

## **4 DISKUSSION**

Als Anpassung an seinen intrazellulären Lebensraum hat *T. gondii* verschiedene Strategien entwickelt, physiologische Eigenschaften seiner Wirtszelle bzw. die Immunantwort seines Wirtes zu beeinflussen. So ist die Invasion in die Wirtszelle ein aktiver Prozess des Parasiten und keine von der Wirtszelle ausgehende Phagozytose (Dobrowolski und Sibley, 1996; Dubremetz, 1998). Die den Parasiten enthaltende intrazelluläre parasitophore Vakuole säuert sich nicht an (Sibley et al., 1985) und fusioniert nicht mit Lysosomen und Endosomen (Joiner et al., 1990), was eine intrazelluläre Zerstörung des Parasiten verhindert. Darüber hinaus sind verschiedene Mechanismen zur Evasion der Immunantwort des Wirtes für *T. gondii* beschrieben worden. So wird die Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen herunterreguliert (Lüder et al., 1998), und die Parasiten-induzierte Produktion von immunmodulierenden Cytokinen, wie Interleukin 10 (IL-10) (Khan et al, 1995), Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) (Bermudez et al., 1993) und Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) (Channon und Kasper, 1996) trägt zur Herunterregulation einer effektiven Immunantwort bei. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Veränderungen des programmierten Zelltodes nach Infektion mit *T. gondii* ein weiteres Beispiel der komplexen Anpassungsstrategien zwischen dem Parasiten und seiner Wirtszelle untersucht. Die Arbeiten zeigen, dass *T. gondii* die *in vitro*-induzierte Apoptose verschiedener humaner Wirtszelllinien inhibiert, ein Mechanismus, der zum intrazellulären Überleben und zur Persistenz der Parasiten beitragen könnte.

### **4.1 Die Beeinflussung der Wirtszellapoptose**

Die Wirtszellapoptose kann durch intrazelluläre Erreger entweder induziert oder inhibiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte bei verschiedenen Wirtszelllinien keine Apoptoseinduktion durch *T. gondii*-Tachyzoiten des maus-avirulenten Stammes NTE und des maus-virulenten Stammes RH beobachtet werden. Eine Induktion von Apoptose kann bei der Disseminierung des Pathogens eine wichtige Rolle spielen, indem z.B. in Makrophagen residierende Erreger in infizierten

Wirtszellen Apoptose auslösen, worauf die Erreger enthaltenden apoptotischen Vesikel von anderen Makrophagen phagozytiert werden und das Pathogen so in seine neue Wirtszelle gelangt (Müller et al., 1996). Da *T. gondii* praktisch jede Zelle aktiv invadieren kann (Dobrowolski und Sibley, 1996), dürfte die Wirtszellapoptose für seine Disseminierung keine Rolle spielen. Im Gegensatz zu unserem Ergebnis haben Hisaeda et al. (1997) beschrieben, dass *T. gondii* stammspezifisch Apoptose induzieren kann. In Makrophagen von infizierten Mäusen wurde dort eine Induktion von Apoptose nur nach Infektion mit dem RH-Stamm beschrieben, nicht jedoch nach Infektion mit dem maus-avirulenten Beverly-Stamm. Diese Unterschiede in der Apoptoseinduktion waren allerdings von der Anwesenheit von  $\gamma\delta$ T-Zellen abhängig, die in unserem Zellkultursystem nicht vorhanden waren. Auch Khan et al. (1996) haben eine Apoptoseinduktion durch *T. gondii* beschrieben, hier in CD4<sup>+</sup> Zellen aus infizierten Mäusen. Da diese Zellen genauso wie die Makrophagen im Immunsystem eine wichtige Rolle spielen, kann eine Apoptoseinduktion für den Parasiten bei der Umgehung der Immunantwort von Vorteil sein. Allerdings wurde in den Studien nicht untersucht, ob die von der Apoptoseinduktion betroffenen Zellen parasit-positiv waren, also Parasiten direkt der Wirtszellapoptose ausgesetzt waren. Anders als in den bisherigen Studien wurden in unserem System zum ersten Mal verschiedene humane Zelllinien untersucht. Wir konnten zeigen, dass *T. gondii* in den infizierten humanen Zellen unabhängig vom Parasitenstamm keine Apoptose induziert.

Von verschiedenen Erregern ist bekannt, dass sie Wirtszellapoptose inhibieren können, z.B. das Epstein-Barr Virus (Henderson et al., 1991), *Chlamydia trachomatis* (Fan et al., 1998) und *Leishmania donovani* (Moore und Matlashewski, 1994). Um nun zu überprüfen, ob *T. gondii* ebenfalls die Wirtszellapoptose inhibieren kann, musste zunächst Apoptose in Wirtszelllinien induziert werden. Dabei ist für ein geeignetes Zellkultursystem eine wichtige Voraussetzung, dass Apoptose leicht induzierbar ist und gleichzeitig nur eine niedrige Nekroserate auftritt. Als besonders geeignetes System erwiesen sich zum einen humane promyelozytische HL-60-Zellen, bei denen Apoptose durch die Inhibierung der RNS-Synthese mit Actinomycin D (ActD) und somit auch durch Inhibierung der Neusynthese von Proteinen ausgelöst wurde (Martin et al. 1990). Zum anderen waren U937-Zellen, bei denen die Kombination aus TNF- $\alpha$ - und Cycloheximid (CHX)-Behandlung Apoptose induzierte (Fan et al., 1998), als Testmodell geeignet. TNF- $\alpha$  stellt ein physiologisches Signal

der Apoptoseinduktion dar, wobei TNF- $\alpha$  an den TNF-Rezeptor I bindet. Dieser aktiviert über Caspase 8 (Yuan, 1997) entweder direkt oder über den mitochondrialen Apoptoseweg die Caspase-Kaskade (Kuwana et al., 1998). Beide Zellmodelle repräsentieren also offensichtlich unterschiedliche Wege der Apoptoseinduktion in humanen Zellen.

