1</i>	8,8	4624	1068	5835	1854
<i>socs2</i>	0,4	1,56	32	32	160
<i>socs3</i>	648	6220	2324	5611	2984
<i>tgfb1</i>	5589	6135	6851	5439	8030
<i>tgfb3</i>	24	267	191	315	203

Tabelle 4 Expression immunsuppressiver Gene unter Einfluss von MS-275 in IFN γ -stimulierten Toxoplasma-infizierten und nicht infizierten RAW264.7. Angegeben sind die Mittelwerte ($n=2$) der normalisierten Anzahl reads pro Millionen reads. Diese wurden in einer High-Throughput-RNA-Sequenzierung ermittelt. Die Auswahl der Gene erfolgte danach, ob sie bereits in Zusammenhang mit einer *T. gondii*-Infektion beschrieben wurden.

4.1.6.1 Interleukin-10 und seine Rezeptoren

IL-10 wirkt immunregulatorisch und verhindert im Fall einer *Toxoplasma*-Infektion eine überschießende Entzündungsreaktion mit Entwicklung einer Immunopathologie des Wirts. In *Toxoplasma*-infizierten Makrophagen wird IL-10 induziert (Lang et al. 2006).

Dies bestätigte sich in der vorliegenden Transkriptomanalyse mit leukämoiden Makrophagen. In Mock-behandelten Kontrollen wurde keine IL-10 mRNA nachgewiesen (Tabelle 4). IFN γ induzierte geringe Mengen IL-10-spezifischer Transkripte, deren Menge sich in infizierten RAW264.7 etwa verdoppelte. MS-275 steigerte die IL-10-Expression nicht infizierter und *Toxoplasma*-infizierter RAW264.7 um das 4,5- bis 6,5-Fache deutlich (Tabelle 4, Abbildung 8).

Transkripte der IL-10-Rezeptorgene *il10ra* und *il10rb* waren in Mock-behandelten, unstimulierten RAW264.7 deutlich nachweisbar (Tabelle 4). Durch IFN γ wurde die Expression von *il10ra* in nicht infizierten, Mock-behandelten Zellen mehr als 2,5-fach hochreguliert, während *il10rb* vermindert exprimiert wurde. Im Gegensatz zu *il10* wurde besonders das IL-10-Rezeptorgen *il10ra*, in geringerem Maße auch das Gen *il10rb* durch Infektion mit *T. gondii* in Mock-behandelten, IFN γ -stimulierten RAW264.7 herunterreguliert (Tabelle 4). Verglichen mit Mock-behandelten leukämoiden Makrophagen verringerte MS-275 die mRNA-Menge beider Rezeptoruntereinheiten sowohl in nicht infizierten als auch *Toxoplasma*-infizierten RAW264.7 (Tabelle 4, Abbildung 8). Die Hemmung der *il10ra*-Expression durch *T. gondii* war nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor stärker als in Mock-behandelten Kontrollen (Tabelle 4).

4.1.6.2 Interleukin-4 und sein Rezeptor

IL-4 führt in Makrophagen zur Ausbildung eines antiinflammatorischen und mit der Wundheilung assoziierten M2-Phänotyps (Novak und Koh 2013). Außerdem fördert es die humorale Immunabwehr, indem es die Differenzierung von Th0-Helferzellen zu Th2-Helferzellen fördert (Miner und Croft 1998). Die *il4*-Expression wurde in nicht infizierten RAW264.7 durch IFN γ stark herunterreguliert, während *T. gondii* die IFN γ -regulierte Hemmung antagonisierte (Tabelle 4). Dagegen wurde das Gen des IL-4-Rezeptors (*il4ra*) durch IFN γ etwa 10-fach hochreguliert, ein Effekt, der durch *T. gondii* deutlich gehemmt wurde (Tabelle 4). In Anwesenheit von MS-275 wurden beide Gene in infizierten RAW264.7 im Vergleich zu MS-275-behandelten, nicht infizierten RAW264.7 geringer exprimiert, die Hemmung durch den Parasiten war wie in Mock-

behandelten Zellen vor allem für *il4ra* deutlich. Die absoluten Transkriptmengen von *il4* und *il4ra* wurden durch MS-275 sowohl in nicht infizierten wie auch *Toxoplasma*-infizierten gegenüber Mock-behandelten Zellen hochreguliert, wobei *il4* in nicht infizierten RAW264.7 am stärksten reguliert wurde (Tabelle 4, Abbildung 8).

4.1.6.3 Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS)

SOCS werden durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert und hemmen in einer negativen Rückkopplungsschleife die jeweiligen Signalwege. In Säugetieren wurden acht SOCS identifiziert: SOCS1-7 und CISH, wobei SOCS1-3 und CISH vor allem den JAK/STAT-Signalweg modulieren während SOCS4-7 Einfluss auf die Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren nehmen (Trenkove und Ward 2013). Da in dieser Arbeit der SOCS-Einfluss auf immunrelevante Signalwege von Interesse war, wurde die Expression der Gene für SOCS1-3 und CISH weiter analysiert. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass *T. gondii* SOCS-1 und -3 induzieren kann und bestimmte Stämme darüber auch den IFN γ -Signalweg inhibieren können (Hunter und Sibley 2012).

In Mock-behandelten nicht infizierten RAW264.7 steigerte IFN γ die Expression von *socs1* mehr als 500-fach und auch *socs3* wurde stark hochreguliert (Tabelle 4). *Socs2* wurde dagegen durch IFN γ nur wenig hochreguliert und *cish* sogar deutlich inhibiert. In infizierten RAW264.7 wird *socs2* bei gleichzeitiger IFN γ -Stimulation stärker als in nicht infizierten leukämoiden Makrophagen exprimiert, während *T. gondii* die IFN γ -induzierte *socs1*- und *socs3*-Expression stark herunterreguliert. Nach Behandlung mit MS-275 wird *socs2* vor allem in nicht infizierten, in geringerem Ausmaß auch in *T. gondii*-infizierten leukämoiden Makrophagen verglichen mit den jeweiligen Mock-behandelten RAW264.7 deutlich hochreguliert; *cish* wird in Gegenwart von MS-275 geringfügig stärker exprimiert (Tabelle 4, Abbildung 8). Die Expression von *socs1* und *socs3* wurde in nicht infizierten und infizierten Monozyten/ Makrophagen durch MS-275 nicht wesentlich reguliert und auch die Hemmung der IFN γ -regulierten *socs1*- und *socs3*- Expression durch *T. gondii* wurde durch Behandlung mit MS-275 nicht aufgehoben (Tabelle 4, Abbildung 8).

4.1.6.4 TGF- β -Isoforme

TGF- β wirkt ebenfalls antiinflammatorisch, insbesondere die erworbene Immunantwort durch T-Zellen wird von TGF- β reguliert, aber auch Makrophagen werden durch TGF- β deaktiviert (Lang et al. 2006; Travis und Sheppard 2014). Bereits bekannt ist, dass *T. gondii*-infizierte Makrophagen vermehrt TGF- β_1 produzieren (Bermudez et al. 1993). In RAW264.7 hatte IFN γ keinen Effekt auf die TGF- β_1 -Expression, wohingegen die TGF- β_3 -Expression in nicht infizierten Monozyten/ Makrophagen durch IFN γ mehr als 10-fach gesteigert wurde (Tabelle 4). *Toxoplasma gondii* steigerte die IFN γ -induzierte *tgfb1*-Expression geringfügig, während die IFN γ -induzierte Hochregulation von *tgfb3* in Gegenwart des Parasiten gehemmt wurde. Die Behandlung von RAW264.7 mit MS-275 regulierte die durch IFN γ bzw. IFN γ und *T. gondii* regulierte Expression von *tgfb1* und *tgfb3* nur geringfügig oder gar nicht (Tabelle 4, Abbildung 8). Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass der HDAC-Inhibitor MS-275 die Transkription von Genen einiger immunmodulatorischer Moleküle wie IL-10 und SOCS2 in IFN- γ -stimulierten und nicht infizierten oder *Toxoplasma*-infizierten RAW264.7 fördert. Die Mehrzahl der hier untersuchten immunsuppressiven Moleküle wurde aber durch MS-275 nicht deutlich beeinflusst.

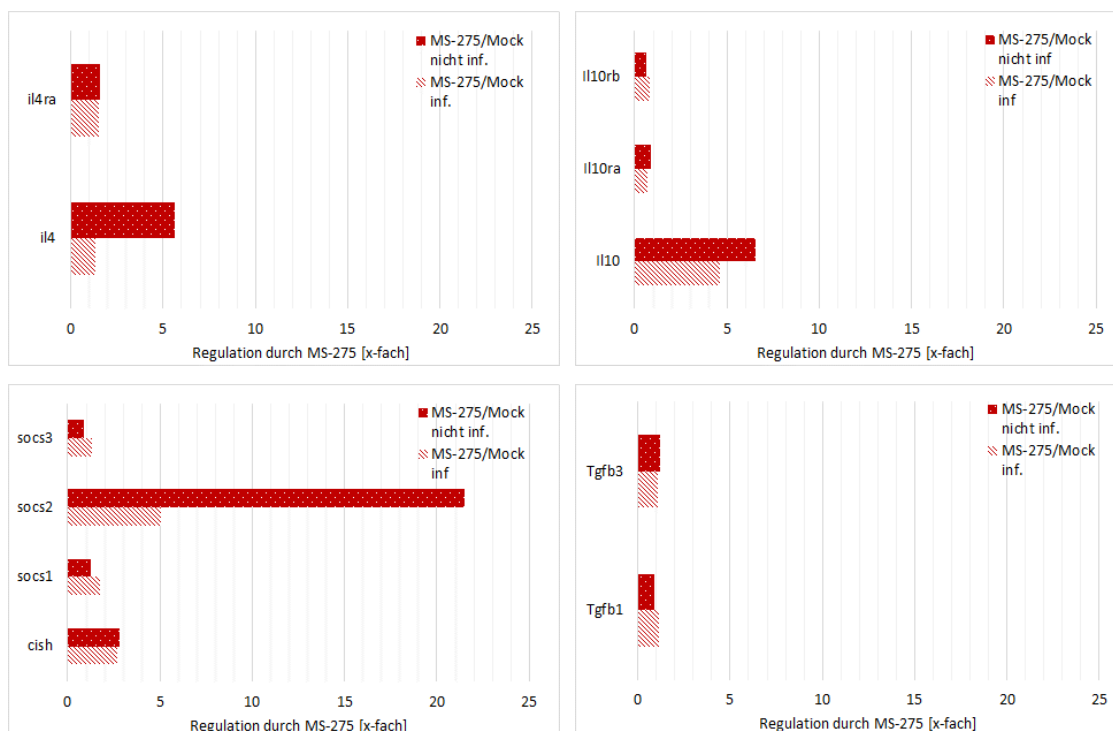


Abbildung 8 MS-275-vermittelte Regulation immunsupprimierender Gene in nicht infizierten und *T. gondii*-infizierten RAW264.7. Die Monozyten/Makrophagen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit *T. gondii* infiziert, eine Stunde nach Infektion erfolgte die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 oder als Kontrolle mit DMSO. Drei Stunden p.i. wurde mit IFN γ stimuliert. Vierundzwanzig Stunden p.i. wurde die RNA isoliert und mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptomanalyse wurde mittels High-Throughput Sequenzierung durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Verhältnis der Expression in An- und Abwesenheit von MS-275 in nicht infizierten (gepunkteter Balken) oder *T. gondii*-infizierten RAW264.7 (gestreifter Balken). Die Quotienten wurden aus den Werten der Tabelle 4 berechnet.

