

3 ERGEBNISSE

3.1 Effekt von *T. gondii* auf die Apoptose unterschiedlicher Wirtszelllinien

In Abhängigkeit des untersuchten Mikroorganismus' können intrazelluläre Pathogene die Wirtszellapoptose entweder induzieren oder inhibieren. Anhand verschiedener *in vitro*-Modelle sollte daher zunächst untersucht werden, ob und in welcher Weise *T. gondii* die Wirtszellapoptose beeinflusst. Diese Versuche sollten darüber hinaus klären, welche Zelllinien für weitere Untersuchungen besonders geeignet waren. Um einen möglichen inhibitorischen Effekt von *T. gondii* auf die Wirtszellapoptose untersuchen zu können, wurden die Zellen mit Substanzen behandelt, die als apoptosefördernd beschrieben waren. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

In keiner der untersuchten Zelllinien und Primärzellkulturen konnte in unbehandelten Zellen eine Induktion von Apoptose nach standardisierter Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten in einem Parasit zu Wirt-Verhältnis von 4:1 beobachtet werden, wie durch Hoechst-Färbung, TUNEL-Test oder DNS-Fragmentationstest nachgewiesen wurde. Bei der Auszählung von jeweils mindestens 500 Zellen lagen die Apoptoseraten nach der Hoechst-Färbung oder dem TUNEL-Test in unbehandelten und uninfizierten Kontrollen sowie in den unbehandelten infizierten Kulturen immer unter 5%.

In L929-, HeLa-, HFF- und PC-12-Zellen sowie in murinen Knochenmarksmakrophagen konnte mit den getesteten Apoptoseinduktoren keine ausreichende Apoptoserate induziert werden (Tabelle 4). Dagegen erwiesen sich für weitere Versuche am besten geeignet humane promyelozytische Leukämiezellen (HL-60) mit dem Apoptoseinduktor Actinomycin D (ActD) in Konzentrationen von 0,1 bis 5 µg/ml sowie humane histiozytische Lymphomzellen (U937) mit der Apoptoseinduktoren-Kombination 40 ng/ml TNF- α und 2 µg/ml Cycloheximid (CHX). Beide Modelle zeigten eine gute Induzierbarkeit von Apoptose bei gleichzeitig niedriger Nekroserate

sowie eine gute Handhabbarkeit der Zellkultur, während andere Behandlungen dieser Zellen keine apoptosefördernde Wirkung aufwiesen.

Tabelle 4. Untersuchungen zur Wirkung von *T. gondii* auf die Wirtszellapoptose anhand verschiedener *in vitro*-Modelle.

Zell- linie	Behandlung/ maximale Dauer	Apoptoserate *		Bemerkungen
		nicht-infiziert	infiziert	
L929	-	<5%	<5%	
	Actinomycin D (0,05-5 µg/ml) / 48 h	n.d.	n.d.	Bei höheren Apoptose- raten Ablösung der Zellen
	Adenosin (1 mM) / 48 h	<5%	n.d.	
	Colchicin (10-100µg/ml) / 48 h	<5%	n.d.	
	C ₈ -Ceramid (10-100 µM) / 48 h	<5%	n.d.	
	Gliotoxin (1-10 µmol/l) / 8 h	n.d.	n.d.	Die Zellen lösen sich nach 4 h ab.
	TNF-α (1-25 ng/ml) / 48 h	n.d.	n.d.	zu hohe Nekroserate
HL-60	-	<5%	<5%	
	Actinomycin D (0,1-5 µg/ml) / 16 h	bis ca. 60%	bis ca. 45%	Nekroserate <5%
	C ₈ -Ceramid (1-100µM)	n.d.	n.d.	zu hohe Nekroserate
	TNF-α (1-25 ng/ml) / 12 h	<2%	n.d.	
	α-Fas-Antikörper (1-2 µg/ml) / 24 h	<2%	n.d.	
	Sphingomyelinase (100 mU/ml) / 24 h	<2%	n.d.	
	C ₂ -Ceramid (10 µM) / 24 h	<2%	n.d.	
HeLa	-	<5%	<5%	
	Actinomycin D (1-5 µg/ml) / 8 h	keine Apoptotseleiter	n.d.	
	Staurosporin (0,1-2,0 µM) / 8 h	keine Apoptotseleiter	n.d.	
HFF	-	<5%	<5%	
	Actinomycin D (5 µg/ml) / 8 h	<2%	n.d.	
	TNF-α (40 ng/ml) + Cycloheximid (CHX, 2 µg/ml) / 8 h	<2%	n.d.	

Tabelle 4. (Fortsetzung)

Zell- linie	Apoptose-Induktion	Apoptoserate *		Bermerkungen
		nicht-infiziert	infiziert	
HFF	Staurosporin (0,5-1 µM) / 8 h	n.d.	n.d.	nach Hoechst-Färbung abweichende Nukleus- Morphologie, nicht auswertbar
mKMM	-	<5%	<5%	
	Gliotoxin (0,1-10 µM) / 24 h	n.d.	n.d.	Zellen lösen sich ab bzw. sind nekrotisch
	TNF-α (5 ng/ml) / 24 h	<2%	n.d.	
U937	-	<5%	<5%	
	Sphingomyelinase (100 mU/ml) / 8 h	n.d.	n.d.	zu hohe Nekroserate
	TNF-α (40 ng/ml) + CHX (2 µg/ml) / 8h	ausgeprägte Apoptoseleiter	Apoptoseleiter abgeschwächt	
PC-12	-	<5%	<5%	
	Entzug von Nerve Growth Factor (NGF) / 48 h	n.d.	n.d.	Zellen lösen sich ab, niedrige Apoptose- raten

* Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte durch Hoechst 33258-Färbung und Auszählen von mindestens 500 Zellen pro Bestimmung oder durch Beurteilung der DNS-Fragmentation nach Auftrennung genomischer DNS mittels Agarosegelelektrophorese. Die Wirtszellen wurden im Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 4:1 infiziert. mKMM: murine Knochenmarksmakrophagen; n.d.: nicht durchgeführt.