Zunächst konnte mit dem DNS-Fragmentationstest auf Populationsebene gezeigt werden, dass in den *in vitro*-Systemen die induzierte Wirtszellapoptose durch *T. gondii* deutlich inhibiert wird. Quantitative Analysen von HL-60-Zellen durch Hoechst-Färbung ergaben je nach ActD-Dosis eine Parasiten-induzierte Inhibierung der Wirtszellapoptose um 30 bis 63%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Nash et al. (1998), die in unterschiedlichen murinen Zellkulturen nach Infektion mit *T. gondii* eine Resistenz gegenüber verschiedenen Apoptoseinduktoren wie Gamma- und UV-Bestrahlung, IL-2-Entzug, Inhibierung der RNS-Synthese sowie Calcium-Ionophoren nachwiesen. Zudem war *T. gondii* in der Lage, die Apoptoseinduktion durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche über Granzyme und Perforin sowie den Fas-Liganden Apoptose auslösen können, zu inhibieren. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Doppelimmunfluoreszenz-Färbung sowohl der apoptotischen Zellen als auch der Parasiten gezeigt werden, dass parasit-positive humane Zellen signifikant vor der mit ActD-induzierten Apoptose geschützt waren, während parasit-negative Zellen der gleichen Kultur nur einen sehr leichten Rückgang in der Apoptoserate zeigten. *T. gondii* ist durch die obligat intrazelluläre Lebensweise in besonderem Maße von der Integrität seiner Wirtszelle abhängig. Dieses gilt für die akute Phase der Infektion, in der die schnell replizierenden Tachyzoiten in Wirtszellen eindringen und diese nach mehreren Teilungszyklen lysieren. Eine vorzeitige Zerstörung der Wirtszelle könnte für die Replikation des Parasiten hinderlich sein.

Ein anderer intrazellulärer Parasit, für den eine Inhibierung der Wirtszellapoptose beschrieben wurde, ist *Leishmania donovani* (Moore und Matlashewski, 1994). Dort konnte eine Verminderung der durch Entzug von Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (M-CSF) ausgelösten Apoptose gezeigt werden, die sich auch auf nicht-infizierte Zellen bezog. Es wird angenommen, dass die Verbreitung von *L. donovani* dadurch vereinfacht wird, dass aufgrund der

Apoptoseinhibierung von Makrophagen diese als Wirtszellen vermehrt für den Erreger zur Verfügung stehen und diese vermehrt durch die die Leishmanien übertragende Sandfliege aufgenommen werden können.

Die Integrität der Wirtszelle dürfte ebenfalls während der chronischen Phase der Infektion von grosser Bedeutung für den Parasiten sein. Durch die Hybridstruktur der Zystenwand aus parasitären und wirtszelleigenen Proteinen sind die Bradyzoiten vermutlich vor Entzündungsreaktionen in der Zystenumgebung geschützt (Groß, 1994). Sie persistieren hauptsächlich in Neuronen des ZNS (Ferguson und Hutchinson, 1987), die nur unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei einer Alzheimererkrankung oder Sauerstoffmangel nach einem Schlaganfall, Apoptose zeigen (Barinaga, 1998b). Es ist allerdings auch denkbar, dass eine Infektion von Neuronen mit *T. gondii* eine pathologische Veränderung für die Wirtszelle darstellt und somit Apoptose auslösen kann, womit die Persistenz des Erregers gefährdet sein könnte. Außer im ZNS persistiert *T. gondii* auch in anderen Organen, wie z.B. Muskelgewebe, Knochenmark und Leber (Britt et al., 1981; Israelski und Remington, 1993a). Da insbesondere in diesen Organen die Apoptose schon während des normalen Zellumsatzes auftreten kann, würde sie eine Gefahr für die langfristige Persistenz von *T. gondii* darstellen.

Zur Apoptoseinhibierung *in vivo* durch *T. gondii* ist bisher wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* im Mausmodell die Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins A1 in peritonealen Makrophagen induziert und gleichzeitig die Gesamtzahl der im Peritoneum vorhandenen Zellen steigt (Orlofsky et al., 1999). Die verstärkte Expression von A1 in den Peritonealmakrophagen war zwar von der Infektionsdosis, jedoch nicht von dem intrazellulären Vorkommen des Parasiten abhängig. In unserer Studie konnte *in vitro* gezeigt werden, dass intrazelluläre *T. gondii* die induzierte Apoptose humaner Wirtszellen inhibieren können. Weitere Versuche *in vivo* müssen genaueren Aufschluss über die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus' geben.