4.2 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die intrazelluläre Entwicklung von *Toxoplasma gondii* in murinen Monozyten/Makrophagen

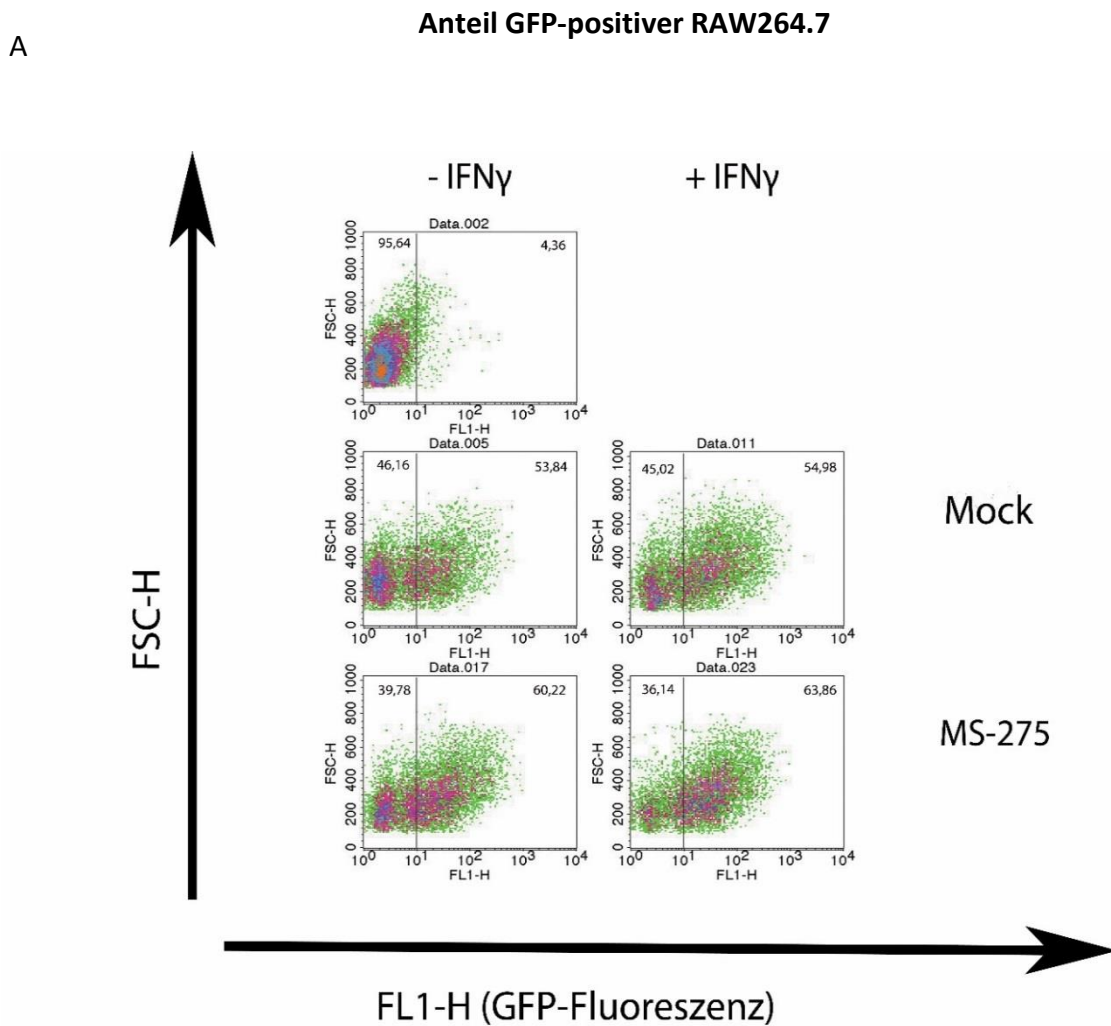
Da der HDAC-Inhibitor MS-275 die Expression einer Reihe von IFN γ -regulierten Genen in *Toxoplasma*-infizierten Monozyten/Makrophagen verstärkte, aber auch immunsuppressive Moleküle induzierte, wurde in weiteren Versuchen geprüft, ob eine Veränderung des Genexpressionsmusters in Anwesenheit der HDAC-Inhibitoren MS-275 und Natriumbutyrat die Fähigkeit von Makrophagen zur Parasitenabwehr veränderte. Zu diesem Zweck wurde die Replikationsrate des Parasiten in infizierten RAW264.7 sowie der Anteil infizierter RAW264.7 in einer Zellpopulation bestimmt.

4.2.1 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Parasitenvermehrung

4.2.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von MS-275 auf den Anteil T. gondii-infizierter RAW264.7 in der Gesamtpopulation

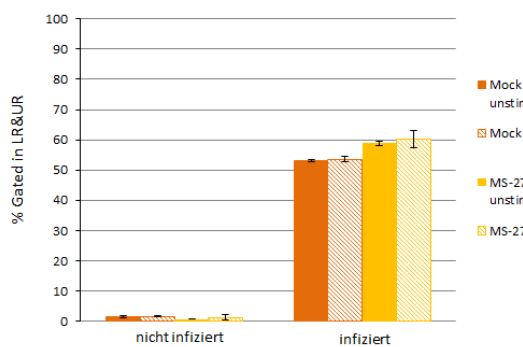
Zunächst wurde der Einfluss des HDAC-Inhibitors MS-275 auf die Parasitenvermehrung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden RAW264.7 ausgesät und im Verhältnis 3:1 mit dem *Toxoplasma* Typ-II-Stamm PTG-luc/GFP infiziert. Durch die GFP-Expression ist der Stamm in der Durchflusszytometrie innerhalb infizierter Zellen leicht nachweisbar. Eine Stunde p.i. wurde den Zellen der HDAC-Inhibitor MS-275 zugesetzt, drei und 27 Stunden p.i. wurden die Zellen mit IFN γ stimuliert. Zweiundvierzig Stunden p.i. wurden die RAW264.7 isoliert und durch FACS analysiert.

Der Anteil infizierter Zellen war im Mittel bei MS-275-behandelten Makrophagen um etwa 5 % größer als bei Mock-behandelten Makrophagen, dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 9). In den infizierten und IFN γ -stimulierten RAW264.7 betrug der Unterschied zwischen Mock-behandelten und MS-275-behandelten Zellen etwa 7 % (Abbildung 9).



B

Anteil GFP-positiver RAW264.7



C

Anteil GFP-positiver RAW264.7

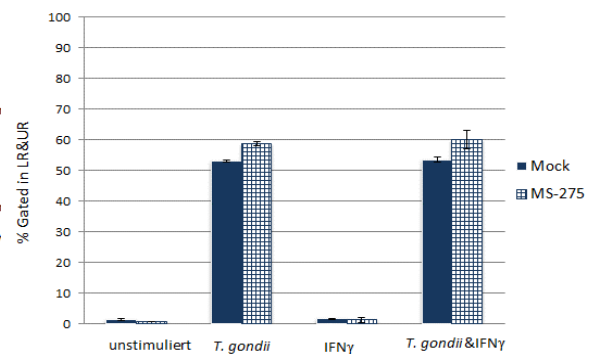


Abbildung 9 Anteil Toxoplasma-infizierter RAW264.7 nach Behandlung mit MS-275 und Stimulation mit IFN γ . Die RAW264.7 wurden 24 Stunden nach Aussaat mit dem Typ-II-Stamm PTG-luc/GFP infiziert sowie 1h p.i. mit MS-275 oder DMSO als Mock behandelt und gegebenenfalls 3h und 27h p.i. mit IFN γ stimuliert. **A** Repräsentative Dot Plots des FSC und der GFP-Fluoreszenz zum Nachweis von *T. gondii*. Aufgrund von nicht infizierten Kontrollzellen (oberster Dot Plot) wurden infizierte (rechter Sektor) und nicht infizierte Zellen (linker Sektor) differenziert. **B** Prozentualer Anteil GFP-positiver, infizierter RAW264.7 an der Gesamtheit der gemessenen Monozyten/ Makrophagen. Dargestellt ist der Vergleich von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen jeweils in An- und Abwesenheit von MS-275. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten **C** Prozentualer Anteil GFP-positiver, infizierter RAW264.7 an der Gesamtheit der gemessenen Monozyten/ Makrophagen. Dargestellt ist der Vergleich von Mock- und MS-275-behandelten Zellen jeweils in nicht infizierten, infizierten, IFN γ -stimulierten und *T. gondii*-infizierten und IFN γ -stimulierten RAW264.7. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.2.1.2 Untersuchung des Einfluss von MS-275 auf die parasitäre Replikationsrate mittels qPCR

Der Nachweis des parasitären Genoms in infizierten Monozyten/ Makrophagen erfolgte durch die Amplifikation des 529-bp-Fragments. Die RAW264.7 wurden mit *T. gondii* (NTE) im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1 infiziert, eine Stunde p.i mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 oder Mock-behandelt, und drei Stunden p.i. mit IFN γ und/oder LPS stimuliert. Vier, 24 und 48 Stunden p.i. wurde die genomische DNA isoliert und das 529-bp-Fragment von *T. gondii* mittels PCR amplifiziert. Die Berechnung der Replikationsrate erfolgte anhand der Crossing points (CP), die im LightCycler gemessen wurden. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Replikationsrate} = 2^{(CP_{4h} - CP_x)}$$

$x = 24h \text{ oder } 48h$

Im Zeitraum zwischen der ersten und zweiten DNA-Isolation wurde die parasitäre Belastung in den Kulturen jeweils gesenkt (Replikationsraten < 1 ; Abbildung 10). Weder zwischen den stimulierten und unstimulierten noch zwischen den MS-275- und Mock-behandelten RAW264.7 ließen sich signifikante Unterschiede feststellen. Eine tendenzielle Abnahme ist jedoch im Vergleich zwischen den unstimulierten und IFN γ /LPS-stimulierten DMSO-behandelten Makrophagen zu beobachten (Abbildung 10). Im Zeitraum zwischen vier und 48 Stunden p.i. wurde in nicht-stimulierten, Mock-behandelten Zellen dagegen eine deutliche Zunahme der Parasiten-DNA nachgewiesen. Verglichen mit der nicht stimulierten Kontrolle führte IFN γ allein zu keiner verbesserten Abwehrfähigkeit der RAW264.7, im Gegenteil war hier die parasitäre Replikationsrate sogar geringfügig höher (Abbildung 10). Der deutlichste antiparasitäre Effekt war durch die kombinierte Stimulation mit IFN γ und LPS messbar (Abbildung 10).

Überraschenderweise führte MS-275 in nicht stimulierten Monozyten/ Makrophagen zu einer starken Zunahme der parasitären DNA ($p < 0,05$; Abbildung 10). Auch in IFN γ -stimulierten RAW264.7 war im Vergleich zu Mock-behandelten Monozyten/ Makrophagen deutlich mehr *T. gondii*-DNA nachweisbar (Abbildung 10).

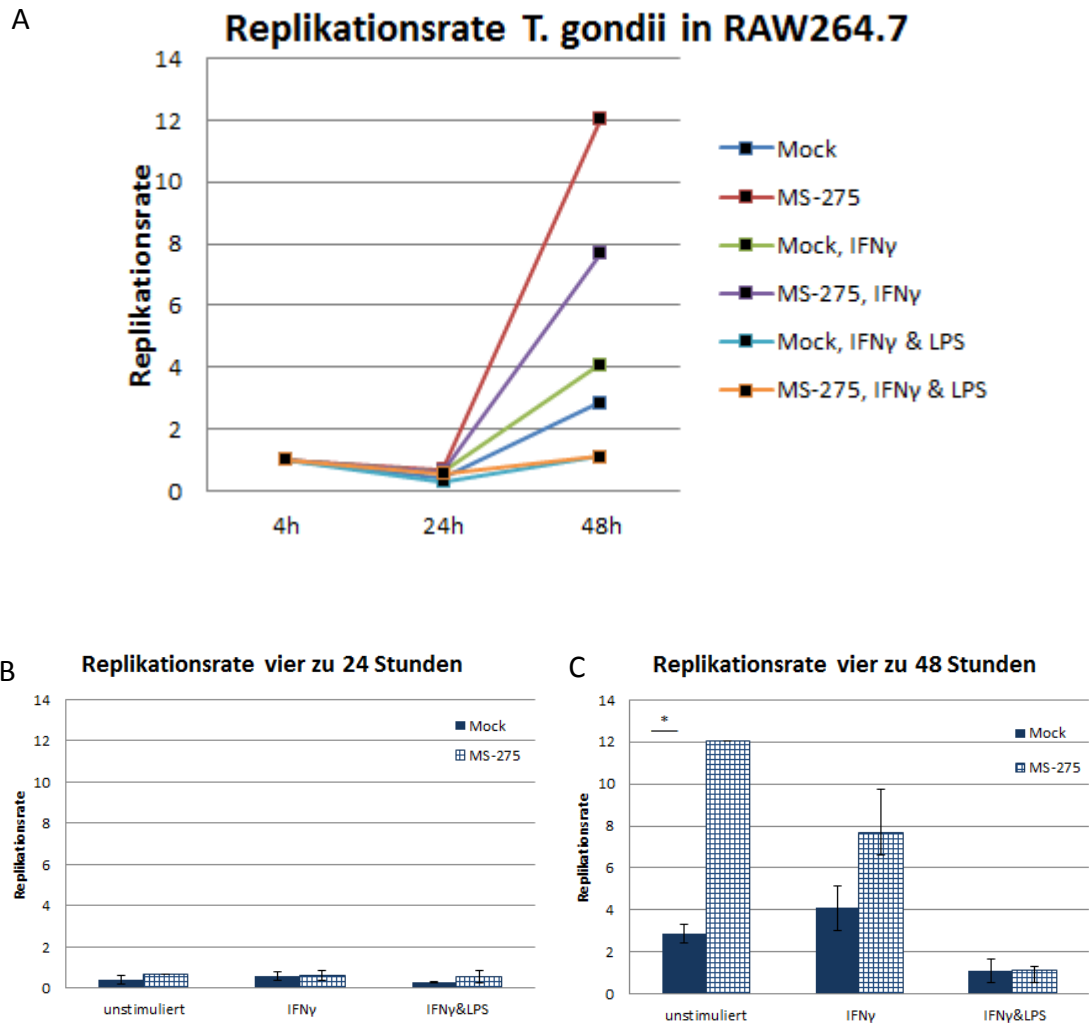


Abbildung 10 Nachweis des 529bp-DNA-Fragmentes von *T. gondii* in infizierten RAW264.7-Kulturen in An- und Abwesenheit von MS-275. Die Monozyten/Makrophagen wurden im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis 1,5:1 mit *T. gondii* infiziert, 1h p.i. mit MS-275 behandelt und 3h p.i. mit IFN γ alleine oder mit IFN γ und LPS stimuliert. Genomische DNA wurde vier, 24 und 48 Stunden nach Infektion isoliert und das 529 bp-Fragment von *T. gondii* unter Verwendung eines spezifischen Primerpaars durch qPCR amplifiziert. **A** Dargestellt ist die asexuelle Vermehrung von *T. gondii* in den infizierten Makrophagen. Sie wurde mit folgender Formel berechnet: $\text{Replikationsrate} = 2^{(CP^{4h} - CP^{24h})}$. **B** Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen Mock- und MS-275-Behandlung sind die jeweiligen Replikationsraten im Zeitraum zwischen 4h und 24h p.i. nebeneinander aufgetragen. **C** Analog zu B die Replikationsrate im Zeitraum zwischen 4h und 48h. Signifikante Unterschiede sind markiert (* $p < 0,05$).