3.2 Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* in HL-60- und U937-Zellen

3.2.1 Untersuchungen auf Zellpopulationsebene

In den folgenden Versuchen sollte zunächst die offensichtliche Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* in HL-60- und U937-Zellen qualitativ und quantitativ eingehender charakterisiert werden. Der qualitative Nachweis von Apoptose auf Zellpopulationsebene erfolgte durch den DNS-Fragmentationstest. Dieser Test beruht darauf, dass während der Apoptose die DNS zwischen den Nukleosomen gespalten wird, wodurch Bruchstücke von ca. 180 Basenpaaren und Vielfachen davon entstehen. Diese können in einem Agarosegel als sogenannte apoptotische Leiter sichtbar gemacht werden. In den nicht-infizierten Kontrollen und nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit zu Wirtszell-Verhältnis von 10:1 und 30:1 zeigte sich weder in

HL-60- noch in U937-Wirtszellen die für Apoptose typische DNS-Leiter (Abb. 3). Nach Inkubation von HL-60-Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ActD und von U937-Zellen mit 40 ng/ml TNF- α und 2 $\mu\text{g/ml}$ CHX für 8 h war die DNS stark fragmentiert. Bei Infektion der beiden Zelllinien 30 min vor Apoptoseinduktion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 10:1 und 30:1 war die DNS-Fragmentierung dagegen abhängig von der Infektionsdosis stark vermindert.

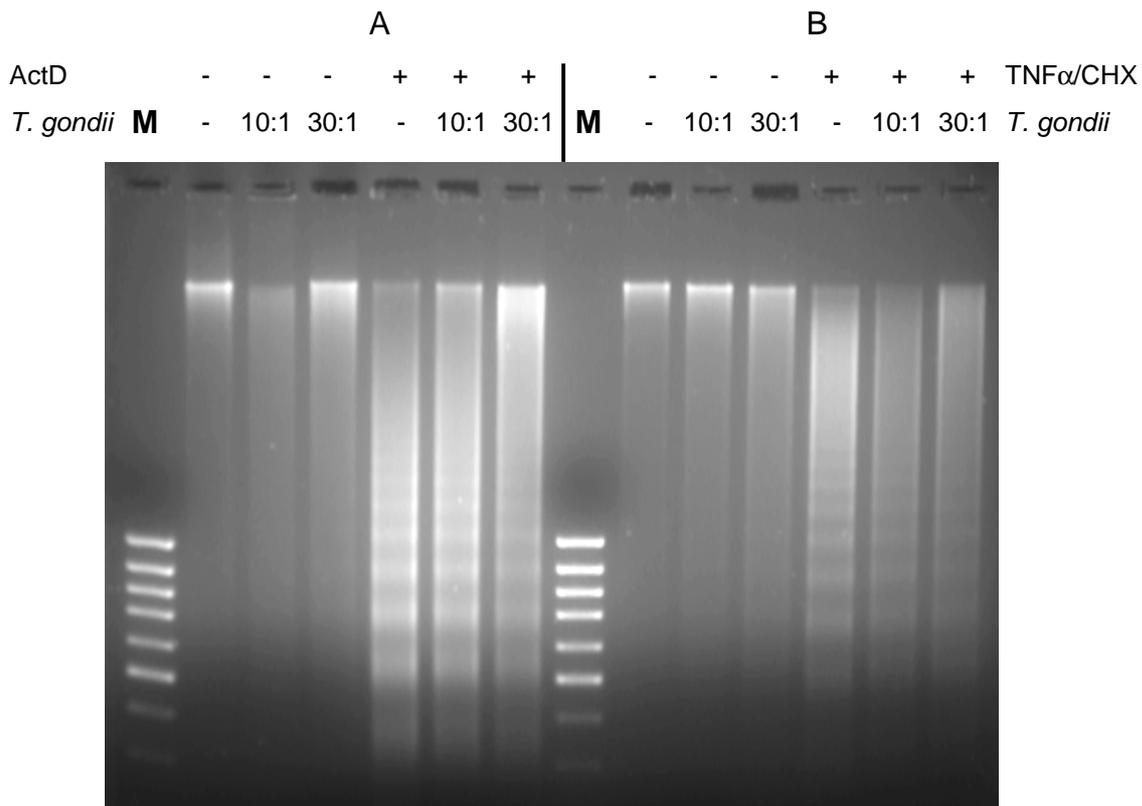


Abb. 3. DNS-Fragmentation in *T. gondii* infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen. Die Zellen wurden im angegebenen Verhältnis infiziert und 30 min später Apoptose für 8h induziert A) In HL-60-Zellen wurde mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ActD Apoptose induziert. B) In U937-Zellen wurde mit 40 ng/ml TNF- α und 2 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) Apoptose induziert. Danach wurde die genomische DNS beider Zelltypen isoliert, in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Es wurde jeweils aus der gleichen Zellzahl gewonnene DNS aufgetragen. Parallel wurde eine 100 bp-Leiter als Molekulargewichtsmarker (M) aufgetrennt.

Um die Veränderung der Wirtszellapoptose nach Infektion mit *T. gondii* quantitativ zu erfassen, wurden die adhären wachsenden HL-60-Zellen mit dem Hoechst 33258-Farbstoff angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Bei dieser Methode wird die DNS angefärbt, wodurch die Morphologie des Chromatins sichtbar wird. In nicht-apoptotischen Zellen ist der Kern dabei gleichmäßig angefärbt, wohingegen er bei apoptotischen Zellen durch die Kondensation des Chromatins deutlich granuliert ist.

In Abb. 4 ist die Hoechst-Färbung von HL-60 Zellen dargestellt. Während in unbehandelten Kulturen nur vereinzelt apoptotische Zellen auftraten (Abb. 4A), wies ein Großteil der Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml ActD für 12 h stark kondensiertes Chromatin auf (Abb. 4B). Bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 10:1 war dagegen eine deutliche Reduktion der Anzahl apoptotischer HL-60-Zellen festzustellen (Abb. 4C).