## 4.2 Voraussetzungen seitens des Parasiten zur Inhibierung der Wirtszellapoptose

Um erste Hinweise über mögliche Mechanismen der Apoptose-Inhibierung durch *T. gondii* zu erhalten, wurden zunächst die physiologischen Voraussetzungen seitens des Parasiten untersucht, die für den beobachteten Effekt notwendig sind. Die Untersuchungen auf Einzelzellebene hatten bereits gezeigt, dass besonders parasit-positive Wirtszellen vor der ActD-induzierten Apoptose in HL-60-Wirtszellen geschützt sind, was darauf hinweisen könnte, dass intrazelluläre *T. gondii* direkt mit den Signal-Transduktionswegen der Apoptose interferieren. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass verschiedene *T. gondii*-Antigen-Extrakte sowie hitzeabgetötete Parasiten, die nicht mehr in Wirtszellen eindringen können, keine Inhibierung der Wirtszellapoptose induzierten. Demgegenüber konnten UV-bestrahlte Toxoplasmen, die zwar noch aktiv in die Wirtszellen eindringen, sich aber nicht mehr replizieren können (Endo et al., 1981), effektiv die Apoptose in parasit-positiven Zellen inhibieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Nash et al., (1998), die zeigen konnten, dass *T. gondii*-infizierte murine Zellkulturen gegenüber *in vitro*-induzierter Apoptose nicht mehr resistent waren, wenn die intrazellulären Parasiten mit Pyrimethamin oder Ciprofloxacin abgetötet wurden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Herunterregulation der *in vitro*-induzierten Apoptose durch den Parasiten von dem aktiven Prozess der Wirtszell-Invasion (Dobrowolski und Sibley, 1996) und/oder der Modulation der Wirtszellphysiologie durch lebende, intrazelluläre *T. gondii* (Endo et al., 1981; Joiner und Dubremetz, 1993) abhängig ist. Bei den dabei beteiligten Faktoren könnte es sich während der Invasion um Proteine aus den Rhoptrien oder Mikronemen handeln, die frühzeitig sezerniert werden (Groß, 1994). Diese Proteine sind aktiv an der Invasion und der Bildung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) beteiligt und könnten somit auch die Wirtszellphysiologie beeinflussen. Für die Modifizierung der Wirtszelle durch intrazelluläre Parasiten kommen auch die später in die parasitophore Vakuole (PV) sezernierten Proteine aus den Dichten Granula (GRA-Proteine) in Frage. Diese sind z. T. in der Lage, aus der PV in das Zytoplasma der Wirtszelle zu gelangen (Fischer et al., 1998). Zudem ist bekannt, dass die PV als molekulares Sieb fungiert (Schwab et al., 1994). So könnten auch andere, bisher noch unbekannte Moleküle

vom Parasiten in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben werden und dort deren Physiologie beeinflussen.

Bei anderen intrazellulären Pathogenen ist außer von Viren wie dem Epstein-Barr Virus (Henderson et al., 1991) oder dem African Swine Fever Virus (Revilla et al., 1997) nur vom Bakterium *Chlamydia trachomatis* (Fan et al., 1998) bekannt, dass pathogen-positive Zellen vor der Apoptose geschützt sind. Bei den Viren wird hierbei entweder die vermehrte Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 induziert oder ein virales Homolog des Bcl-2-Proteins exprimiert (Everett und McFadden, 1999). Bei *C. trachomatis* ist der bakterielle Faktor, der zur Apoptoseinhibierung führt, bislang unbekannt. Auch die Identifizierung des oder der für die Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* verantwortlichen parasitären Faktors/Faktoren steht noch aus und ist eine wichtige Aufgabe für zukünftige Untersuchungen.

### **4.3 Zellbiologische Mechanismen der Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii***

Die Regulation der Apoptose ist ein komplexer Vorgang (Abb. 1), der an verschiedenen Stellen durch Erreger beeinflusst werden kann. Ein möglicher Ansatzpunkt für *T. gondii* wäre dabei der Nukleäre Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), der bei der Transkription einer Reihe von Genen, von denen viele während der Immunantwort aktiviert werden, und bei der Inhibierung der Apoptose eine Rolle spielt (Van Antwerp et al. 1998; Wu et al., 1998; Chu et al., 1997; Beg und Baltimore, 1996; Van Antwerp et al., 1996). Der Transkriptionsfaktor liegt in seiner inaktiven Form als Komplex mit I $\kappa$ B im Zytoplasma vor; bei seiner Aktivierung wird er von dem zytoplasmatischen inhibitorischen Protein I $\kappa$ B abgespalten und gelangt in den Zellkern (Baldwin, 1996). In unseren Versuchen konnte nach Infektion von HL-60-Zellen mit *T. gondii* keine Veränderung der NF $\kappa$ B-Aktivität beobachtet werden. In uninfizierten und infizierten Kontrollzellen war die Menge aktivierten NF $\kappa$ Bs unverändert hoch. Demgegenüber war nach Induktion von Apoptose mit ActD kein aktivierter Faktor nachweisbar, unabhängig davon, ob die Zellen infiziert waren oder nicht. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B ist zwar unabhängig von der Proteinsynthese (Sen und Baltimore, 1986), ActD