4.2.2 Untersuchung des Einflusses von HDAC-Inhibitoren auf die Replikationsrate und Invasionsfähigkeit von *T. gondii* in RAW264.7

Durch den Immunfluoreszenztest sollte auf Einzelzellebene analysiert werden, ob MS-275 und Natriumbutyrat die intrazelluläre Entwicklung des Parasiten in murinen Monozyten/ Makrophagen beeinflussen. Dazu wurden RAW264.7 auf Deckgläschen ausgesät, im Parasit-zu-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1 mit *T. gondii* (NTE) infiziert, eine Stunde p.i. mit 2 µM des jeweiligen HDAC-Inhibitors behandelt und drei Stunden p.i. mit IFN γ und/ oder LPS stimuliert. Die Stimulation mit IFN γ wurde 27 Stunden p.i. wiederholt. Achtundvierzig Stunden p.i. wurden die Makrophagen fixiert, *T. gondii* wurde mithilfe eines Parasiten-spezifischen Antiserums und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers angefärbt, Nukleinsäuren durch Propidiumiodid gefärbt. Die Versuche wurden mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dazu wurde einerseits die Tachyzoiten-Anzahl pro parasitophorer Vakuole bestimmt, was ein Maß für die asexuelle Teilungsrate von *T. gondii* ist. Außerdem wurde der Anteil infizierter Makrophagen als Indikator für die Invasionsfähigkeit von Parasiten in die Makrophagen und die Parasitenabwehr durch die Makrophagen bestimmt.

4.2.2.1 Replikationsrate

In unstimulierten Mock-behandelten Kontrollzellen wurden im Mittel 6,49 Parasiten pro Vakuole gezählt (Abbildung 11, Abbildung 13). MS-275 änderte die Replikationsfähigkeit nicht deutlich, und auch Natriumbutyrat führte nur zu einer geringen Abnahme der mittleren Parasitenanzahl pro PV. Die Stimulation der Monozyten/ Makrophagen mit IFN γ führte nur zu einer geringen Reduktion der Parasitenreplikation. Dagegen senkte wie erwartet die Stimulation mit IFN γ und LPS in Mock-behandelten Zellen die mittlere Parasitenanzahl pro Vakuole auf 2,25 deutlich (Abbildung 11, Abbildung 13). LPS alleine führte zu einer moderaten Hemmung der intrazellulären Parasitenvermehrung. MS-275 und Natriumbutyrat hatten auch in IFN γ -

LPS-, und IFN γ /LPS-stimulierten Zellen keinen deutlichen Einfluss auf die Parasitenvermehrung (Abbildung 11).

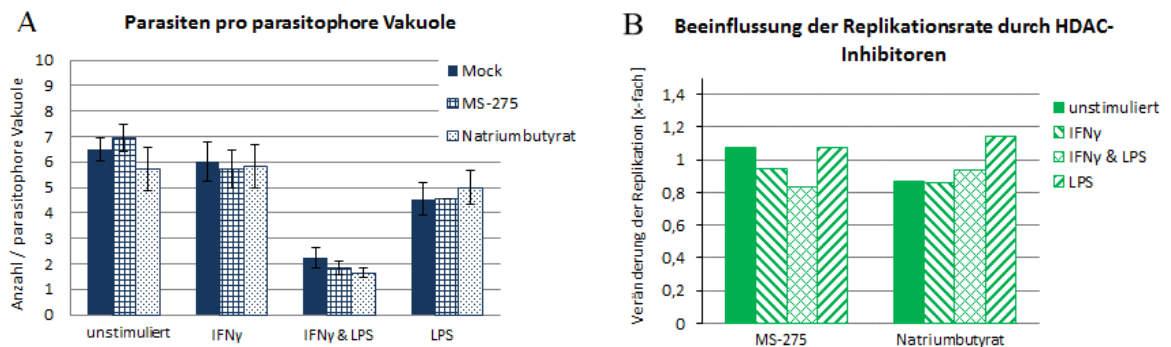


Abbildung 11 Intrazelluläre Replikationsrate von *T. gondii* in Monozyten/ Makrophagen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation mit IFN γ und/oder LPS. RAW264.7 wurden in einem Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1 mit *T. gondii* infiziert. Je ein Drittel der Ansätze wurde mit MS-275 oder Natriumbutytrat in einer Konzentration von 2 μ M behandelt, der Kontrollgruppe wurde dasselbe Volumen DMSO zugegeben. Ein Teil der Zellen wurde drei Stunden nach Infektion mit IFN γ allein, LPS allein, oder mit IFN γ und LPS stimuliert, Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach 48-stündiger Kultur wurden die Zellen fixiert, und Parasiten mit Antiserum und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sowie Nukleinsäuren mit Propidiumiodid gefärbt. **A** Dargestellt ist die mittlere Anzahl Tachyzoiten pro parasitophore Vakuole \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen (alleinige LPS-Stimulation: $n=2$). **B** Dargestellt ist der Einfluss der Behandlung mit MS-275 oder Natriumbutytrat auf die Parasitenreplikation, indem das Verhältnis der HDAC-Inhibitor-behandelten Probe zur DMSO-behandelten Kontrolle berechnet wurde.

4.2.2.2 Anteil infizierter Zellen an Gesamtkultur

Der Anteil infizierter Monozyten/ Makrophagen in unstimulierten Mock-behandelten Kontrollzellen betrug 43,11 %, die Zugabe von MS-275 oder Natriumbutytrat hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil infizierter RAW264.7 (Abbildung 12).

In IFN γ -stimulierten und IFN γ /LPS-stimulierten Kulturen bewirkten MS-275 und Natriumbutytrat jeweils eine geringfügige Senkung des Anteils infizierter Zellen, die allerdings statistisch nicht signifikant war (Abbildung 12). In allein mit LPS stimulierten Zellen hatte MS-275 keinen Einfluss auf den Anteil infizierter Zellen, während Natriumbutytrat zu einer geringfügigen, statistisch aber nicht signifikanten Abnahme führte (Abbildung 12).

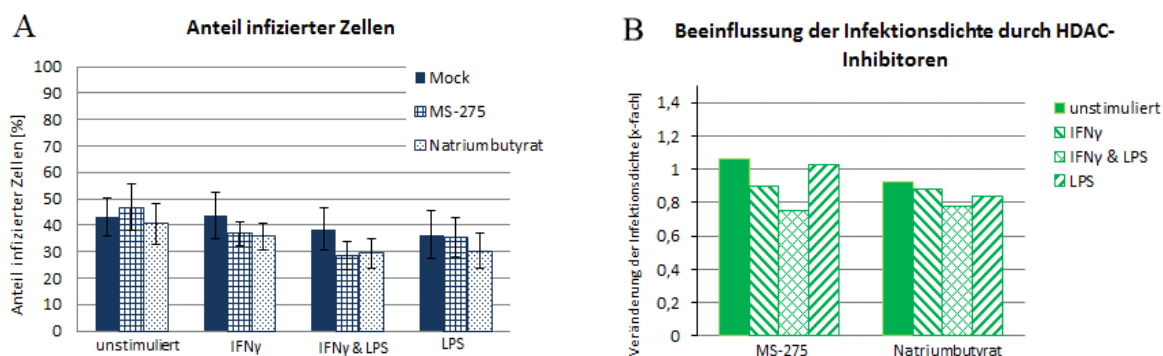


Abbildung 12 Anteil infizierter Zellen in *T. gondii*-infizierten RAW264.7-Kulturen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation mit IFN γ und/oder LPS. Die Infektion der RAW264.7 mit *T. gondii* erfolgte in einem Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 1,5:1. Anschließend wurde je ein Drittel der Ansätze mit MS-275 oder Natriumbutyrat in einer Konzentration von 2 μ M behandelt, die Kontrollgruppe mit dem entsprechenden Volumen DMSO zugegeben. Ein Teil der Zellen wurde drei Stunden nach Infektion mit IFN γ allein, LPS allein, oder mit IFN γ und LPS stimuliert, während die Kontrollzellen unstimuliert blieben. Nach 48-stündiger Kultur wurden die Zellen fixiert, und Parasiten mit Antiserum und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sowie Nucleinsäuren mit Propidiumiodid gefärbt. **A** Dargestellt ist der mittlere Anteil infizierter RAW264.7 \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen (alleinige LPS-Stimulation: n=2). **B** Dargestellt ist der Einfluss der Behandlung mit MS-275 oder Natriumbutyrat auf den Anteil *T. gondii*-infizierter RAW264.7 in der Gesamtpopulation, indem das Verhältnis der HDAC-Inhibitor-behandelten Probe zur DMSO-behandelten Kontrolle berechnet wurde.

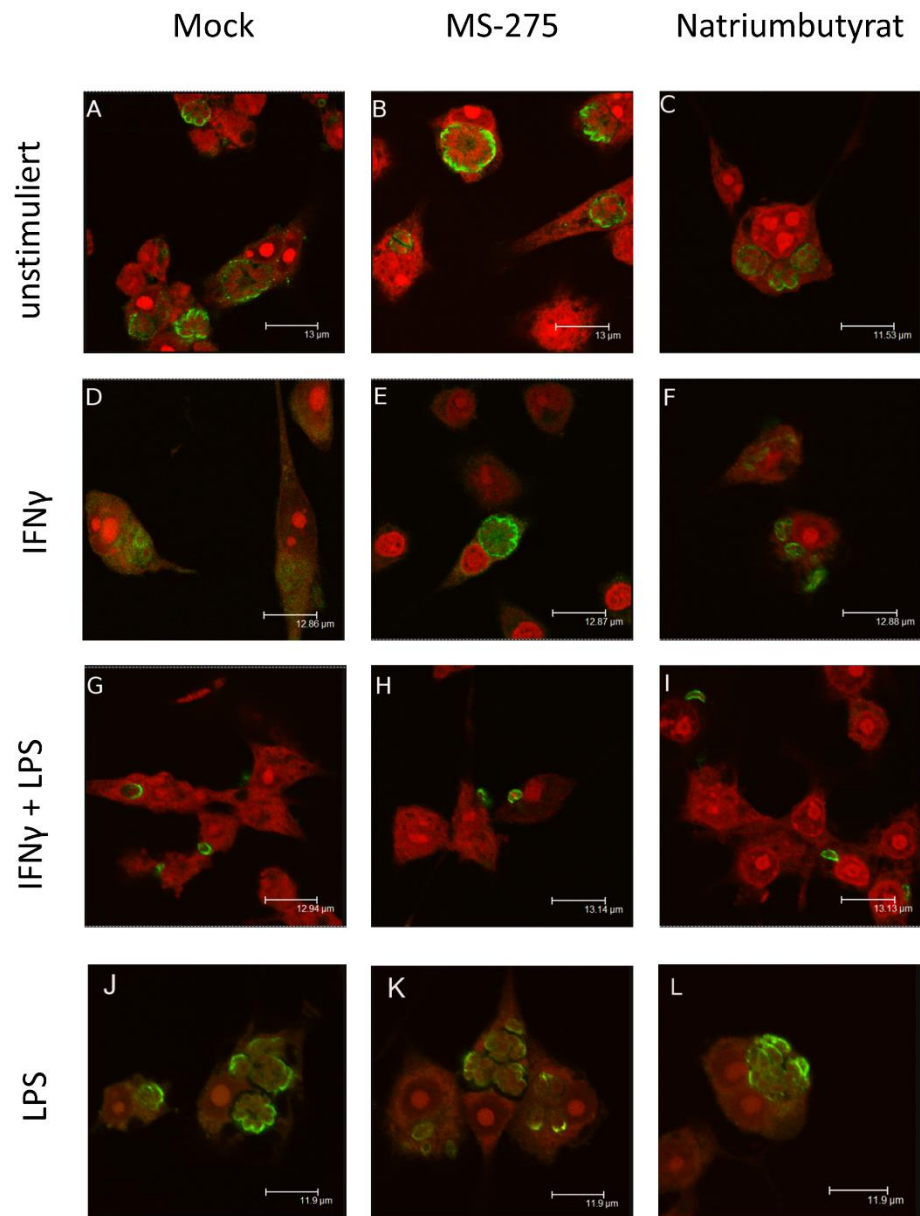


Abbildung 13 Immunfluoreszenzfärbung von *T. gondii*-infizierten Monozyten/ Makrophagen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Aktivierung mit IFN γ und/oder LPS. Versuchsdurchführung wie unter **Abbildung 11** beschrieben. Die repräsentativen Aufnahmen wurden durch konfokale Laserscanmikroskopie gewonnen, gezeigt ist jeweils die Überlagerung der Parasitenfärbung (grün) und der Nukleinsäurefärbung (rot).