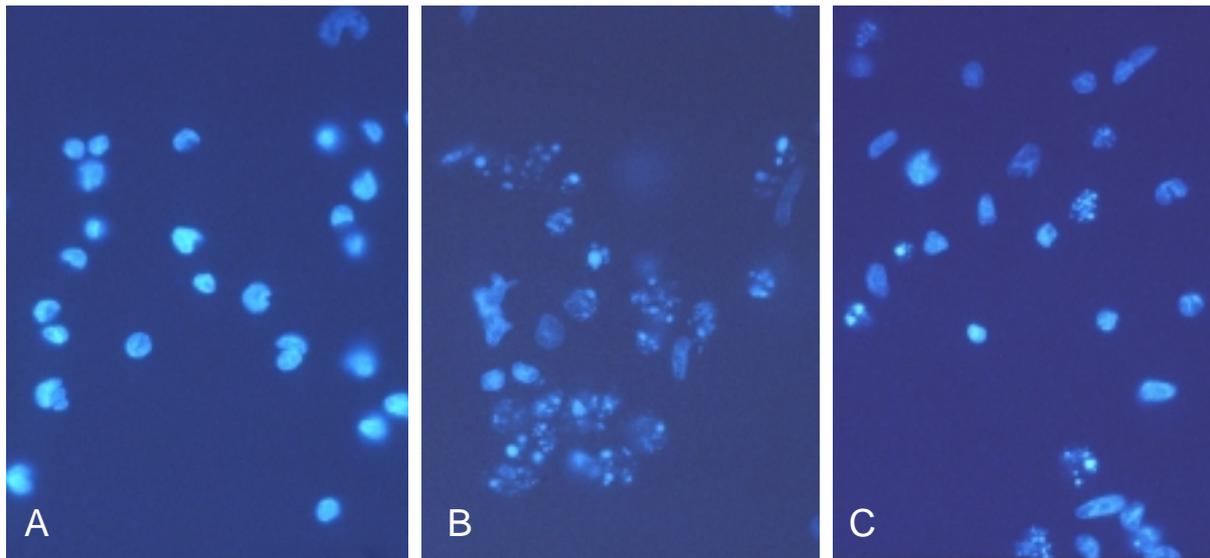


Abb. 4. Der Einfluss von *T. gondii* auf die ActD-induzierte Apoptose in HL-60 Zellen. Die Kondensation des Chromatins wurde nach 12 h Inkubation durch Färbung mit Hoechst 33258 sichtbar gemacht. A) Bei nicht-infizierten HL-60-Zellen ohne ActD war keine Chromatinkondensation sichtbar; B) nach Behandlung mit 0,5 µg/ml ActD waren apoptotische Zellen an der granulären Struktur des Zellkerns erkennbar; C) bei Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 10:1 und anschließender gleichzeitiger Behandlung mit ActD war nur in wenigen Zellen kondensiertes Chromatin vorhanden.

Die Ergebnisse von zwei voneinander unabhängigen Versuchen nach Infektion mit *T. gondii* sind in Abb. 5 zusammengefasst. In unbehandelten HL-60 Kulturen war der Prozentsatz apoptotischer Zellen kleiner als 2%, unabhängig davon, ob die Kultur mit Toxoplasmen infiziert worden war oder nicht. Nach Behandlung mit 0,1 bis 0,5 µg/ml ActD stieg die Apoptoserate dosisabhängig bis zu 65% an, bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 4:1 war die Apoptoserate dagegen jeweils deutlich geringer als in ActD-behandelten, nicht-infizierten Kontrollkulturen. Sie ging um 63%, 58% bzw. 30% bei Inkubation mit 0,1, 0,25 bzw. 0,5 µg/ml ActD zurück.

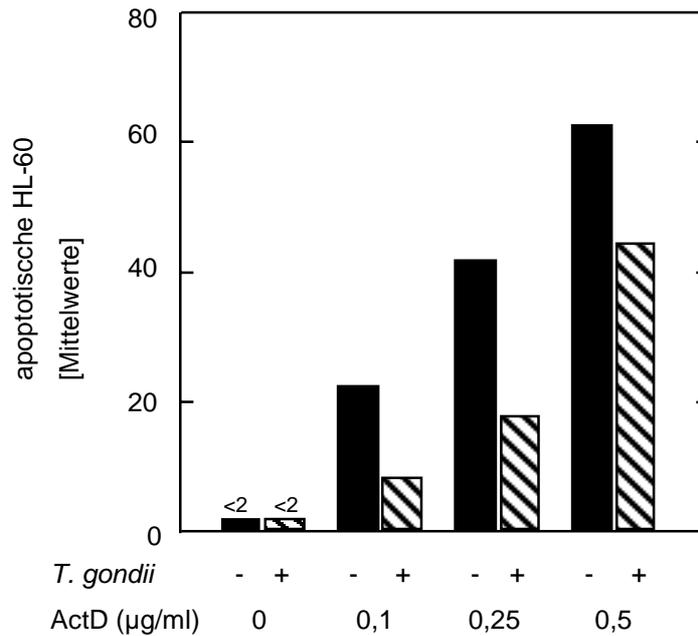


Abb. 5. Apotoseraten in HL-60-Kulturen nach 12 h Inkubation mit unterschiedlichen ActD-Konzentrationen und vorheriger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 4:1. Die Zellen wurden mit dem Hoechst-Farbstoff angefärbt und dann mikroskopisch ausgewertet, wobei jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt wurden. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

In diesem, wie auch in allen folgenden quantitativen Apoptosetests, wurde parallel zur Bestimmung der Apoptoserate ein Viabilitätstest durch Trypanblau-Färbung durchgeführt, um nekrotische Zellen von apoptotischen unterscheiden zu können. In allen Experimenten lag der Anteil von Zellen, die den Farbstoff nicht ausschlossen und daher als nekrotisch einzustufen waren, unter 5%.