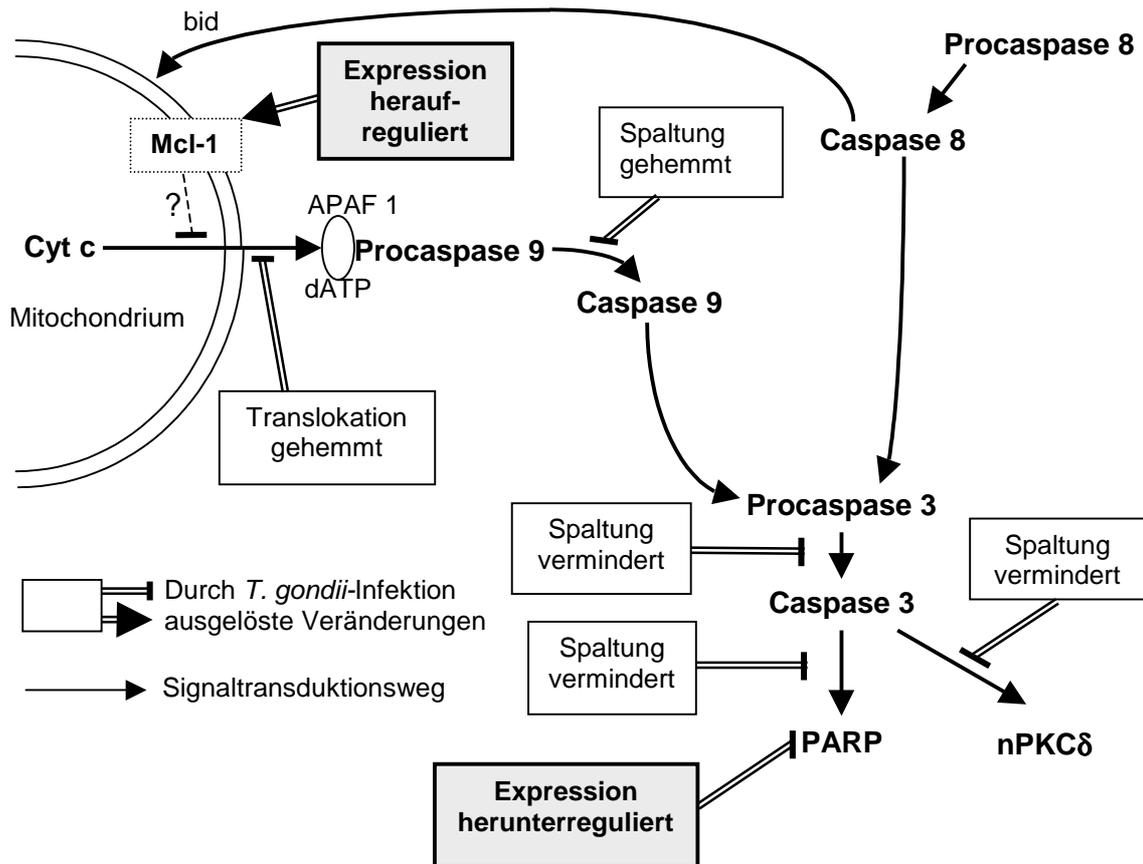
könnte jedoch schon die Bildung des inaktiven NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B-Komplexes inhibieren. Im Gegensatz zu unserem Ergebnis ist die Beeinflussung der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch verschiedene Erreger beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass das Epstein-Barr Virus in B-Lymphozyten NF $\kappa$ B aktiviert und gleichzeitig Apoptose inhibiert (Spender et al., 1999). Ähnlich kann das Hepatitis C Virus Core Protein Apoptose über die NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibieren (Marusawa et al., 1999). Ebenso ist bekannt, dass Lipopolysaccharide grampositiver Bakterien Apoptose durch NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibieren können (Manna und Aggarwal, 1999). Demgegenüber wurde eine Inhibierung der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch *Bordetella bronchiseptica* bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion beschrieben (Yuk et al., 2000). In unserem System scheint NF $\kappa$ B, da er durch eine Infektion mit *T. gondii* nicht beeinflusst wird, auch nicht an der Herunterregulation der Wirtszellapoptose beteiligt zu sein.

Hitzeschockproteine (HSPs) sind evolutionär hochkonservierte Proteine, die von Zellen als Antwort auf Stresssituationen gebildet werden und unter anderem auch die Resistenz gegenüber Apoptose erhöhen können (Samali und Cotter, 1996). In unserem System zeigte sich durch Immunblot-Analyse, dass die Expression von HSP60 in HL-60-Zellen nach Infektion mit NTE-Tachyzoiten nicht verändert wurde. Die Resistenz *T. gondii*-infizierter HL-60-Zellen gegen die ActD-induzierte Apoptose war also nicht auf eine verstärkte Expression von HSP60 nach Infektion zurückzuführen. Hisaeda et al. (1997) konnten demgegenüber zeigen, dass ein Homolog des mycobakteriellen HSP65, vermutlich HSP60 (van der Zee et al., 1998), an der Resistenz gegenüber einer *T. gondii*-Infektion beteiligt ist (Hisaeda und Himeno, 1997) und Apoptose in Mausmakrophagen nach Infektion mit dem avirulenten *T. gondii*-Stamm Beverly inhibiert. Diese offensichtliche Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und den Resultaten von Hisaeda et al. (1997) ist dabei wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die HSP-Expression in Mausmakrophagen *in vivo* von  $\gamma\delta$ T-Zellen oder *in vitro* durch Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induziert werden musste, beides Faktoren, die in dem von uns verwandten Modell nicht vorhanden waren. Das Vorhandensein von T-Zellen als Voraussetzung für die Expression von HSP60/65 und die damit verbundene Apoptoseinhibierung in Makrophagen ist auch nach Infektion mit *Trypanosoma cruzi* beschrieben worden (Sakai et al., 1999). Alternativ könnten Unterschiede in der HSP-Induzierbarkeit durch *T. gondii* zwischen murinen und humanen Zellen bestehen. Interessanterweise

stellten Hisaeda et al. (1997) Unterschiede in der Apoptosebeeinflussung zwischen dem maus-virulenten Stamm RH und dem maus-avirulenten Stamm Beverly fest. Der RH-Stamm induzierte dabei in hohem Maße Apoptose in Makrophagen, was Hisaeda et al. (1997) auf eine schwache Expression von HSP60/65 zurückführten. Demgegenüber wurde die Expression dieses Proteins durch den Beverly-Stamm stark induziert, und Makrophagen aus Mäusen, die mit diesem Stamm infiziert waren, zeigten keine Apoptose. Wie oben beschrieben, induzierten in unserem System weder der maus-virulente Stamm RH noch der maus-avirulente Stamm NTE Apoptose, sondern beide Stämme inhibierten die ActD-induzierte Apoptose in HL-60-Zellen in ähnlichem Ausmaß. Während Hisaeda et al. (1997) die Korrelation zwischen Infektion einer individuellen Zelle und Apoptoseinduktion nicht untersucht haben, konnten wir auf Einzelzellebene zeigen, dass parasit-positive Wirtszellen vor der induzierten Apoptose geschützt waren.

Eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion spielen die Cystein-Proteasen mit einer Asparat Spezifität, genannt Caspasen (Abb. 1). Untersuchungen zur Aktivierung der Caspase-Kaskade nach Induktion von Apoptose in HL-60- und U937-Zellen zeigten, dass *T. gondii* sehr deutlich mit unterschiedlichen Komponenten dieser Signalkaskade interferiert. In Abb. 21 ist daher ein vereinfachtes Schema der Rolle von Caspasen bei der Apoptoseinduktion dargestellt. Gleichzeitig stellt Abb. 21 ein Modell der zellbiologischen Mechanismen der Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* dar.

Eine zentrale Funktion in der Caspasekaskade besitzt die Caspase 3, die sowohl bei der über zellinterne Signale vermittelten als auch bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose aktiviert wird (Li et al., 1998). Gleichzeitig führt sie als Effektorcaspase direkt oder indirekt zur Spaltung verschiedener zytoplasmatischer und nukleärer Zielproteine und löst damit die zellulären Veränderungen während der Apoptose aus (Porter und Janicke, 1999). In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die ActD-induzierte Aktivierung von Caspase 3 in HL-60-Zellen und die TNF- $\alpha$ /CHX-induzierte Aktivierung in U937-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* inhibiert wurde. Eine Modulation der Caspase 3-Aktivität durch intrazelluläre Erreger ist in mehreren Fällen beschrieben worden. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose und aktiviert dabei Caspase 3 (Gao und Kwai, 1999), demgegenüber wird die Aktivierung nach



**Abb. 21.** Vereinfachtes Schema der Caspase-Signalkaskade und Modell der zellbiologischen Mechanismen, wie *T. gondii* in HL-60- und U937-Zellen die *in vitro* induzierte Apoptose inhibiert. Cyt c: Cytochrom c; PARP: Poly-(ADP-Ribose) Polymerase, Apaf 1: apoptotic protease activating factor 1, nPKCδ: novel Proteinkinase C δ.

Infektion mit Herpes Simplex Virus (Jerome et al., 1999), Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Tanaka et al., 1999) und *C. trachomatis* (Fan et al., 1998) vermindert.

Die Spaltung der Procaspase 3 erfolgt bei der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion vor allem durch aktivierte Caspase 8 (Yuan, 1997; Hirata et al., 1998), bei der Induktion durch zellinterne Signale dagegen durch aktivierte Caspase 9 (Abb. 21). Nach Infektion mit *T. gondii* wurde in HL-60-Zellen, bei denen Apoptose über einen Rezeptor-unabhängigen Weg induziert wurde, die Aktivität von Caspase 8 nicht beeinflusst. In U937-Zellen, bei denen Apoptose durch TNF-α in Kombination mit Cycloheximid induziert wurde, war nach Liganden-Rezeptor-Interaktion dagegen eine Spaltung der inaktiven Procaspase 8 festzustellen, die auch nach Infektion mit dem Parasiten unvermindert nachgewiesen wurde. Dahingegen konnte für beide Zelllinien gezeigt werden, dass nach Infektion mit *T. gondii* und

nachfolgender Induktion von Apoptose mit ActD bzw. TNF- $\alpha$ /CHX gegenüber uninfizierten Kulturen mit Apoptoseinduktor mehr inaktive Procaspase 9 vorhanden war, was auf eine verminderte Aktivierung zur Caspase 9 hindeutet. Da Caspase 9 durch den über die Mitochondrien gesteuerten Apoptoseweg aktiviert wird, lässt das Ergebnis eine Beeinflussung dieses Apoptoseweges durch den Parasiten vermuten, wohingegen die direkte Aktivierung der Caspase 3 durch Caspase 8 offensichtlich keine Rolle spielt. Bei der Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$  in U937-Zellen wurde ebenfalls CHX zugegeben, welches die Proteinsynthese inhibiert (Martin et al., 1990) und wie ActD direkt den mitochondrialen Apoptoseweg aktivieren könnte. Während die Apoptoseinduktion durch ActD bei HL-60-Zellen direkt über die Mitochondrien und damit Caspase 9 vermittelt wird, ist die Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$ , die wir bei den U937-Zellen eingesetzt haben, Caspase 8-vermittelt (Luo et al., 1998). Kuwana et al. (1998) haben gezeigt, dass Caspase 8 über die Mitochondrien die Aktivierung weiterer Caspasen auslösen kann, wobei zunächst Caspase 9 aktiviert wird (Budihardjo et al., 1999). In höheren Konzentrationen kann Caspase 8 Apoptose auch direkt über die Aktivierung weiterer Caspasen auslösen; liegt Caspase 8 jedoch in niedrigeren Konzentrationen vor, so ist die Freisetzung von Cytochrom c die Voraussetzung für die Apoptoseinduktion. Dabei spaltet Caspase 8 Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie, dessen Spaltprodukt dann direkt den mitochondrialen Apoptoseweg auslöst (Li et al., 1998). Über diesen wird vermutlich mehr Caspase 8 aktiviert und so das Signal verstärkt (Scaffidi et al., 1999). Die Tatsache, dass *T. gondii* nach Infektion von U937-Zellen die TNF- $\alpha$ /CHX-induzierte Aktivierung der Caspase 8 nicht vermindert, trotzdem jedoch die Apoptose in diesen Zellen inhibiert, deutet darauf hin, dass eine Apoptoseinhibierung trotz aktivierter Caspase 8 möglich ist. Dies wird durch Arbeiten von Tafani et al. (2000) bestätigt, die in TNF- $\alpha$ /ActD-behandelten L929-Zellen zeigen konnten, dass trotz einer Aktivierung von Caspase 8 Apoptose durch Inhibierung des mitochondrialen Apoptoseweges verhindert wurde. Wie bei der Caspase 3 ist auch für die Caspasen 8 und 9 eine Modulation durch intrazelluläre Erreger beschrieben worden. So kann das Influenza Virus über die Aktivierung von Caspase 8, das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und das Sindbis Virus (SNV) über die Aktivierung von Caspase 9 Apoptose auslösen (Balachandran et al., 1999). Demgegenüber inhibiert das Cowpox Virus über die Expression des crmA-Genprodukts Caspase 8 und 9 und damit die Wirtszellapoptose (Tewari et al., 1995b; Teodoro und Branton, 1997; Garcia-Calvo et al., 1998). Durch Infektion mit