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Expression von primären und sekundären IFN γ -Antwortgenen

5.1.1 Primäre Antwortgene

Die Expression der IFN γ -Antwortgene ist von dem Transkriptionsfaktor STAT-1 abhängig. Primäre Antwortgene werden direkt nach Bindung des STAT-1-Dimers an ihre GAS-Sequenz exprimiert, sekundäre Antwortgene benötigen hingegen zur vollständigen Expression die Produkte primärer IFN γ -Antwortgene als Transkriptionsfaktoren (Boehm et al. 1997). Zu den primären Antwortgenen zählen die IRF-codierenden Gene. IRF-1 nimmt eine zentrale Position in der *Toxoplasma*-Abwehr ein, da es als Transkriptionsfaktor für diverse sekundäre Antwortgene fungiert (Paun und Pitha 2007). Des Weiteren zählen die Immunitäts-bezogenen GTPasen (IRG) zu den primären Antwortgenen. IRGs spielen bei Mäusen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Eradikation von *T. gondii*, indem sie zur Rupturierung der parasitophoren Vakuole beitragen (Zhao et al. 2009).

Die Transkriptmengen der verschiedenen IRF-codierenden Gene zeigten in der Transkriptomanalyse keine einheitliche Regulation nach der Stimulation von Mausmonozyten/ Makrophagen mit IFN γ oder nach Infektion mit *T. gondii*. Auch MS-275 regulierte die IFN γ -induzierte Expression IRF-codierender Gene in nicht infizierten und in infizierten leukämoiden Monozyten/ Makrophagen unterschiedlich.

Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigten, dass die IFN γ -induzierte *irf1*-Expression durch *T. gondii* auf etwa ein Drittel der nicht infizierten Zellen reduziert wird. Dies steht im Einklang mit vorhergegangenen Untersuchungen (Lüder et al. 2001; Kim et al. 2007; Rosowski et al. 2014). Die Reprimierung der IFN γ -induzierten Expression durch den Parasiten war allerdings statistisch nicht signifikant. Gleiches galt für die IFN γ -

induzierte *irf8*-Expression. Natriumbutyrat verbesserte die IFN γ -Antwort der infizierten RAW264.7 gemessen an den nicht infizierten leukämoiden Makrophagen. Die Anwesenheit von MS-275 hatte hingegen einen nachteiligen Effekt auf die IFN γ -induzierte Expression von *irf1* und *irf8* in infizierten RAW264.7. Die IFN γ -regulierte *irf8*-Expression war in Anwesenheit von MS-275 zwischen infizierten und nicht infizierten RAW264.7 signifikant herunterreguliert. Interessanterweise verstärkte MS-275 in nicht infizierten RAW264.7 die IFN γ -regulierte Hochregulation von *irf-1* und *irf-8* besonders deutlich. Die genomweite Transkriptomanalyse zeigte für *irf1* allerdings, dass sich die Anzahl der normalisierten Reads zwischen IFN γ -stimulierten und gleichzeitig MS-275- oder Mock-behandelten RAW264.7 nicht unterscheidet. Dies lässt darauf schließen, dass die Basalexpression von *irf1* und *irf8* durch MS-275 negativ beeinflusst wird, sodass eine gesteigerte IFN γ -Antwort bei gleicher Anzahl normalisierter Reads vorliegt. Um diese Hypothese zu verifizieren, könnten bei einer erneuten genomweiten Transkriptomanalyse auch nicht-stimulierte, MS-275-behandelte Zellen untersucht werden, um einen direkten Vergleich beider Methoden zu ermöglichen.

Als weitere primär durch IFN γ regulierte Gene wurden in dieser Arbeit auch die IRG-codierenden Gene durch High-Throughput-RNA-Sequenzierung analysiert. Die IFN γ -induzierte Expression der untersuchten IRG-codierenden-Gene wurde durch *T. gondii* wie erwartet inhibiert. Bereits bekannt war, dass der *Toxoplasma*-Typ-I-Stamm BK die Expression von *irga6* inhibiert (Zimmermann et al. 2006). Nun konnte gezeigt werden, dass auch der Typ-II-Stamm NTE die Expression verschiedener IRG-codierender Gene negativ beeinflusst. Die IRG-codierenden Gene wurden durch den HDAC-Inhibitor MS-275 in den nicht infizierten RAW264.7 entweder nicht beeinflusst oder geringfügig stärker exprimiert, in den *T. gondii*-infizierten leukämoiden Makrophagen ließ sich keine einheitliche Regulation feststellen.

Aufgrund des heterogenen Effektes von MS-275 auf die Expression unterschiedlicher IRG kann davon ausgegangen werden, dass die *T. gondii*-vermittelte Reprimierung nicht bei allen Genen gleichermaßen auf ein verändertes Chromatin-Remodelling zurückzuführen ist.

5.1.2 Sekundäre Antwortgene

Die inhibitorische Wirkung von *T. gondii* auf die MHCII-codierenden Gene *h2aa*, *h2ab*, *h2eb*, *h2ma*, *h2mb*, *h2oa* in murinen Knochenmarksmakrophagen (Lüder et al. 2001) konnte für RAW264.7 in dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit durch genomweite Transkriptomanalyse erstmalig festgestellt, dass die IFN γ -regulierte Expression einer Reihe weiterer MHCII-codierender Gene in RAW264.7 durch *T. gondii* herunterreguliert werden. Lediglich wenige Gene (*h2t3*, *h2t24*, *h2m3*) waren in infizierten Zellen genauso stark oder sogar stärker exprimiert als in nicht infizierten Zellen. Des Weiteren wurde die verminderte Expression von *nos2* durch MS-275 reproduziert (Mombelli et al. 2011). Allerdings wurde eine vermehrte *nos2*-Expression in infizierten RAW264.7 gemessen, was von den Ergebnissen von Lüder et al. und Zimmermann et al. abweicht (Lüder et al. 2003; Zimmermann et al. 2006). Die Hemmung der IFN γ -stimulierten *ciita*-Expression nach Infektion von RAW264.7 mit *T. gondii* konnte in dieser Arbeit mittels RT-qPCR bestätigt werden, ebenso ihre Wiederherstellung durch HDAC-Inhibitoren (Lang et al. 2012), wobei Natriumbutyrat einen deutlich geringeren Einfluss auf die *T. gondii*-vermittelte Hemmung der IFN γ -induzierten *ciita*-Expression als MS-275 ausübte. Lang et al. (Lang et al. 2012) registrierten ebenfalls einen im Vergleich mit MS-275 schwächeren Effekt von Natriumbutyrat auf die IFN γ -induzierte mRNA-Menge in murinen Knochenmarksmakrophagen, der Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren fiel jedoch weniger deutlich aus als in dieser Arbeit (Lang et al. 2012). Auffällig war, dass die IFN γ -vermittelte Hochregulation der *ciita*-Expression durch MS-275 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle oder im Vergleich zur Behandlung mit Natriumbutyrat deutlich gehemmt wurde. Dieser Befund ist vermutlich damit zu erklären, dass in Anwesenheit von MS-275 – anders als die *irf1*- und *irf8*-Expression – bereits die Basalexpression von *ciita* gesteigert ist. Dies wird zumindest durch die genomweite Transkriptomanalyse untermauert, da MS-275-behandelte und IFN γ -stimulierte RAW264.7 jeweils deutlich höhere mRNA-Mengen aufwiesen als die entsprechenden Mock-behandelten leukämoiden Monozyten/ Makrophagen. Dies deutet darauf hin, dass auch die basale Expression von *ciita* durch MS-275 hochreguliert wird. Da der Einfluss von MS-275 auf

die Expression des *ciita*-Gens, wie bereits oben erwähnt, nicht durch High-Throughput-RNA-Sequenzierung untersucht wurde, kann allerdings über die Basalexpression keine abschließende Aussage getroffen werden.

Die GbP-codierenden Gene wurden durch *T. gondii* herunterreguliert, MS-275 verstärkte in den nicht infizierten RAW264.7 die IFN γ -induzierte Expressionssteigerung. Allerdings bewirkte MS-275 außer für *gbp11* keine verbesserte IFN γ -Antwort in *T. gondii*-infizierten murinen Makrophagen/ Monozyten.

Die Transkriptomanalyse zeigte, dass der Einfluss von MS-275 auf die Expression der sekundären Antwortgene sich von Gen zu Gen unterscheidet und kein einheitlicher Trend erkennbar ist. Dies gilt sowohl im Vergleich zwischen Gengruppen wie den MHC-II-codierenden Genen oder den Guanylat-bindende-Proteine-codierenden Genen als auch innerhalb der genannten Gengruppen.

5.1.3 Mögliche weitere Wirkungen der HDAC-Inhibitoren

Um Rückschlüsse darüber ziehen zu können, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf ein verändertes Chromatin-Remodelling zurückzuführen sind oder auch Wechselwirkungen mit anderen zellulären Prozessen eine Rolle spielen könnten, soll nachfolgend das Wirkspektrum der verwendeten HDAC-Inhibitoren betrachtet werden. Des Weiteren ist von Interesse, warum sich MS-275 und Natriumbutyrat hinsichtlich ihrer Wirkung auf die IFN γ -induzierte Expression von *ciita*, *irf1* und *irf8* in dieser Arbeit unterschieden. Die Behandlung mit MS-275 glich laut den Ergebnissen der RT-qPCR die IFN γ -regulierte *ciita*-Transkription zwischen *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten RAW264.7 an und hatte dagegen wenig Effekt auf die IFN γ -induzierte Expression von *irf1* und *irf8* in *T. gondii*-infizierten Makrophagen/ Monozyten. Natriumbutyrat hatte hingegen keinen Effekt auf die *ciita*-Expression in infizierten RAW264.7, dafür steigerte es aber insbesondere die IFN γ -regulierte *irf8*-Expression in infizierten Monozyten/ Makrophagen.

Das Wirkspektrum von MS-275 umfasst unumstritten die Klasse-I-Histondeacetylasen HDAC1, HDAC2 und HDAC3 (Wagner et al. 2013; Wightman et al. 2013). Einige Autoren gehen außerdem von einer Präferenz zur Hemmung von HDAC1 gegenüber HDAC3 aus (Zhang und Schluesener 2012). Die Aussagen bezüglich der Wirkung von Natriumbutyrat sind in der Literatur dagegen sehr widersprüchlich. Laut Herstellerangabe inhibiert Natriumbutyrat die Klasse-I-Histondeacetylasen HDAC1 und 2 sowie HDAC 7 aus der HDAC-Klasse II (Abcam 2015). Andere Untersuchungen zeigen eine Inhibierung von HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 (Buggy et al. 2000; Wagner et al. 2013) oder schließen sogar nur die Klasse III sowie HDAC6 und 10 vom Wirkspektrum aus (Mohana Kumar et al. 2007). Auch die empfohlenen Natriumbutyratkonzentrationen variieren vom unteren mikromolaren Bereich bis in den millimolaren Bereich (Klampfer et al. 2003; Wagner et al. 2013). Grundsätzlich wird MS-275 eine höhere Spezifität zugesprochen, während Natriumbutyrat ein breites Spektrum von HDACs inhibiert. Dabei wird für Natriumbutyrat im Gegensatz zu MS-275 meist auch eine Hemmung von Vertretern der HDAC-Klasse II angenommen.

Klampfer et al. (Klampfer et al. 2004) identifizierten in Colon-Karzinomzellen Klasse-I-HDACs als transkriptionssteigernd für STAT1-abhängige IFN γ -regulierte Gene. Die Klasse-II-Histondeacetylase HDAC4 beeinflusste die Transkription dagegen negativ (Klampfer et al. 2004). Demnach würde MS-275 sich durch die Hemmung des transkriptionssteigernden Effekts zumindest partiell negativ auf die Expression von STAT-1-abhängigen Genen auswirken. Natriumbutyrat hätte hingegen durch die Hemmung des inhibierenden Einflusses von HDAC4 eine transkriptionsfördernde Wirkung. In einer weiteren Untersuchung stellten Klampfer et al. (Klampfer et al. 2004) einen negativen Effekt von HDAC-Inhibitoren auf diverse Schritte des IFN γ -Signalwegs fest (Klampfer et al. 2004). Dies betraf die Aktivität von JAK1 und JAK2, die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 sowie dessen Kernimport. Folglich verminderten HDAC-Inhibitoren auch die STAT1-abhängige Transkription, die IFN γ -regulierte Transkription wurde um über 90 % reduziert (Klampfer et al. 2004).