3.2.2 Untersuchung der Apoptosebeeinflussung auf Einzelzellebene

In einer infizierten Kultur dringen die Parasiten nicht in jede Zelle ein, man kann also zwischen infizierten, parasit-positiven, und nicht infizierten, parasit-negativen, Zellen unterscheiden. Bei Infektion von HL-60-Zellen im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 ergaben sich Infektionsraten von $44,9\% \pm 3,3\%$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 10$, nicht gezeigt). Um erste Hinweise über mögliche Mechanismen der Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* zu erhalten, wurde durch Doppelimmunfluoreszenz untersucht, ob alle Zellen einer mit *T. gondii* infizierten Kultur gleichermaßen vor Apoptose geschützt sind oder ob dieser Schutz besonders für parasit-positive Zellen gilt. Dazu

wurden Toxoplasmen mit spezifischen Antikörpern fluoreszenzmarkiert und die Wirtszellapoptose durch Hoechst 33258-Färbung oder den terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-Test sichtbar gemacht. Der TUNEL-Test beruht auf einer Markierung von Einzelstrangbrüchen mit Fluorescein-markiertem dUTP durch die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT). Durch Fluoreszenzmikroskopie können so apoptotische Zellen sichtbar gemacht werden. Als Kontrollfärbung wurden alle Zellkerne mit Propidiumiodid gefärbt. Abb. 6 zeigt

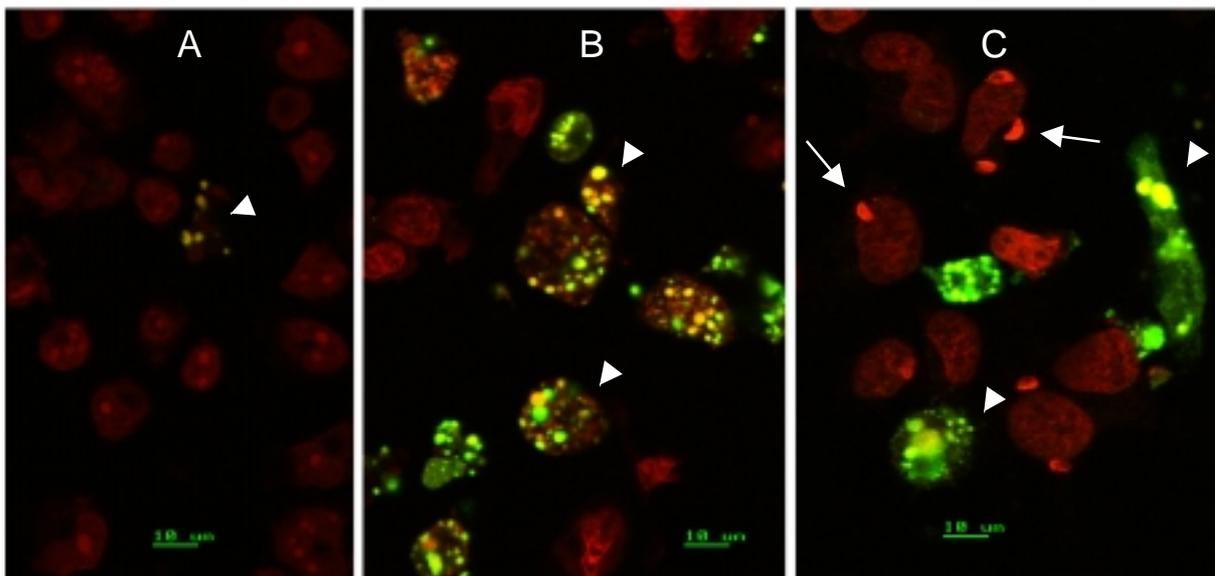


Abb. 6. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von HL-60-Zellen nach Induktion von Apoptose mit 0,5 µg/ml ActD und vorheriger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 4:1 nach 8 h. Einzelstrangbrüche in apoptotischen Zellen wurden mit dem TUNEL-Test Fluorescein-markiert (grün, Pfeilköpfe), Toxoplasmen mit einem spezifischen Antiserum und einem Cy-3-konjugierten Sekundärantikörper rot angefärbt (Pfeile). Als Hintergrundfärbung diente Propidiumiodid (rot). A zeigt eine nicht-infizierte Kontrollkultur ohne Zugabe von ActD, in B wurde Apoptose mit ActD induziert und in C nach Infektion mit *T. gondii* ebenso Apoptose induziert.

repräsentative Ausschnitte gefärbter HL-60-Kulturen nach Induktion von Apoptose durch ActD und Infektion mit *T. gondii*. In unbehandelten Kontroll-Kulturen traten nur vereinzelt apoptotische Zellen auf (Abb. 6A). Nach Apoptoseinduktion mit 0,5 µg/ml ActD für 8 h war ein Großteil der HL-60-Zellen apoptotisch (Abb. 6B). Bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 4:1 war der Anteil apoptotischer Zellen dagegen deutlich reduziert. Besonders auffällig war dabei, dass vor allem parasit-positive Wirtszellen vor der ActD-induzierten Apoptose geschützt waren. Dagegen waren apoptotische Zellen in der Regel parasit-negativ (Abb. 6C).