*T. gondii* wurde bei den beiden von uns untersuchten Wirtszelllinien die induzierte Spaltung von Procaspase 9 vermindert, während die Spaltung von Caspase 8 nicht beeinflusst wurde.

Die novel Proteinkinase C $\delta$  (nPKC $\delta$ ) ist ein Substrat der Caspase 3, das während der Apoptose gespalten wird (Khwaja und Tatton, 1999) und somit zur Bestimmung der Caspase 3-Aktivität geeignet ist. Dabei ist die genaue Funktion der Spaltung während der Apoptose noch nicht bekannt (Dal Pra et al., 1999). Wir konnten zeigen, dass die Spaltung von nPKC $\delta$  in HL-60-Zellen nach Apoptoseinduktion bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* vermindert wurde, was auf eine geringere Aktivität von Caspase 3 hindeutete (Abb. 21). Dieses Ergebnis stimmt mit der von uns beobachteten verminderten Aktivierung von Caspase 3 überein, da bei einem geringeren Vorkommen aktiver Caspase 3 auch weniger Substrat umgesetzt werden müsste. Diese Versuche zeigen, dass die Inhibierung der Caspase 3-Aktivierung in ActD-behandelten HL-60-Zellen tatsächlich funktionelle Bedeutung besitzt, da ein Substrat der Caspase 3 in infizierten Zellen in geringerem Maße gespalten wird als in nicht-infizierten Zellen.

Die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist ein weiteres Substrat der Caspase 3 (Lazebnik et al., 1994; Nicolson et al., 1995, Tewari, Quan et al., 1995) und stellt einen wichtigen Apoptosemarker dar (Duriez und Shah, 1997). Nach Infektion von HL-60- und U937-Zellen mit *T. gondii* wurde weniger PARP gespalten, was auf eine verminderte Aktivierung von Caspase 3 hindeutet und somit unsere Ergebnisse mit nPKC $\delta$  bestätigt. Interessanterweise wurde die Expression von PARP unabhängig davon, ob Apoptose induziert worden war oder nicht, nach Infektion mit *T. gondii* herunterreguliert. Dieser zweite Mechanismus ist unabhängig von der Beeinflussung der Caspasen und stellt somit eine weitere Strategie der Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* dar. Eine Besonderheit unserer Ergebnisse ist, dass eine solche Herunterregulation der Expression von PARP durch einen intrazellulären Erreger bisher noch nicht beschrieben worden ist. Unklar bleibt allerdings, wie *T. gondii* die Expression von PARP verhindert und wie wichtig die Inhibierung der PARP-Expression bei der Blockierung der Apoptose durch den Parasiten ist. Neben der Bedeutung von PARP bei der Apoptose ist beschrieben worden, dass PARP Transkriptions-Kofaktor-Aktivität besitzt (Meisterernst et al., 1997). Somit könnte die

Verminderung der PARP-Expression durch *T. gondii*, die auch ohne Apoptose stattfindet, eine allgemeine Bedeutung für die Modulation der Wirtszelle durch den Parasiten haben.

Simbulan-Rosenthal et al. (1998) konnten zeigen, dass eine Depletion von PARP in Jurkat-Zellen und murinen 3T3-L1-Zellen Apoptose inhibiert. Für HL-60-Zellen ist ebenfalls beschrieben worden, dass die die Verminderung der Expression (Tanaka et al., 1995) und die direkte Inhibierung von PARP die Apoptose blockiert (Kuo et al., 1996; Shiokawa et al., 1997). Andererseits konnte gezeigt werden, dass PARP nach Induktion von Apoptose in HL-60- und U937-Zellen gespalten wird (McGowan et al., 1996). Bei diesen Studien blieb der genaue molekulare Mechanismus dieser Apoptoseinhibierung im Unklaren. Im frühen Stadium der Apoptoseinduktion scheint PARP in großem Maße das Histon H1 zu poly(ADP-ribosyl)ieren, was die Zugänglichkeit des Chromatins für zelluläre Endonukleasen und dadurch die DNS-Spaltung erleichtert (Yoon et al., 1996). Zudem wird diskutiert, dass die frühe Aktivierung von PARP während der Apoptose zu einem starken Verbrauch von Nikotinamid Adenin Dinukleotid (NAD) für die Poly(ADP-ribosyl)ierung führt. Da für die Regeneration von NAD Adenosin Triphosphat (ATP) benötigt wird, könnte ein Energiemangel zum Zelltod führen (Duriez und Shah, 1997). Eine weitere Möglichkeit, wie PARP zur Apoptose beitragen könnte ist die Bindung des kleinen 25 kDa-Fragments an die DNS, wodurch Reparaturenzyme nicht mehr an den Strangbrüchen ansetzen könnten (Duriez und Shah, 1997). PARP ist allerdings nicht in allen Fällen für die Apoptose notwendig (Leist et al., 1997; Le Rhun et al., 1998), was auch dadurch gezeigt wird, dass PARP (-/-) Mäuse lebensfähig sind (Wang et al., 1995). Weitere Untersuchungen zur PARP-Inhibierung z.B. durch Überexpression von PARP in Wirtszellen könnten weitere Aufschlüsse über die Bedeutung dieses Wirtsfaktors bei der Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* geben.