Da allerdings in dieser Arbeit aufgrund der Transkriptomanalyse durch RNAseq ganz überwiegend ein transkriptionsfördernder Effekt von MS-275 auf IFN γ -regulierte Gene

nachgewiesen wurde, scheinen diese Wirkungen für die hier verwendeten RAW264.7-Zellen keinen nennenswerten Effekt gehabt zu haben.

Die verschiedenen Zelltypen sind ein wahrscheinlicher Grund für die unterschiedliche Rolle von HDAC-Inhibitoren bei der STAT1-abhängigen Transkription. Colonepithelzellen kommen physiologisch mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat in Kontakt, der beim bakteriellen Abbau von Ballaststoffen im Dickdarm entsteht (Klampfer et al. 2003). In gesunden Zellen fungiert Butyrat als Überlebensfaktor, auf transformierte Zellen wirkt er proapoptotisch und differenzierungsfördernd (Klampfer et al. 2003). Insofern ist es naheliegend, dass Colonkarzinomzellen anders auf Butyrat und andere HDAC-Inhibitoren reagieren als die leukämoiden Makrophagen.

Krämer et al. postulierten, dass die STAT-1-Aktivität durch einen Wechsel von Acetylierung zu Phosphorylierung reguliert werde (Krämer et al. 2008). Die Deacetylierung des Proteins sei für die IFN-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 notwendig, was durch HDAC3 reguliert sei (Krämer et al. 2008). Danach müsste MS-275 der IFN γ -induzierten Expressionssteigerung von primären und sekundären Antwortgenen entgegenwirken, da die STAT1-Aktivierung inhibiert würde. Je nachdem, ob auch Natriumbutyrat HDAC3 hemmt (siehe oben) könnte auch dieser HDAC-Inhibitor STAT1-Phosphorylierung inhibieren. Allerdings wird die Notwendigkeit einer Deacetylierung von STAT1 als Voraussetzung für dessen Tyrosinphosphorylierung durch andere Arbeiten nicht gestützt (Antunes et al. 2011). Da in dieser Studie MS-275 in nicht infizierten RAW264.7 die IFN γ -regulierte Expression nur weniger Gene hemmte, kann ein genereller Einfluss von MS-275 auf die STAT1-Aktivierung nahezu ausgeschlossen werden. Die Übertragbarkeit der Daten von Krämer et al. (Krämer et al. 2008) auf die hier dargestellten Analysen ist auch deshalb fraglich, da die Versuche an einer humanen embryonalen Nierenzelllinie durchgeführt wurden und mit IFN α statt IFN γ stimuliert wurde.

Grundsätzlich können Histondeacetylasen in unterschiedlichen Zelltypen und Spezies sehr unterschiedliche Effekte auf die IFN γ -regulierte Expression primärer Antwortgene ausüben. Für die Colon-Karzinomzelllinie Hke-3 wurde eine hemmende Wirkung von

HDAC-Inhibitoren auf die IFN γ -induzierte *irf1*-Expression festgestellt (Klampfer et al. 2004). In *Toxoplasma*-infizierten HFF-Zellen hatte die Anwesenheit von Trichostatin A keinen positiven Einfluss auf die durch den Parasiten inhibierte IFN γ -stimulierte *irf1*-Expression (Rosowski et al. 2014). Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) reagierten im Luciferase-Test je nach Reporterkonstrukt unterschiedlich (Rosowski et al. 2014), was die Promotorspezifität von Histondeacetylasen unterstreicht. MS-275 steigerte sowohl in nicht infizierten als auch in *T. gondii*-infizierten Zellen die IFN γ -regulierte Expression eines Luciferase-Reporters unter Kontrolle eines STAT1-abhängigen Promoters. Da sich allerdings das Verhältnis des Luciferase-Signals zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen nicht änderte, wurde nicht von einer Antagonisierung der Parasiten-induzierten Inhibierung der IFN γ -Antwort ausgegangen. Natriumbutyrat hatte in beiden Reporter-Gen-Konstrukten keinen Einfluss auf IFN γ -induzierte Expression (Rosowski et al. 2014).

In murinen Trophoblasten konnte die physiologische Unterdrückung der IFN γ -Antwort, die in diesen Zellen eine Abstoßungsreaktion aufgrund entzündlicher Prozesse verhindern soll, durch Trichostatin A aufgehoben werden (Choi et al. 2009). Auch die Basalexpression von *irf1* wurde in Trophoblasten durch den HDAC-Inhibitor bereits erhöht, in Kombination mit IFN γ ergab sich ein synergistischer Effekt. Die parallel untersuchten embryonalen Fibroblasten (NIH-3T3) zeigten hingegen eine leichte Abnahme der IFN γ -induzierten *irf1*-Expression in Gegenwart von Trichostatin A (Choi et al. 2009). In humanen neonatalen Fibroblasten bewirkte Natriumbutyrat eine transiente Steigerung der globalen Histon-H4-Acetylierung, anschließend sank der Anteil der acetylierten Lysinreste unter das Niveau vor Zugabe des Inhibitors. In Lymphozyten hingegen blieb eine verstärkte Histondeacetylierung auch nach Auswaschung von Natriumbutyrat bestehen (Schröter et al. 1981).

Insgesamt zeigen diese Studien also, dass Histondeacetylasen in verschiedenen Zelltypen auf unterschiedliche Weise in die Regulation von IFN γ -Antwortgenen eingreifen und folglich auch unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Insofern können durch den Vergleich mit vorherigen Arbeiten, die mit anderen Zelllinien

durchgeführt wurden, nicht unmittelbar Schlüsse auf die hier erhobenen Daten gezogen werden und umgekehrt. Für die in dieser Arbeit verwendeten RAW264.7 scheinen keine relevanten Wechselwirkungen mit anderen zellulären Prozessen als dem Chromatin-Remodelling aufgetreten zu sein.

5.1.4 Schlussfolgerungen zur Regulation primärer und sekundärer Antwortgene durch HDAC-Inhibitoren in *Toxoplasma*-infizierten Makrophagen

Toxoplasma gondii hatte laut den Ergebnissen der genomweiten Transkriptomanalyse einen vergleichbaren Effekt auf die Expression sekundärer Antwortgene in Mock- und MS-275-behandelten IFN γ -stimulierten RAW264.7. Zwar war die mRNA-Menge in den MS-275-behandelten Zellen deutlich höher, die Infektion mit dem Parasiten verursachte aber in beiden Fällen eine ähnliche Hemmung, für *ciita* beispielsweise auf circa 11 % bzw. 13 % der ursprünglichen Expression. Dies steht in Einklang mit dem von Lang et al. (Lang et al. 2012) aufgestellten Modell, dass *T. gondii* die Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Komplexen und HATs an IFN γ -regulierte Promotoren vermindert und so auch die IFN γ -induzierte *ciita*-Expression inhibiert (siehe 1.1.4.3). MS-275 greift demnach also nicht direkt in die durch *T. gondii* vermittelte Hemmung der IFN γ -regulierten *ciita*-Expression ein, sondern antagonisiert sie indirekt durch eine generell erhöhte CIITA-Transkriptmenge. Die Acetylierung der Histone H3 und H4 verändert sich in Gegenwart von MS-275 sowohl in nicht infizierten als auch in infizierten RAW264.7 (Lang et al. 2012), wodurch die IFN γ -induzierte Genexpression gleichermaßen in infizierten und nicht infizierten Zellen gesteigert wird. Daher bleibt der Quotient zwischen nicht infizierten und infizierten MS-275-behandelten RAW264.7 ähnlich zu dem der Mock-behandelten RAW264.7. Aufgrund der heterogenen Regulation der IFN γ -induzierten Expression sekundärer Antwortgene durch MS-275, wie sie durch die genomweite Transkriptomanalyse belegt wurde, kann dieser Befund jedoch nicht generalisiert werden.

Die Behandlung mit MS-275 führte laut RT-qPCR nicht zu einer Wiederherstellung der *irf1*- und *irf8*-Expression in *T. gondii*-infizierten Makrophagen/ Monozyten und die High-Throughput-Sequenzierung zeigte, dass die Expression von *irf1* durch den HDAC-Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Gleiches galt nur für *irf2*. Die Expression anderer primärer Antwortgene wurde durch MS-275 hingegen unterschiedlich stark beeinflusst, sodass keine allgemeine Aussage über den Einfluss von MS-275 auf die Expression primärer Antwortgene in dieser Arbeit abgeleitet werden konnte.

Der unterschiedliche Einfluss von MS-275 auf die IFN γ -regulierte Expression von *ciita* auf der einen Seite und *irf1* und *irf8* auf der anderen Seite unterstützt die von Rosowski et al. (Rosowski et al. 2014) formulierte These, dass sich der Mechanismus, durch den *T. gondii* die IFN γ -induzierte Expression von primären Antwortgenen inhibiert, von dem zur Reprimierung der *ciita*-Expression unterscheidet. Für die IFN γ -induzierte Transkription von *ciita* spielt die Rekrutierung des Brahma-associated factor (BAF) mit der ATPase Brahma-related-gene 1 (BRG-1) sowie die nachfolgende Histonacetylierung eine zentrale Rolle (Lang et al. 2012). Die Expression von *irf1* erfolgt dagegen unabhängig von BRG-1 (Wang et al. 2011). Daher könne nicht unmittelbar von den Beobachtungen bezüglich eines sekundären Antwortgens auf primäre Antwortgene geschlossen werden (Rosowski et al. 2014). Tatsächlich führte MS-275 in HFF-Zellen, die mit dem *Toxoplasma*-Typ-I-Stamm RH infiziert waren, nicht zu einer deutlich verbesserten IFN γ -induzierten *irf1*-Expression (Rosowski et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte dies nun für Makrophagen, die mit einem *Toxoplasma*-Typ II-Stamm infiziert waren, bestätigt werden. Ebenfalls in Einklang mit den eigenen Ergebnissen der RT-qPCR zeigte sich in einem Luciferase-Reportertest in der Arbeit von Rosowski et al. ein positiver Effekt von Natriumbutyrat auf die IFN γ -induzierte *irf1*-Expression (Rosowski et al. 2014).

Durch High-Throughput RNA-Sequenzierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MS-275 die Expression vieler IFN γ -induzierter Gene unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii* verstärkt. Detaillierte Analysen von Subpopulationen primärer

bzw. sekundärer IFN γ -Antwortgene deuten dabei darauf hin, dass vor allem sekundär regulierte Gene, aber nur die Hälfte der primär regulierten Gene durch MS-275 in ihrer Expression deutlich verstärkt werden. Das legt den Schluss nahe, dass HDACs vor allem die Expression von sekundären IFN γ -Antwortgenen negativ beeinflussen. Die häufig synergistische Wirkung von MS-275 führte auch in *Toxoplasma*-infizierten Monozyten/ Makrophagen zu deutlich höheren IFN γ -induzierten Transkriptmengen im Vergleich zu infizierten Zellen, die nur mit IFN γ stimuliert worden waren. Dies zeigt, dass MS-275 die IFN γ -vermittelte Immunreaktivität von Monozyten/ Makrophagen durchaus verbessern könnte. Auch der Befund, dass MS-275 und Natriumbutyrat jeweils die IFN γ -induzierte Hochregulation von CIITA bzw. von IRF-1 und IRF-8 in *Toxoplasma*-infizierten Zellen verstärkte (Abbildung 3), zeigt, dass HDAC-Inhibitoren die Immunantwort gegen *T. gondii* verbessern könnten. Allerdings hemmt *T. gondii* in MS-275-behandelten Zellen die IFN γ -induzierte Expression von primären und sekundären Antwortgenen von wenigen Ausnahmen abgesehen genauso stark oder sogar stärker als ohne MS-275. Auch die 50 am stärksten durch IFN γ regulierten Gene werden in MS-275-behandelten Zellen mindestens genauso stark durch *T. gondii* in ihrer Expression gehemmt wie in Mock-behandelten Kontrollen. Dies zeigt damit sehr deutlich, dass MS-275 die Parasiten-vermittelte Hemmung der IFN γ -vermittelten Expression nicht genomweit vermindert. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nur im Rahmen der verwendeten Protokolle aussagekräftig sind. Eine Modifikation der Parameter, insbesondere der Inkubationszeit mit IFN γ , kann auch bei gleicher Zelllinie durchaus zu sehr unterschiedlichen Resultaten führen.