Abb. 7 fasst die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten zusammen. Um eventuelle stammspezifische Unterschiede in der Apoptosebeeinflussung durch *T. gondii* nachzuweisen, wurden bei diesen Versuchen neben den maus-avirulenten NTE-Tachyzoiten auch solche des maus-virulenten Stammes RH verwendet. In ActD-unbehandelten Kontrollzellen lag der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in infizierten ebenso wie in nicht-infizierten Kulturen bei unter 2%. Demgegenüber stieg die Rate apoptotischer HL-60-Zellen nach Inkubation mit 0,5 µg/ml ActD für 8 h auf 15 bis 25%. Nach gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* betrug die Gesamtapoptoserate, d. h. unabhängig vom Infektionsstatus der einzelnen Zellen, dagegen nur 17,3 ± 4,5% (NTE) - bzw. 9,7 ± 2,2% (RH) (nicht gezeigte Er-

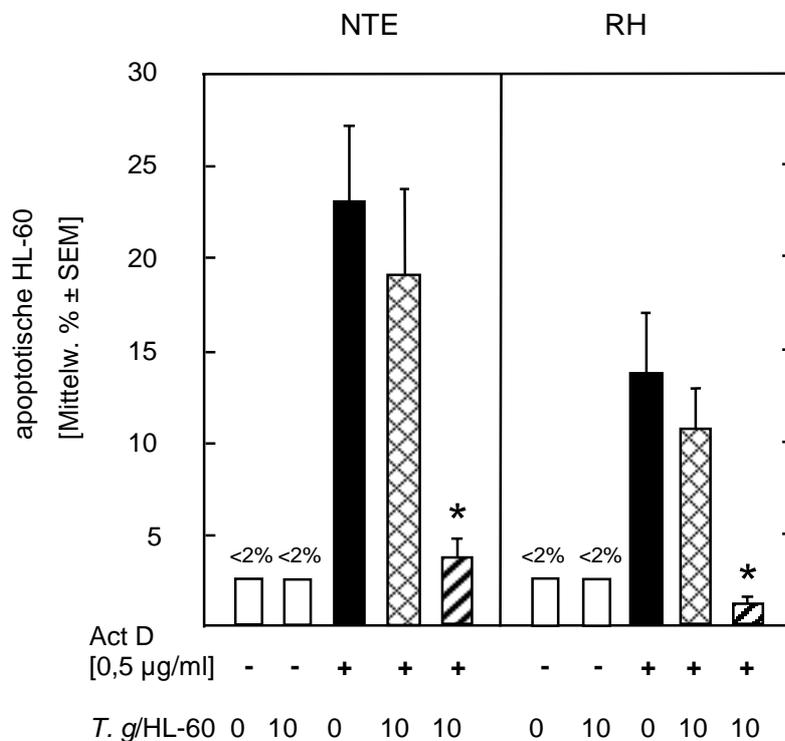


Abb. 7. Apoptoseraten in HL-60-Kulturen nach Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten der Stämme NTE bzw. RH im Parasit-Wirtszellverhältnis von 10:1 und anschließender Behandlung mit 0,5 µg/ml ActD für 8 h. Zum Nachweis der Apoptose wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, die Toxoplasmen wurden mit einem *Toxoplasma*-spezifischen Antiserum und entsprechendem Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, wobei jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt wurden. Die weißen Balken zeigen Kontrollzellen ohne ActD, die schwarzen ActD-behandelte Kulturen ohne Toxoplasmen, die karierten apoptotische parasit-negative Zellen einer mit *T. gondii* und ActD behandelten Kultur und die gestreiften Balken zeigen die apoptotischen parasit-positiven Zellen der gleichen Kultur. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten dar, signifikante Unterschiede gegenüber ActD-behandelten, nicht-infizierten Kulturen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

gebnisse). Acht Stunden nach Zugabe von Toxoplasmen in einem Parasit-Wirtszellverhältnis von 10:1 enthielten $12,3 \pm 1,4\%$ bzw. $22,0 \pm 4,3\%$ (Mittelwert \pm SEM) der HL-60-Zellen intrazelluläre NTE- bzw. RH-Tachyzoiten. Bei getrennter Auszählung der Apoptoserate in Abhängigkeit des Infektionsstatus' der individuellen Zelle zeigten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen parasit-negativen und parasit-positiven Zellen einer infizierten Kultur.

Gegenüber ActD-behandelten, nicht-infizierten Kulturen war die Apoptoserate in parasit-negativen Zellen einer infizierten, ActD-behandelten Kultur zwar leicht reduziert, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Students' t-Test; NTE: $P = 0,186$; RH: $P = 0,282$). Dagegen waren parasit-positive Zellen signifikant vor der ActD-induzierten Apoptose geschützt (Student's t-Test, $P = 0,017$ für NTE und $P = 0,024$ für RH). In diesen Fällen war die Apoptoserate um $82,8 \pm 4,3\%$ (NTE) bzw. $91,7 \pm 3,4\%$ (RH) reduziert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass nur intrazelluläre *T. gondii* die Wirtszellapoptose inhibieren. Außerdem konnten keine stammspezifischen Unterschiede in der Apoptoseinhibierung durch virulente oder avirulente Toxoplasmen festgestellt werden.

3.3 Der Einfluss von inaktivierten *T. gondii* und Antigen-Extrakten auf die Wirtszellapoptose

Um die physiologischen Voraussetzungen des Parasiten zur Inhibierung der Wirtszellapoptose zu untersuchen, wurden HL-60-Zellen mit unbehandelten, UV-bestrahlten oder hitzeinaktivierten Parasiten kultiviert oder mit unterschiedlichen *T. gondii*-Antigenextrakten aus NTE-Tachyzoiten inkubiert. Nach UV-Bestrahlung können die Parasiten zwar noch aktiv in ihre Wirtszellen eindringen, die Replikationsfähigkeit ist jedoch zerstört (Endo et al., 1981; eigene Ergebnisse, nicht gezeigt). Demgegenüber führt eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 60°C zum Abtöten der Parasiten, so dass auch eine Invasion der Wirtszellen nicht mehr möglich ist. Tatsächlich war nach Zugabe von UV-bestrahlten *T. gondii* in einem Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 die Infektionsrate von HL-60-Zellen gegenüber Kulturen, die mit unbehandelten Parasiten infiziert wurden, nur leicht vermindert ($41,2 \pm 9,9\%$ gegenüber $50,8 \pm 8,1\%$, $n = 5$). Nach Zugabe hitzeinaktivierter Toxoplasmen

waren dagegen keine intrazellulären Parasiten nachweisbar (nicht gezeigte Ergebnisse).