Da unsere Ergebnisse zeigen, dass *T. gondii* mit der Aktivierung von Caspase 9 interferiert, wurde in weiteren Versuchen das für die Caspase 9-Aktivierung wichtige Cytochrom c untersucht. Dieses tritt während der Apoptose aus den Mitochondrien in das Zytoplasma über und bildet dort mit dATP, Apaf-1 und Procaspase 9 einen Komplex, wodurch die Procaspase in die aktive Caspase 9 gespalten wird (Li et al., 1997, Pan et al., 1998). Durch Dreifachimmunfluoreszenzfärbung und konfokale

Laserscanmikroskopie konnten wir eine deutliche Inhibierung der Cytochrom c-Translokation aus Mitochondrien in das Zytoplasma der Wirtszelle nach Infektion mit *T. gondii* bei vorheriger Apoptoseinduktion in HL-60-Zellen nachweisen (Abb. 21). Auf Einzelzellebene war dabei klar erkennbar, dass in parasit-positiven Zellen, die gleichzeitig auch nicht apoptotisch waren, die Translokation von Cytochrom c verhindert wurde, während in parasit-negativen, apoptotischen Zellen Cytochrom c offensichtlich im Zytoplasma und nicht in den Mitochondrien lokalisiert war. Die Inhibierung des Übertritts von Cytochrom c ins Zytoplasma durch *T. gondii* konnte darüberhinaus durch subzelluläre Fraktionierung in zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen und dem anschließenden Immunblot proteinbiochemisch bestätigt werden. Die Herunterregulation der Cytochrom c-Translokation durch *T. gondii* kann dabei die verminderte Spaltung der Procaspase 9 in die aktive Caspase 9 nach Infektion mit dem Parasiten erklären. Eine Inhibierung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien ist auch für andere intrazelluläre Erreger wie Herpesvirus Saimiri (Derfuss et al., 1998) und *C. trachomatis* (Fan et al., 1998) beschrieben worden. Durch diese Inhibierung wird die Apoptosesignalkaskade an einem zentralen Punkt unterbrochen, da die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c sowohl bei der Apoptoseinduktion durch zellinterne als auch durch rezeptorvermittelte Signale eine wichtige regulatorische Funktion haben (Green und Reed, 1998). Bei der Auslösung der Apoptose über zellinterne Signale wie die Inhibierung der RNS- oder Protein-Synthese (Martin et al., 1990) wird Cytochrom c über einen noch unbekanntem Mechanismus in das Zytoplasma entlassen (Hsu und Hsueh, 2000). Aber auch bei der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion, bei der, wie bereits oben beschrieben, Caspase 3 direkt von Caspase 8 aktiviert wird, kann die Freisetzung von Cytochrom c direkt durch die Caspase 8-vermittelte Spaltung von Bid ausgelöst werden. Somit könnte die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose in U937-Zellen ebenfalls über den mitochondrialen Apoptoseweg beeinflusst werden.

Die wichtige Funktion der Mitochondrien in der Apoptoseregulation wird durch das Vorkommen von modulatorisch wirkenden Proteinen der Bcl-2-Familie in der äußeren Mitochondrienmembran unterstrichen. So ist bekannt, dass das namensgebende Bcl-2 antiapoptotisch wirkt und dabei die Translokation von Cytochrom c in das Zytoplasma verhindert (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997; Hengartner, 1998). In unserem System wurde die Expression von Bcl-2 in HL-60-Zellen durch Infektion von

*T. gondii* allerdings nicht beeinflusst, sodass Bcl-2 bei der Inhibierung der Wirtszellapoptose durch den Parasiten keine Rolle zu spielen scheint. Demgegenüber konnten wir zeigen, dass ein anderes Mitglied der Bcl-2-Familie, das ebenfalls antiapoptotisch wirkende Mcl-1 (Kozopas et al., 1993), nach Infektion von HL-60- und U937-Zellen mit *T. gondii* und gleichzeitiger Apoptoseinduktion stärker exprimiert wurde als in nicht-infizierten Kontrollzellen (Abb. 21). Mcl-1 ist wie Bcl-2 in den Mitochondrien lokalisiert. Bei erhöhten Mcl-1-Konzentrationen in HL-60-Zellen wird die Translokation von Cytochrom c in das Zytoplasma reduziert (Wang und Studzinski, 1997). Zudem ist bekannt, dass Mcl-1 eine durch K<sup>+</sup>-Kanal-Aktivierung induzierte Membran-Hyperpolarisierung auslöst, die für den Schutz vor Apoptose notwendig zu sein scheint. Der genaue molekulare Mechanismus der Apoptoseinhibierung durch Mcl-1 ist allerdings noch unbekannt (Wang et al., 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Mcl-1 einen Komplex mit den proapoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Familie wie Bax, Bak, Bok und Bik bilden kann (Hsu et al., 1997). So könnte Mcl-1 deren proapoptotische Wirkung neutralisieren und der Apoptose entgegenwirken.

Verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie können durch intrazelluläre Erreger beeinflusst werden. So inhibieren einige Viren die Wirtszellapoptose, indem sie ein Homolog des zelleigenen Bcl-2 exprimieren (Revilla et al., 1997; Nava et al., 1997) oder die Expression von Bcl-2 in der Wirtszelle induzieren (Henderson et al., 1991). Das murine A1, ein weiteres antiapoptotisch wirkendes Bcl-2-Familienmitglied, wird in peritonealen Zellen *T. gondii*-infizierter Mäuse heraufreguliert (Orlofsky et al., 1999). Eine Erreger-induzierte Beeinflussung der Mcl-1-Expression ist bislang nur für das Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) beschrieben worden, welches Apoptose in einer Fischzelllinie induziert, indem es Mcl-1 herunterreguliert (Hong et al., 1999). Eine Inhibierung der Wirtszellapoptose durch verstärkte Expression von Mcl-1 ist dagegen bisher nicht beschrieben worden und stellt somit ein neues Beispiel dar, wie Mikroorganismen die Wirtszellapoptose beeinflussen können.

Inhibierungsexperimente sollten klären, inwieweit Mcl-1 für den antiapoptotischen Effekt von *T. gondii* verantwortlich ist. Der Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) stimuliert über einen eigenen Signaltransduktionsweg die Bildung von Mcl-1 (Chao et al., 1998; Klampfer et al.,

1999). Eine Neutralisierung von GM-CSF durch Zugabe von spezifischem Antikörper hatte in unserem System jedoch keinen Einfluss auf die Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii*. 4-Aminopyridin wirkt dem antiapoptotischen Effekt von Mcl-1 entgegen, indem es die K<sup>+</sup>-Kanal-Aktivität, die Voraussetzung für die Mcl-1-vermittelte Apoptoseinhibierung ist, blockiert (Wang et al., 1999b). Nach Infektion mit *T. gondii* und gleichzeitiger Behandlung mit 4-Aminopyridin konnten wir jedoch ebenfalls keine Verminderung des Schutzes parasit-positiver Zellen gegenüber der induzierten Apoptose beobachten. Desweiteren wurden daher die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 eingesetzt (Wang et al., 1999a). PI3-K wird durch GM-CSF aktiviert und reguliert die Expression von Mcl-1. Während Wortmannin wie die zuvor untersuchten Inhibitoren keinen Effekt auf die Apoptoseinhibierung hatte, zeigte sich nach Apoptoseinduktion in HL-60-Zellen durch ActD und gleichzeitiger Behandlung mit LY294002 ein Anstieg der Apoptoseraten sowohl in parasit-negativen als auch in parasit-positiven Zellen einer infizierten Kultur. Darüberhinaus war aber auch in ActD-behandelten, nicht-infizierten Kulturen ein Anstieg der Apoptoserate nach LY294002-Behandlung festzustellen. Diese Ergebnisse weisen eher auf einen unspezifischen Effekt der Behandlung mit LY294002 hin, als auf eine spezifische Inhibierung der durch *T. gondii* verursachten Verminderung der Apoptoserate. Dies wird durch vorläufige Immunblot-Analysen bestätigt, die keine Veränderung der Mcl-2 Expression in infizierten oder nicht-infizierten Zellen nach LY294002-Behandlung zeigten. Zukünftige Experimente müssen in diesem Zusammenhang also die physiologische Bedeutung der veränderten Expression von Mcl-1 nach Infektion mit *T. gondii* klären.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen zur Veränderung der Apoptose-induzierenden Signaltransduktion, dass *T. gondii* mindestens mit zwei unterschiedlichen Komponenten der Apoptoseregulation interferiert (Abb. 21). Zum einen wird das im Mitochondrium lokalisierte anti-apoptotisch wirkende Mcl-1 nach Infektion mit *T. gondii* verstärkt exprimiert, was die Translokation von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma vermindern könnte. Dies wiederum führt in *T. gondii*-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu einer geringeren Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3, wodurch nukleäre Zielproteine wie nPKC $\delta$  und PARP in geringerem Ausmaß gespalten werden. Ein ähnlicher Mechanismus der Inhibierung der Wirtszellapoptose durch Beeinflussung von

Cytochrom c, Caspase 3 und PARP wurde von Fan et al. (1998) für *C. trachomatis* beschrieben. Zum anderen verhindert *T. gondii* darüberhinaus jedoch die Gesamtexpression von PARP, unabhängig davon ob in den Wirtszellen Apoptose induziert wurde oder nicht. Neben bekannten Ansatzpunkten für die Apoptoseinhibierung durch intrazelluläre Erreger hat *T. gondii* also zusätzlich einen bisher unbekanntem Mechanismus entwickelt. Zukünftige Untersuchungen müssen die funktionelle Bedeutung dieser beiden Mechanismen für die Inhibierung der Wirtszellapoptose klären. Zudem ist die Identifizierung der parasitären Faktoren, die für die Inhibierung der Wirtszellapoptose verantwortlich sind, ein weiteres wichtiges Ziel. Außer bei Viren sind bisher noch keine solche Faktoren von intrazellulären Erregern bekannt. Zur Identifizierung dieser Faktoren könnte z.B. die Etablierung eines zellfreien Apoptose-Systems geeignet sein, in dem man verschiedene Fraktionen des Parasiten quasi intrazellulär testen könnte.