Trotzdem davon ausgegangen werden, dass das von Lang et al. (Lang et al. 2012) etablierte Modell zum Einfluss von *T. gondii* auf den pIV-Promotor von *ciita* bzw. auf die MHC Klasse II-Oberflächenexpression in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren nicht generell auf andere sekundäre und primäre Antwortgene übertragen werden kann. Eine spezifisch durch Manipulation von HDACs vermittelte Hemmung der IFN γ -Antwort durch *Toxoplasma* kann damit als Ursache für die verminderte IFN γ -Reaktivität von Monozyten/ Makrophagen weitgehend ausgeschlossen werden. Möglicherweise

existieren unterschiedliche Mechanismen, wie HDAC-Inhibitoren das IFN γ -regulierte Expressionsprofil in Gegenwart von *T. gondii* modifiziert.

Die hier betrachteten möglichen Wechselwirkungen von HDAC-Inhibitoren mit anderen zellulären Prozessen außerhalb des Chromatin-Remodellings scheinen für die IFN γ -regulierte Transkription der untersuchten Gene, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle gespielt zu haben. Allerdings kann eine Beeinflussung durch HDAC-Inhibitoren aufgrund des komplexen Substratspektrums von Histondeacetylasen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Aufklärung von möglichen Interaktionen des HDAC-Inhibitors mit weiteren zellulären Prozessen muss in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

5.2 Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Parasitenentwicklung in murinen Makrophagen

Obwohl MS-275 die Hemmung der IFN γ -induzierten Genexpression in infizierten Monozyten/ Makrophagen nicht generell verminderte, waren Transkripte vieler IFN γ -regulierter Gene in infizierten Zellen durch MS-275 dennoch deutlich vermehrt. Daher war auch der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Parasitenentwicklung in Monozyten/ Makrophagen von Interesse. Durch Immunfluoreszenztest wurde allerdings kein signifikanter Effekt der Histondeacetylase-Inhibitoren MS-275 und Natriumbutyrat auf die Abwehrfähigkeit von RAW264.7 Monozyten/ Makrophagen gegen *T. gondii* sichtbar. Weder die Replikationsrate des Parasiten noch der Anteil der infizierten Zellen sank unter Einfluss der HDAC-Inhibitoren in leukämoiden Makrophagen verglichen mit der DMSO-Kontrolle signifikant ab. Lediglich ein tendenziell geringerer Anteil infizierter RAW264.7 wurde unter IFN γ - beziehungsweise kombinierter IFN γ /LPS-Stimulation und gleichzeitiger Behandlung mit MS-275 oder Natriumbutyrat festgestellt. Auch durch durchflusszytometrische Untersuchung wurde kein signifikanter Einfluss von MS-275 auf den Anteil infizierter Makrophagen und die

mittlere GFP-Fluoreszenz als relatives Maß der Infektionsstärke gemessen. Lediglich der Anteil der *T. gondii*-infizierten RAW264.7 war tendenziell leicht erhöht. Erstaunlicherweise wurde aber mittels qPCR genomischer DNA in MS-275-behandelten Kulturen deutlich mehr *T. gondii*-DNA detektiert als in Mock-behandelten Kontrollen. Allerdings muss die erhöhte DNA-Menge nicht notwendigerweise auch eine höhere Replikationsrate des Parasiten bzw. eine geringere Abwehrleistung der Monozyten/ Makrophagen anzeigen, sondern könnte möglicherweise auch auf einen direkten Einfluss von MS-275 auf den Parasiten zurückzuführen sein. So führte die Behandlung von *Toxoplasma*-Tachyzoiten mit dem HDAC-Inhibitor FR235222 zur Aneuploidie (Bougdour et al. 2009). Falls MS-275 die parasitäre Membran überqueren kann, ist ein ähnlicher Effekt auch für MS-275 möglich. Somit könnte mehr *Toxoplasma*-DNA in den MS-275-behandelten RAW264.7 vorhanden gewesen sein, ohne dass die Anzahl an Tachyzoiten erhöht war. Da im Immunfluoreszenztest und in der Durchflusszytometrie die Replikationsrate in Anwesenheit von MS-275 nicht gesteigert war, ist Aneuploidie als Ursache für den deutlich gesteigerten DNA-Gehalt der MS-275 behandelten RAW264.7 wahrscheinlich.

5.2.1 Einfluss immunsuppressiver Gene

Der Befund, dass zum Teil deutlich höhere Transkriptmengen IFN γ -regulierter Gene in infizierten Zellen nicht zu einer verbesserten Parasitenabwehr in Gegenwart von MS-275 führte, könnte auf die Induktion immunsuppressiver Gene zurückzuführen sein. HDAC-Inhibitoren beeinträchtigen die Abwehr bakterieller Infektionen und von *Candida albicans* in isolierten Makrophagen und im Mausmodell (Mombelli et al. 2011; Roger et al. 2011). Das immunmodulierende IL-10 wurde in Anwesenheit von HDAC-Inhibitoren vermindert exprimiert, sodass die gleichzeitig verminderte Expression und die verschlechterte Pathogenabwehr nicht auf die vermehrte Expression immunsuppressiver Zytokine zurückzuführen sei (Roger et al. 2011). Im Gegensatz dazu wies die High-Throughput RNA-Sequenzierung eine gesteigerte *il10*-Expression in Makrophagen/ Monozyten in Anwesenheit von MS-275 nach. Von *T. gondii* ist bekannt,

dass der Parasit die Expression von IL-10 induziert (Lang et al. 2006). Dies traf sowohl für die Mock- als auch für die MS-275 behandelten RAW264.7 zu. Insofern ist es möglich, dass *T. gondii* und MS-275 hier einen synergistischen Effekt entfalten und die vermehrte Expression von IL-10 in den Makrophagen/ Monozyten die Parasitenabwehr beeinträchtigt.

IL-4, das die zellvermittelte Immunität hemmt, wurde in infizierten RAW264.7 ebenfalls durch *T. gondii* induziert. MS-275 verstärkte die Expression in nicht infizierten Zellen deutlich, allerdings verursachte die gleichzeitige Infektion mit *T. gondii* hier keine Steigerung wie in den Mock-behandelten RAW264.7, sondern verminderte die *il4*-Expression in Gegenwart von MS-275 sogar leicht. Die Induktion durch den Parasiten ist also vermutlich nicht auf ein verändertes Chromatin-Remodelling zurückzuführen.

Das den IFN γ -Signalweg hemmende SOCS2 wurde in Anwesenheit von MS-275 deutlich vermehrt exprimiert, auch die Infektion mit *T. gondii* führte zu einer ca. 20-fachen Expressionssteigerung in Mock-behandelten Makrophagen/ Monozyten. Die höchste mRNA-Menge wurde in MS-275-behandelten, *Toxoplasma*-infizierten RAW264.7 nachgewiesen. Die größere SOCS2-Menge in diesen Zellen könnte also einer verbesserten Immunantwort gegen *T. gondii* entgegenstehen.

Da seit langem bekannt ist, dass TGF- β_1 durch *T. gondii* induziert werden kann (Bermudez et al. 1993), war auch für diese Arbeit der Einfluss des immunsuppressiven Zytokins von Interesse. In den RAW264.7 wurde *tgfb1* allerdings durch *T. gondii* nicht deutlich induziert. Eine mögliche Ursache ist, dass in den vorhergegangenen Studien andere *Toxoplasma*-Stämme benutzt wurden (Bermudez et al. 1993; Cekanaviciute et al. 2014). Eine mögliche Ursache ist außerdem der unterschiedliche Zelltyp. So könnten Astrozyten (Cekanaviciute et al. 2014) und peritoneale Makrophagen (Bermudez et al. 1993) anders auf eine *T. gondii*-Infektion reagieren als die hier verwendeten leukämoiden Makrophagen. Wang et al. (Wang et al. 2013) konnten nachweisen, dass sich sogar Makrophagen-Subpopulationen in ihrer basalen Zytokinexpression unterscheiden; peritoneale Makrophagen produzieren sehr viel weniger TGF- β als

Knochenmarksmakrophagen. Daher könnten Makrophagen-Subpopulationen und mehr noch unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Mengen an TGF- β nach *T. gondii*-Infektion produzieren. MS-275 hatte nur einen geringen Einfluss auf die *tgfb1*-Expression, allerdings führte es gerade in infizierten Monozyten/ Makrophagen zu höheren TGF- β 1-mRNA-Mengen. Die *tgfb3*-Expression war durch MS-275 kaum beeinflusst. In den MS-275-behandelten RAW264.7 scheint TGF- β als immunsuppressiver Faktor also eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Behandlung mit MS-275 führte bei den meisten immunsuppressiven Genen, ähnlich wie bei vielen sekundären Antwortgenen, zu einer gesteigerten Expression. Dies antagonisiert die teils deutliche Steigerung der IFN γ -Antwortgene und könnte damit einer effektiven Immunantwort gegen den Parasiten entgegenstehen.

5.2.2 Schlußfolgerungen zum Einfluss von MS-275 auf die Abwehrfähigkeit von RAW264.7 gegen *T. gondii*

Wie schon vorherige Untersuchungen mit anderen HDAC-Inhibitoren gezeigt haben (Roger et al. 2011), hatte MS-275 in der vorliegenden Studie sowohl Einfluss auf die Expressionsstärke bekannter immunsuppressiver als auch immunaktivierender Gene. Auf Seiten der immunsuppressiven Effekte sind insbesondere die verringerte *nos2*-Expression sowie die vermehrte Expression von *il4*, *il10* und *socs2* zu nennen. Auf Seiten der potenziell immunaktivierenden Effekte steht die höhere Expression vieler sekundärer IFN γ -Antwortgene durch die Behandlung mit MS-275. Hierbei sind vor allem die gesteigerte MHC-II-Präsentation auf der Zelloberfläche sowie die vermehrte Expression von *gpb4* und *gpb11* zu nennen. Des Weiteren wurde das primäre Antwortgen *irf2* vermindert exprimiert. Da IRF-2 mit IRF-1 um seine DNA-Bindestelle konkurriert, könnte sich die Hemmung von *irf2* immunaktivierend auswirken. Die Versuche zur Replikationsrate des Parasiten sowie der Infektionsdichte in *T. gondii*-infizierten RAW264.7-Kulturen zeigten, dass sich die beiden Effekte hinsichtlich der Fähigkeit von IFN γ -stimulierten RAW264.7 zur Eindämmung der *T. gondii*-Infektion in

vitro etwa die Waage halten. Es wurde also keine Verbesserung der Parasitenabwehr durch die Zugabe von MS-275 nachgewiesen.

5.3 Medikamentöser Einsatz von HDAC-Inhibitoren gegen *T. gondii*-Infektionen

HDAC-Inhibitoren werden bereits klinisch gegen Neoplasien eingesetzt, zuletzt wurde im August 2015 Panobinostat in Europa zur kombinierten Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen (European Medicines Agency 2015). Darüber hinaus wird der Einsatz von HDAC-Inhibitoren gegen weitere Krankheitsbilder diskutiert, darunter Infektions- und Autoimmunerkrankungen (Agbor-Enoh et al. 2009; Sumanadasa et al. 2012; Zhang und Schluesener 2012; McManamy et al. 2013).

MS-275 wurde unter dem Handelsnamen Entinostat in Kombination mit anderen Zytostatika gegen Tumore und Leukämien in verschiedenen klinischen Studien getestet (Ryan et al. 2005; Gojo et al. 2006; Gore et al. 2008; Witta et al. 2012; Prebet et al. 2014). In den Phase-II-Studien wurde jedoch keine Verbesserung des Therapieerfolgs durch MS-275 beobachtet (Witta et al. 2012; Prebet et al. 2014). MS-275 führte in einer vorangegangenen in vitro-Studie zur Wiederherstellung der IFN γ -induzierten MHC-II-Expression in *T. gondii*-infizierten Makrophagen (Lang et al. 2012). Von den Autoren wurde daher die Erforschung einer therapeutischen Nutzung angeregt (Lang et al. 2012). Aufgrund dessen untersuchten wir, ob die verbesserte MHC-II-Expression auch zu einer verbesserten Abwehrfähigkeit der Monozyten/ Makrophagen führte.

Bei der Bewertung der Studienergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine in-vitro-Studie handelt, die auf einen einzelnen, wenn auch zentralen Akteur der Parasitenabwehr während der Toxoplasmose fokussierte. In vivo könnte dagegen beispielsweise der positive Effekt von MS-275 auf die IFN γ -induzierte Expression sekundärer Antwortgene zwar nicht direkt die Parasiteneradikation in Makrophagen

verbessern, aber durch verstärkte MHC-Expression von Antigen-präsentierenden Zellen zu einer vermehrten Aktivierung von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen führen. Diese könnten in *Toxoplasma*-infizierten Zellen entweder effizienter einen apoptotischen Zelltod auslösen oder zu einer vermehrten Sekretion immunstimulierender Zytokine wie IFN γ anregen. Außerdem verstärken HDAC-Inhibitoren den sonst nur mäßig proapoptotischen Effekt von IFN γ auf infizierte Säugetierzellen (Klampfer 2004), was die Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen ebenfalls unterstützen könnte. Des Weiteren muss ein Effekt von MS-275 auf den Parasiten selbst in Betracht gezogen werden. HDAC-Inhibitoren verbesserten im Mausmodell das Überleben der mit *Plasmodium berghei* infizierten Tiere, gleichzeitig wurde eine sehr viel stärkere Hemmung der parasitären HDACs als der HDACs der Wirtszelle nachgewiesen (Agbor-Enoh et al. 2009). Auch gegen *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, konnte ein in vitro-Effekt erzielt werden (Agbor-Enoh et al. 2009; Sumanadasa et al. 2012). Da Plasmodien phylogenetisch mit Toxoplasmen eng verwandt sind, ist eine ähnliche Wirkung möglich. Allerdings berichteten Lang et al. (Lang et al. 2012), dass MS-275 keinen signifikanten Effekt auf die Replikationsfähigkeit von *T. gondii* in RAW264.7 hatte.