In Abb. 8 sind die Apoptoseraten von HL-60-Zellen nach Kultivierung mit unterschiedlich behandelten Toxoplasmen oder *T. gondii*-Extrakten dargestellt. Im

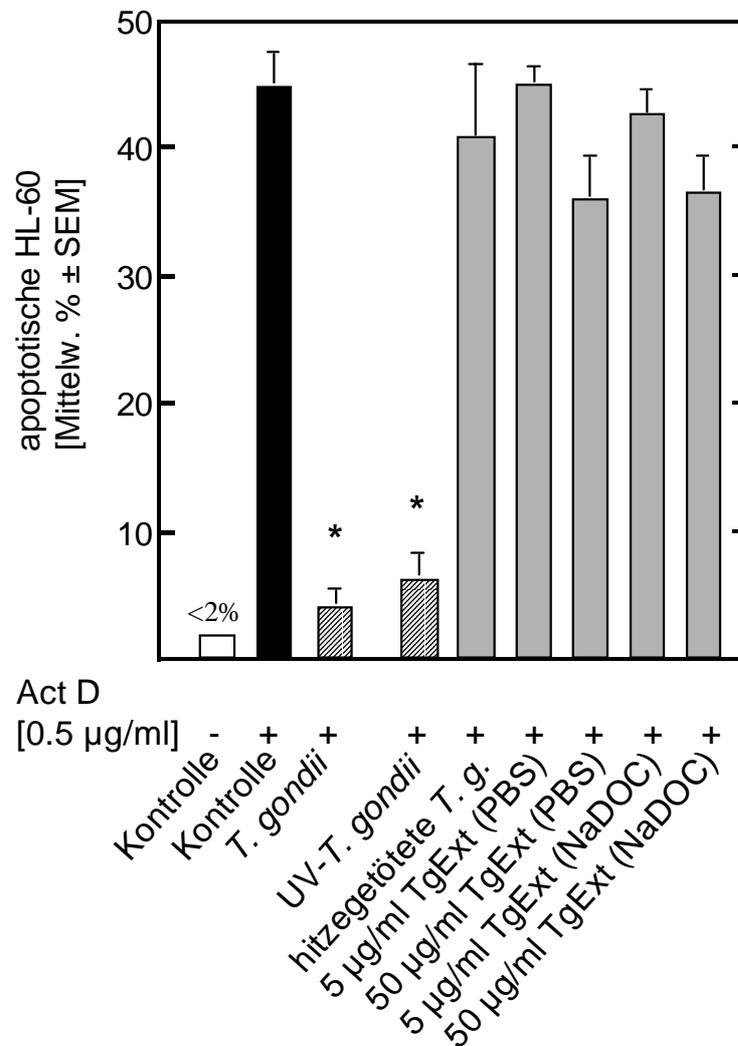


Abb. 8. Veränderung der ActD-induzierten Apoptoserate in HL-60-Zellen durch unterschiedlich vorbehandelte *T. gondii*. Die HL-60-Zellen wurden für 8 h mit 0,5 µg/ml ActD behandelt und vorher für 30 min mit unbehandelten, UV-behandelten oder hitzeinaktivierten Toxoplasmen im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert bzw. mit 5 oder 50 µg/ml PBS-löslichem oder Natrium-Desoxycholat (NaDOC)-löslichem Antigenextrakt von *T. gondii* (TgExt) inkubiert. Zum Nachweis der Apoptose wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, die Toxoplasmen wurden mit einem *Toxoplasma*-spezifischen Antiserum und entsprechendem Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, wobei jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt wurden. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM von fünf unabhängigen Experimenten dar, signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der weiße Balken zeigt eine nicht infizierte Kontrollkultur ohne ActD, der schwarze Balken eine uninfizierte Kultur nach Zugabe von ActD. Die gestreiften Balken zeigen apoptotische parasit-positive Zellen einer infizierten Kultur; die grauen Balken die Gesamtapoptoseraten in den entsprechend behandelten Kulturen.

Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten vermindert eine UV-Bestrahlung der Parasiten nicht ihre Fähigkeit, die ActD-induzierte Wirtszellapoptose zu inhibieren. In beiden Fällen war die Apoptoserate gegenüber nicht-infizierten Kontrollen signifikant erniedrigt (Student's t-Test, jeweils $P = 0,001$). Wurden ActD-behandelte HL-60-Zellen jedoch mit hitzeinaktivierten *T. gondii* inkubiert, kam es zu keiner signifikanten Verminderung der Apoptoserate. Ebenso war die ActD-induzierte Apoptoserate von HL-60-Zellen auch nach Inkubation mit 5 oder 50 $\mu\text{g/ml}$ eines PBS-löslichen oder NaDOC-löslichen Antigen-Extraktes von *T. gondii* nicht erniedrigt. Diese Ergebnisse zeigten, dass *T. gondii* zur Inhibierung der Wirtszellapoptose seine Wirtszellen zwar aktiv invadieren, aber nicht notwendigerweise replikationsfähig sein muss.

3.4 Mechanismen der *Toxoplasma gondii*-induzierten Inhibierung der Wirtszellapoptose

Neben den Voraussetzungen auf Seiten des Parasiten sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, welche *T. gondii*-induzierten physiologischen Veränderungen der Wirtszelle die Apoptoseinhibierung vermitteln.

3.4.1 Nukleärer Faktor κB (NF κB)

Zunächst wurde eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF κB an der Apoptoseinhibierung anhand des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht. Der Test beruht auf der Bindung von aktivem NF κB an spezifische DNS-Zielsequenzen. Dazu werden Oligonukleotide mit dieser Sequenz radioaktiv markiert und mit Zellkernextrakten der zu untersuchenden Zellen inkubiert. Diese Proben werden dann in einem nativen Acrylamid-Gel aufgetrennt, wobei ungebundene Oligonukleotide schneller durch das Gel laufen als die an NF κB gebundenen. Letztere sind an einer Verschiebung (shift) der Bande nach oben zu erkennen.