Die Herausforderung vor einem potentiellen medikamentösen Einsatz von HDAC-Inhibitoren wird es sein, die bisher getrennt betrachteten Effekte bei der Hemmung von Säugetier- und parasitären Histondeactylasen gemeinsam zu berücksichtigen. Durch die Entwicklung von spezifischen HDAC-Inhibitoren könnte es so auf der einen Seite gelingen, den Parasiten selber zu schädigen und auf der anderen Seite die Immunantwort des Wirts zu verbessern. Hierbei werden insbesondere auch pharmakologische Aspekte wie Membrangängigkeit und Akkumulation der HDAC-Inhibitoren am Wirkort von Relevanz sein.

Für die Beurteilung, wie geeignet HDAC-Inhibitoren für die supportive oder alleinige Behandlung der Toxoplasmose sein können, ist wichtig zu berücksichtigen, dass die Therapie der akuten Toxoplasmose vor allem bestimmte Patientengruppen betrifft. Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren bei Immunsupprimierten zur Behandlung der

reaktivierten Toxoplasmose wäre vor allem nach Entwicklung von Inhibitoren erfolgsversprechend, die spezifisch immunaktivierend und kaum oder gar nicht immunsuppressiv wirken. Der Einsatz bei schwangeren Patientinnen und Ungeborenen ist dagegen deutlich problematischer. Aufgrund der zentralen Funktion der HDACs bei der Steuerung der Genexpression könnten Störungen der embryonalen Entwicklung die Folge sein. Das Antikonvulsivum Valproinsäure verursacht Vorhof- und Septumdefekte während der Herzentwicklung. Diese Nebenwirkungen werden auf die Hemmung von HDACs durch Valproinsäure zurückgeführt (Wu et al. 2010). Zudem führt die Behandlung mit Valproinsäure zu einer erhöhten Sterblichkeit von Mausembryonen (Wu et al. 2010). Die bereits erwähnte Antagonisierung der physiologischen Unterdrückung der IFN γ -Antwort in Trophoblasten der murinen Plazenta durch HDAC-Inhibitoren wird hingegen vermutlich nicht von Relevanz sein, da die IFN γ -Responsivität in humanen Trophoblasten anders als in murinen Trophoblasten über Protein-Tyrosin-Phosphatasen und nicht über Histondeacetylierung reguliert wird (Choi et al. 2009). Für MS-275, Natriumbutyrat und Apicidin wurden außerdem schwerwiegende Schädigungen der Entwicklung des axialen Skeletts in Mausembryonen nachgewiesen. Ihre Ursache liegt in der Hyperacetylierung der Core-Histone der Somiten, womit eine Störung der Somitenseparation einhergeht (Di Renzo et al. 2007). Insgesamt erscheint daher der Einsatz von HDAC-Inhibitoren zur Behandlung konnataler Infektionen nicht realistisch zu sein.

Der klinische Einsatz von HDAC-Inhibitoren zur Behandlung der Toxoplasmose ist derzeit noch nicht ausgereift. Erstens sprechen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse dafür, dass sich die immunaktivierenden und immunsupprimierenden Effekte von MS-275 zumindest in murinen Makrophagen/ Monozyten gegenseitig ausgleichen, sodass MS-275 in-vitro nicht zu einer verbesserten Parasitenabwehr führt. Zweitens führen HDAC-Inhibitoren zu embryonalen Fehlbildungen, was den Einsatz bei konnatalen Infektionen stark einschränkt. Eine Perspektive für den medikamentösen Einsatz könnte die Entwicklung von HDAC-Inhibitoren sein, die einerseits hemmend auf die Parasitenentwicklung wirken und andererseits immunaktivierend auf die Wirtszelle wirken.

6 Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein weltweit verbreiteter intrazellulärer Parasit aus der Gruppe der Apikomplexa, der nahezu alle Säugetiere, inklusive des Menschen, und Vögel als Zwischenwirt nutzen kann. Zur sexuellen Replikation ist *T. gondii* jedoch auf feline Enterozyten angewiesen. Die in Europa dominierenden Haplotypen verursachen in Immungesunden meist nur milde, unspezifische Symptome und die akute Infektion geht in eine chronische, asymptomatische Infektion über. Bei Erstinfektion in der Schwangerschaft kann sich eine konnatale Toxoplasmose entwickeln, die bis zum Tod des Fetus führen kann. Des Weiteren sind Immunsupprimierte durch Neuinfektionen oder Reaktivierung einer bestehenden chronischen Infektion gefährdet. Die schnelle intrazelluläre Replikation der Tachyzoiten führt während der akuten Infektion zur Lyse der Wirtszelle und ist damit für die potentiell lebensbedrohlichen Gewebsschäden in Patienten mit verminderter zellulärer Immunreaktion verantwortlich. Der Übergang in eine chronische Infektion ist durch den Stadienwechsel des Parasiten in Bradyzoiten mit niedriger Stoffwechselaktivität und Zystenbildung gekennzeichnet. In diesem Zustand persistiert der Parasit im Wirt lebenslang. Hierfür nutzt *T. gondii* immunprivilegierte Kompartimente wie Hirn und Skelettmuskulatur. Zur Etablierung einer persistenten Infektion ist ein Gleichgewicht zwischen immunsupprimierenden Mechanismen des Parasiten und Immunantwort des Wirts notwendig, wodurch die Eradikation des Parasiten verhindert wird, ohne den Wirt in seiner Vitalität zu beeinträchtigen. *Toxoplasma gondii* induziert zum einen die immunmodulierenden Zytokine IL-10 und TGF β und hemmt zum anderen die Transkription der durch IFN γ regulierten proinflammatorischen Proteine. Einer der zugrundeliegenden potentiellen Mechanismen zur Hemmung der IFN γ -Antwort ist die Interaktion mit dem Chromatin-Remodelling der Wirtszelle. Für die Promotoren von *ciita*, *h2e β* und *gpb2* wurde eine reduzierte Histonacetylierung in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen nachgewiesen. Lang et al. (Lang et al. 2012) wiesen außerdem nach, dass Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren die IFN γ -regulierte Expression der sekundären IFN γ -Antwortgene *ciita* und *h2a β* wiederherstellen kann.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit HDAC-Inhibitoren weitere primär und sekundär durch IFN γ regulierte Gene in *T. gondii*-infizierten und nicht infizierten Monozyten/ Makrophagen regulieren können. Darüber hinaus wurde geprüft, ob eine verbesserte IFN γ -Antwort auch mit einer verbesserten Kontrolle der parasitären Vermehrung in Monozyten/ Makrophagen einhergeht. Zum Vergleich der Expression von sekundären und primären Antwortgenen in Anwesenheit und Abwesenheit des HDAC-Inhibitors MS-275 in *T. gondii*-infizierten IFN γ -stimulierten murinen Monozyten/ Makrophagen wurde eine genomweite High-Throughput-RNA-Analyse sowie RT-qPCRs für die primären Antwortgene *irf1*, *irf8* und das sekundäre Antwortgen *ciita* durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass MS-275 die Transkriptmengen einer Reihe von primären und der Mehrzahl von sekundären IFN γ -Antwortgenen unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii* erhöht. Jedoch wurde die relative *T. gondii*-vermittelte Hemmung der IFN γ -regulierten Genexpression der meisten primären und sekundären Antwortgene durch MS-275 nicht deutlich verändert. Somit ist anzunehmen, dass *T. gondii* die IFN γ -Antwort nicht genomweit durch die Manipulation von HDACs hemmt. Aufgrund der dennoch insgesamt höheren Transkriptmengen wurde geprüft, ob HDAC-Inhibitoren die Parasitenentwicklung in *T. gondii*-infizierten Monozyten/ Makrophagen beeinflussen. Als Maß für die Abwehrfähigkeit der Makrophagen wurden die Replikationsrate sowie der Anteil *T. gondii*-infizierter Zellen in der Gesamtpopulation gemessen. Die Replikationsrate wurde auf Populationsebene mittels qPCR bestimmt, indem das parasitäre 529-bp-Fragment amplifiziert und quantifiziert wurde. Der Anteil infizierter Monozyten/ Makrophagen wurde durchflusszytometrisch mithilfe eines GFP-exprimierenden *T. gondii*-Stamms bestimmt. Im Immunfluoreszenztest wurden zusätzlich die intrazelluläre Replikation und die parasitäre Invasionsfähigkeit beurteilt. In allen Experimenten wurde keine deutliche Verbesserung der Parasitenabwehr in Anwesenheit der HDAC-Inhibitoren MS-275 oder Natriumbutyrat gemessen. Dies korrelierte mit der Beobachtung auf transkriptioneller Ebene, dass nicht nur immunaktivierende IFN γ -Antwortgene in Anwesenheit von MS-275 vermehrt exprimiert wurden, sondern auch immunmodulierende Gene wie *il10*, *il4* und *socs2*.

Daher muss davon ausgegangen werden, dass sich die immunaktivierenden und immunsupprimierenden Effekte von MS-275 in *T. gondii*-infizierten murinen Monozyten/ Makrophagen die Waage halten. Insofern ist die von Lang et al. (Lang et al. 2012) angeregte medikamentöse Nutzung von HDAC-Inhibitoren gegen die Toxoplasmose als wenig erfolgsversprechend anzusehen.

7 Literaturverzeichnis

- Abdoli A, Dalimi A (2014): Are There any Relationships between Latent *Toxoplasma gondii* Infection, Testosterone Elevation, and Risk of Autism Spectrum Disorder? *Front Behav Neurosci* 8, 1–6
- Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D (2001): Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 33, 1747–1755
- Agbor-Enoh S, Seudieu C, Davidson E, Dritschilo a., Jung M (2009): Novel inhibitor of *Plasmodium* histone deacetylase that cures *P. berghei*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1727–1734
- Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières M-H, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé M-L (2002): Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186, 684–689
- Antunes F, Marg A, Vinkemeier U (2011): STAT1 signaling is not regulated by a phosphorylation-acetylation switch. *Mol Cell Biol* 31, 3029–3037
- Bermudez LE, Covaro G, Remington J (1993): Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect Immun* 61, 4126–4130
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749–795

- Boehm U, Guethlein L, Klamp T, Ozbek K, Schaub a, Fütterer a, Pfeffer K, Howard JC (1998): Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161, 6715–6723
- Bohne W, Holpert M, Gross U (1999): Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 201, 248–254
- Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, Barale J-C, Pelloux H, Ménard R, Hakimi M-A (2009): Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med* 206, 953–966
- Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM (2000): Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* 350 Pt 1, 199–205
- Butcher B, Kim L, Panopoulos AD, Watowich SS, Murray PJ, Denkers EY (2005): IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* 174, 3148–3152
- Cai Q, Banerjee S, Cervini A, Lu J, Hislop AD, Dzung R, Robertson ES (2013): IRF-4-Mediated CIITA Transcription Is Blocked by KSHV Encoded LANA to Inhibit MHC II Presentation. *PLoS Pathog* 9, e1003751
- Cekanaviciute E, Dietrich HK, Axtell RC, Williams AM, Egusquiza R, Wai KM, Koshy A a, Buckwalter MS (2014): Astrocytic TGF- β signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system *Toxoplasma* infection. *J Immunol* 193, 139–49
- Choi JC, Holtz R, Murphy SP (2009): Histone deacetylases inhibit IFN-gamma-inducible gene expression in mouse trophoblast cells. *J Immunol* 182, 6307–6315
- Degrandi D, Kravets E, Konermann C, Beuter-Gunia C, Klümpers V, Lahme S, Wischmann E, Mausberg AK, Beer-Hammer S, Pfeffer K (2013): Murine guanylate

- binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 294–9
- Derouin F, Pelloux H (2008): Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect* 14, 1089–1101
- Długońska H (2014): Review articles *Toxoplasma gondii* and the host cells 1. *Ann Parasitol* 60, 83–88
- Dubey JP, Frenkel JK (1972): Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* 19, 155–177
- Eikermann M, Thomas S, Lipperheide K, Gehms M, Grünhagen E, Kühbauch M (2012): Toxoplasmose-Test bei Schwangeren. *IGeL-Monitor* 1–15
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (2014): Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9
- Gauzzi MC, Purificato C, Conti L, Adorini L, Belardelli F, Gessani S (2005): IRF-4 expression in the human myeloid lineage: up-regulation during dendritic cell differentiation and inhibition by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Leukoc Biol* 77, 944–947
- Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, Masters J, Parker SP, Stanford MR (1999): Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 123, 283–289
- Gilsdorf A: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. Band 34; Robert Koch-Institut, Berlin 2014
- Gilsdorf A: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Band 34; Robert Koch-Institut, Berlin 2015

- Gojo I, Jiemjit A, Trepel JB, Sparreboom A, Figg WD, Rollins S, Tidwell ML, Greer J, Chung EJ, Lee M-J, et al. (2006): Phase 1 and pharmacological study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias. *Blood* 109, 2781-2790
- Gore L, Rothenberg ML, O'Bryant CL, Schultz MK, Sandler AB, Coffin D, McCoy C, Schott A, Scholz C, Eckhardt SG (2008): A Phase I and Pharmacokinetic Study of the Oral Histone Deacetylase Inhibitor, MS-275, in Patients with Refractory Solid Tumors and Lymphomas. *Clin Cancer Res* 14, 4517–4525
- Groß U: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006
- Groß U (2012): Presseerklärung IGeL-Monitor und Toxoplasrose-Test in der Schwangerschaft. 04.2012, 1–4
- Gross U, Muller W a., Knapp S, Heesemann J (1991): Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect Immun* 59, 4511–4516
- Gross U, Bohne W, Soête M, Dubremetz JF (1996): Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 12, 30–33
- Henry SC, Traver M, Daniell X, Indaram M, Oliver T, Taylor G a (2010): Regulation of macrophage motility by *Irgm1*. *J Leukoc Biol* 87, 333–343
- Hill D, Dubey JP (2002): *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8, 634–640
- Hotop A, Hlobil H, Groß U (2012): Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 54, 1545–1552

-
- Huang B, Qi ZT, Xu Z, Nie P (2010): Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunol* 11, 22
- Hunn JP, Feng CG, Sher A, Howard JC (2011): The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome* 22, 43–54
- Hunter C A., Sibley LD (2012): Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10, 766–778
- Jones J, Lopez A, Wilson M (2003): Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician* 67, 2131–2138+2145
- Khaminets A, Hunn JP, Könen-Waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J, Boyle JP, Ong YC, Boothroyd JC, Reichmann G, Howard JC (2010): Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* 12, 939–961
- Kim S-K, Fouts AE, Boothroyd JC (2007): *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol* 178, 5154–5165
- Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L (2003): Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res* 1, 855–862
- Klampfer L, Huang J, Swaby LA, Augenlicht L (2004): Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *J Biol Chem* 279, 30358–30368
- Konsoula Z, Velená A, Lee R, Dritschilo A, Jung M (2011): Histone Deacetylase Inhibitor: Antineoplastic Agent and Radiation Modulator; *Adv Exp Med Biol* 720, 171–179

- Kota RS, Rutledge JC, Gohil K, Kumar A, Enelow RI, Ramana C V. (2006): Regulation of gene expression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1137–1146
- Krämer OH, Knauer SK, Greiner G, Jandt E, Reichardt S, Göhrs KH, Stauber RH, Böhmer FD, Heinzel T (2008): A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 23, 223–235
- Kuwata T, Gongora C, Kanno Y, Sakaguchi K, Tamura T, Kanno T, Basrur V, Martinez R, Appella E, Golub T, Ozato K (2002): Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* 22, 7439–7448
- Lang C, Groß U, Lüder CGK (2006): Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma Gondii*. *Parasitol Res* 100, 191–203
- Lang C, Hildebrandt A, Brand F, Opitz L, Dihazi H, Lüder CGK (2012): Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-infected macrophages to IFN- γ . *PLoS Pathog* 8, e1002483
- Leng J, Butcher BA, Egan CE, Abdallah DSA, Denkers EY (2009): *Toxoplasma gondii* Prevents Chromatin Remodeling Initiated by TLR-Triggered Macrophage Activation. *J Immunol* 27, 489–497
- 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 STAT1 α . *Eur J Immunol* 31, 1475–1484
- Lüder CGK, Aligner 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

- Luft BJ, Remington JS (1992): Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211–222
- McManamy MEM, Hakre S, Verdin EM, Margolis DM (2013): Therapy for latent HIV-1 infection: the role of histone deacetylase inhibitors. *Antivir Chem Chemother* 23, 145–149
- Miner KT, Croft M (1998): Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 160, 5280–5287
- Mohana Kumar B, Song H-J, Cho S-K, Balasubramanian S, Choe S-Y, Rho G-J (2007): Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts. *J Reprod Dev* 53, 903–913
- Mombelli M, Lugin J, Rubino I, Chanson AL, Giddey M, Calandra T, Roger T (2011): Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages. *J Infect Dis* 204, 1367–1374
- Montenarh M: Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA; in: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemi.* 8. Auflage; Springer-Verlag, Heidelberg 2007, 289–298
- Muhlethaler-Mottet A, Bernardino W Di (1998): Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8, 157–166
- Novak ML, Koh TJ (2013): Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93, 875–881
- Paun A, Pitha PM (2007): The IRF family, revisited. *Biochimie* 89, 744–753
- Prebet T, Sun Z, Figueroa ME, Ketterling R, Melnick A, Greenberg PL, Herman J, Juckett M, Wang ES, Smith MR, et al. (2014): Prolonged administration of azacitidine with

- or without entinostat for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes: Results of the US Leukemia intergroup trial E1905. *J Clin Oncol* 32, 1242–1248
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978): Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261–267
- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa J-M (2003): Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3, 7
- Di Renzo F, Broccia ML, Giavini E, Menegola E (2007): Relationship between embryonic histone hyperacetylation and axial skeletal defects in mouse exposed to the three HDAC inhibitors apicidin, MS-275, and sodium butyrate. *Toxicol Sci* 98, 582–588
- Roger T, Lugrin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, Ding XC, Chanson A-L, Reymond MK, Miconnet I, et al. (2011): Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205–1217
- Rosowski EE, Nguyen QP, Camejo A, Spooner E, Saeija JPJ (2014): *Toxoplasma gondii* inhibits gamma interferon (IFN- γ)- and IFN- β -induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. *Infect Immun* 82, 706–719
- Ryan QC, Headlee D, Acharya M, Sparreboom A, Trepel JB, Ye J, Figg WD, Hwang K, Chung EJ, Murgo A, et al. (2005): Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *J Clin Oncol* 23, 3912–3922
- Schröter H, Gómez-Lira MM, Plank KH, Bode J (1981): The extent of histone acetylation induced by butyrate and the turnover of acetyl groups depend on the nature of the cell line. *Eur J Biochem* 120, 21–28

- Steinfeldt T, Könen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD, Hunn JP, Howard JC (2010): Phosphorylation of mouse immunity-related gtpase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* 8, e1000576
- Subramanian S, Bates SE, Wright JJ, Espinoza-Delgado I, Piekarz RL (2010): Clinical toxicities of histone deacetylase inhibitors. *Pharmaceuticals* 3, 2751–2767
- Sumanadasa SDM, Goodman CD, Lucke AJ, Skinner-Adams T, Saham I, Haque A, Do TA, McFadden GI, Fairlie DP, Andrews KT (2012): Antimalarial activity of the anticancer histone deacetylase inhibitor SB939. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3849–3856
- Travis MA, Sheppard D (2014): TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 51–82
- Trengove MC, Ward AC (2013): SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol* 2, 1–29
- Villagra A, Sotomayor EM, Seto E (2010): Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. *Oncogene* 29, 157–173
- Wagner FF, Weïwer M, Lewis MC, Holson EB (2013): Small molecule inhibitors of zinc-dependent histone deacetylases. *Neurotherapeutics* 10, 589–604
- Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, Zhao H, Zhao Y, Wang Y, Harris DC (2013): Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol* 14, 6
- Wang Y, Gao B, Xu W, Xiong S (2011): BRG1 is indispensable for IFN- γ -induced TRIM22 expression, which is dependent on the recruitment of IRF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 549–554
- Wenk P, Renz A: Parasitologie. 6. Auflage; Thieme, Stuttgart 2003

- Wightman F, Lu HK, Solomon AE, Saleh S, Harman AN, Cunningham AL, Gray L, Churchill M, Cameron PU, Dear AE, Lewin SR (2013): Entinostat is a histone deacetylase inhibitor selective for class 1 histone deacetylases and activates HIV production from latently infected primary T cells. *AIDS* 27, 2853–2862
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I (2009): HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 277, 8–21
- Witta SE, Jotte RM, Konduri K, Neubauer M a, Spira AI, Ruxer RL, Varella-Garcia M, Bunn P a, Hirsch FR (2012): Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *J Clin Oncol* 30, 2248–55
- Wu G, Nan C, Rollo JC, Huang X, Tian J (2010): Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase. *J Biomed Sci* 17, 16
- Wujcicka W, Wilczyński J, Nowakowska D (2014): Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various *Toxoplasma gondii* genotypes in pregnant women? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 703–709
- Yu X, Wei B, Dai Y, Zhang M, Wu J, Xu X, Jiang G, Zheng S, Zhou L (2014): Genetic Polymorphism of Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) Correlates with Allograft Acute Rejection of Liver Transplantation. *PLoS One* 9
- Zhang ZY, Schluesener HJ (2012): HDAC inhibitor MS-275 attenuates the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune prostatitis. *Prostate* 72, 90–99
- Zhao YO, Khaminets A, Hunn JP, Howard JC (2009): Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog* 5, e1000288

Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH (2006): Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* 176, 1840–1847

Internetquellen

European Medicines Agency: Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit: Farydak
- Panobinostat, 2015,
http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003725/WC500193301.pdf [27.12.2015]

o.Hrsg.: Sodium butyrate (ab120948), abcam.com, 2015,
<http://www.abcam.com/sodium-butyrate-ab120948.html> [25.08.2015]

Seedat J: Toxoplasmose RKI-Ratgeber für Ärzte, *Epidemiologischen Bulletin* 40/2007, 2009,
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html [14.08.2015]

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> und Infektion des Menschen	3
Abbildung 2 Darstellung der I-A/I-E-Expression in RAW264.7 mittels Durchflusszytometrie.....	49
Abbildung 3 Expression des sekundären Antwortgens <i>ciita</i> und der primären Antwortgene <i>irf1</i> und <i>irf8</i>	53
Abbildung 4 Einfluss von IFN γ , <i>T. gondii</i> und MS-275 auf die Genexpression von murinen Monozyten/ Makrophagen.....	55
Abbildung 5A Vergleich der 50 am stärksten durch MS-275 regulierten Gene in IFN γ -stimulierten nicht infizierten und <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7	56
Abbildung 5B Biologische Prozesse, die in IFN γ -stimulierten nicht infizierten und infizierten RAW264.7 durch MS-275 im Vergleich zu den jeweiligen Mock-behandelten, IFN γ -stimulierten Zellen überdurchschnittlich stark beeinflusst wurden	57
Abbildung 6 Toxoplasma-vermittelte Regulation primärer IFN γ -Antwortgene in Mock- und MS-275-behandelten RAW264.7.....	63
Abbildung 7 Toxoplasma-vermittelte Regulation sekundärer IFN γ -Antwortgene in Mock- und MS-275-behandelten RAW264.7.....	69

Abbildung 8 MS-275-vermittelte Regulation immunsupprimierender Gene in nicht infizierten und <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7	74
Abbildung 9 Anteil Toxoplasma-infizierter RAW264.7 nach Behandlung mit MS-275 und Stimulation mit IFN γ	76
Abbildung 10 Nachweis des 529bp-DNA-Fragmentes von <i>T. gondii</i> in infizierten RAW264.7-Kulturen in An- und Abwesenheit von MS-275.....	78
Abbildung 11 Intrazelluläre Replikationsrate von <i>T. gondii</i> in Monozyten/ Makrophagen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation mit IFN γ und/oder LPS	80
Abbildung 12 Anteil infizierter Zellen in <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7-Kulturen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Stimulation mit IFN γ und/oder LPS.....	81
Abbildung 13 Immunfluoreszenzfärbung von <i>T. gondii</i> -infizierten Monozyten/ Makrophagen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und Aktivierung mit IFN γ und/oder LPS.	82

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die durch MS-275 regulierten biologischen Prozesse in nicht infizierten und <i>T. gondii</i> -infizierten RAW264.7	58
Tabelle 2 Expression primärer IFN γ -Antwortgene unter Einfluss von MS-275 in stimulierten infizierten und nicht infizierten RAW264.7.....	59
Tabelle 3 Expression sekundärer IFN γ -Antwortgene unter Einfluss von MS-275 in stimulierten infizierten und nicht infizierten RAW264.7.....	65
Tabelle 4 Expression immunsuppressiver Gene unter Einfluss von MS-275 in stimulierten infizierten und nicht infizierten RAW264.7.....	70