In Abb. 9 ist die Bindung der NF κB -spezifischen Konsensussequenz durch Kernextrakte von HL-60-Zellen dargestellt. In Abwesenheit von ActD kultivierte HL-60-Zellen zeigten eine starke Bindungsaktivität der Oligonukleotidprobe, was

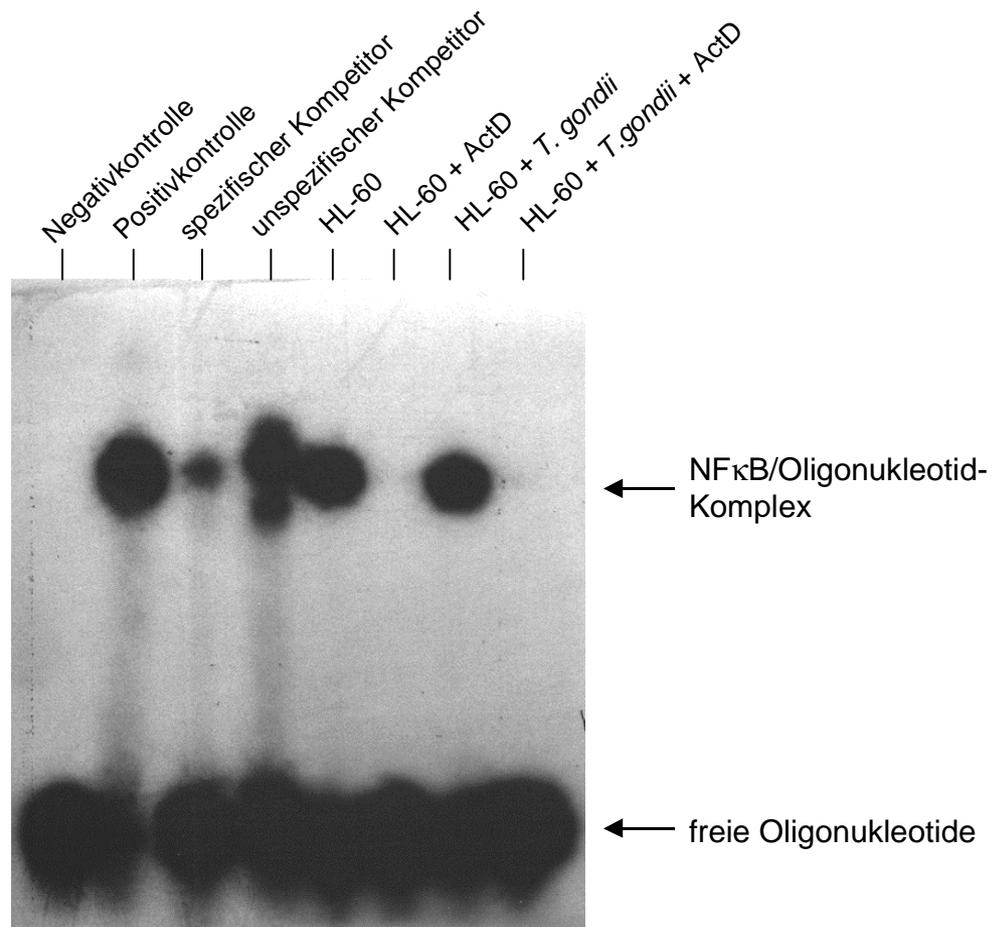


Abb. 9. Bindung einer NF κ B-spezifischen Oligonucleotidprobe durch Kernextrakte aus *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 und anschließender Induktion von Apoptose mit 5 μ g/ml ActD für 8 Stunden wurden Kernextrakte aufgereinigt und dann zusammen mit spezifischen, radioaktiv markierten Oligonucleotidproben in einem nativen Acrylamidgel elektrophoretisch mit 100 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Negativkontrolle: ohne Zellkernextrakt; Positivkontrolle: Zellkernextrakt aus U937-Zellen, spezifischer Kompetitor: Überschuss an unmarkiertem NF κ B-spezifischen Oligonucleotid; unspezifischer Kompetitor: Überschuss an unmarkiertem AP2-spezifischen Oligonucleotid.

gleichermaßen in nicht-infizierten wie in *T. gondii*-infizierten Zellen (Parasit-Wirtszellverhältnis 30:1) festzustellen war. Nach Behandlung der HL-60-Zellen mit 5 μ g/ml ActD für 8 Stunden war dagegen keine deutliche Bindungsreaktion nachweisbar, unabhängig davon, ob die Zellen mit *Toxoplasma* infiziert waren oder nicht. Die Spezifität der Bindungsreaktion wurde dabei durch verschiedene Kontrollansätze bestätigt. Bei der Negativkontrolle ohne Kernextrakt fand keine Bindung der Oligonucleotide statt, während Kontrolleextrakt aus U937-Zellkernen eine deutliche Bindungsaktivität aufwies (Positivkontrolle). Darüberhinaus führte ein

Überschuss an unmarkierten NF κ B-spezifischen Oligonukleotiden in der Bindungsreaktion (spezifischer Kompetitor) zu einer erheblich schwächeren Bindung der radioaktiv markierten DNS-Probe, wohingegen ein für den Nukleären Faktor AP2 spezifisches Oligonukleotid als unspezifischer Kompetitor keinen Einfluss auf die Intensität der Bindungsreaktion hatte. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *T. gondii* keinen Einfluss auf die DNS-Bindungsaktivität von NF κ B in HL-60-Zellen besaß.

3.4.2 Hitzeschockprotein 60/65 (HSP60/65)

Hitzeschockproteine (HSPs) sind evolutionär hochkonservierte Polypeptide, die von Zellen als Antwort auf verschiedene Stresssituationen zum Schutz von zellulären Funktionen gebildet werden. Hisaeda et al. (1997) haben gezeigt, dass in Mäusen, die mit einem avirulenten *T. gondii*-Stamm infiziert wurden, ein Homolog des mykobakteriellen HSP65 von Makrophagen verstärkt exprimiert wird und diese möglicherweise dadurch vor Apoptose geschützt sind. Aufgrund der hohen Identität zwischen HSP65 von Mykobakterien und HSP60 von Säugetieren und aufgrund der Größe des Proteins im Western Blot dürfte es sich hierbei um HSP60 handeln. Wir haben daher mittels Immunblot untersucht, ob die Inhibierung der ActD-induzierten Apoptose von HL-60-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* mit einer verstärkten Expression von HSP60 einhergeht. Dabei konnten jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Expression von HSP60 nach Apoptoseinduktion mit 5 μ g/ml ActD für 8 Stunden oder Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 gegenüber nicht-behandelten, nicht-infizierten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 10). Dies zeigt, dass die durch *T. gondii* induzierte Apoptose-Inhibierung in HL 60-Zellen nicht durch eine verstärkte Expression von HSP60 der Wirtszellen vermittelt wird.

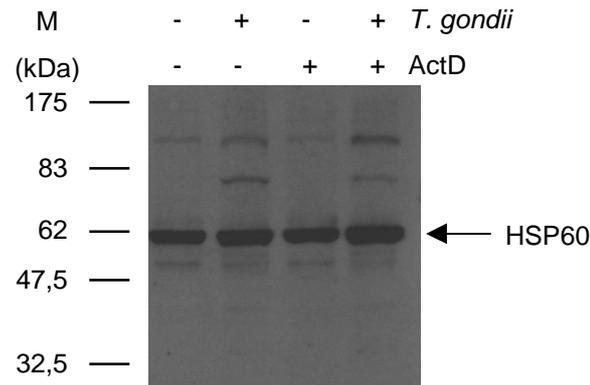


Abb. 10. Nachweis von HSP60 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. HL-60-Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. HSP60 wurde mit einem polyklonalen Antiserum und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. M: Molekulargewichtsmarker.

3.4.3 Caspasen

Caspasen spielen als Regulatoren und Effektormoleküle eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion. Um zu untersuchen, ob *T. gondii* in den von uns untersuchten Apoptosemodellen mit der Aktivierung der Caspasekaskade interferiert, wurde die Spaltung der inaktiven Procaspasen in die aktiven Caspasen im Immunblot nachgewiesen.

Eine zentrale Funktion in der Caspasekaskade besitzt die Caspase 3, die als Effektorcaspase direkt oder indirekt zur Spaltung verschiedener zytoplasmatischer und nukleärer Zielproteine führt und damit die Apoptose auslöst. Abb. 11 stellt die Expression und die durch proteolytische Spaltung vermittelte Aktivierung der Procaspase 3 zur aktiven Caspase 3 in HL-60- und U937-Zellen im Immunblot dar. Neben der Procaspase 3 war dabei auch die aktive Caspase 3 nachweisbar, da der verwendete Antikörper beide Formen bindet. In Zellextrakten unbehandelter Zellen war bei beiden Zelllinien ausschließlich die inaktive Procaspase 3 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, nicht jedoch die aktive Caspase 3 mit ca. 17 kDa nachweisbar. Dabei führte auch eine Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellver-

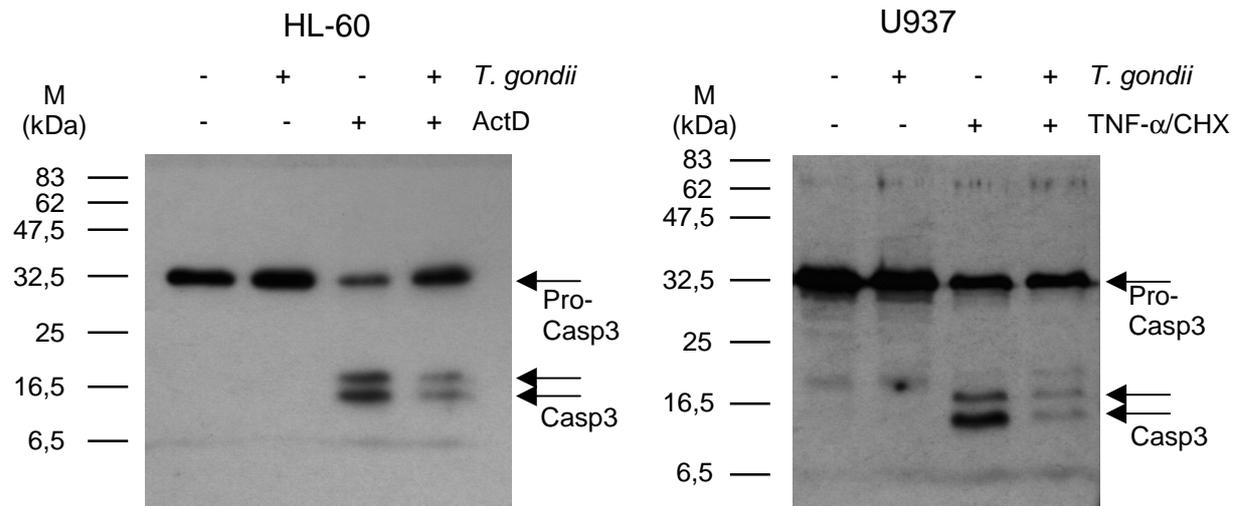


Abb. 11. Expression und Aktivierung von Caspase 3 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60- und U937-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Caspase 3 wurde mit einem polyklonalen Antiserum und dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. ProCasp3: Procaspase 3; Casp3: Caspase 3; M: Molekulargewichtsmarker.

hältnis von 30:1 im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu keiner deutlichen Veränderung der Expression oder Spaltung. Dagegen induzierte eine Behandlung von HL-60-Zellen mit 5 µg/ml ActD bzw. von U937-Zellen mit 40ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX für jeweils 8 Stunden eine deutliche Spaltung der Procaspase 3 in die aktive Caspase 3. Nach gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 enthielten Zellextrakte beider Zelltypen jedoch deutlich weniger aktive Caspase 3, und zumindest bei HL-60-Zellen war damit einhergehend eine Zunahme der inaktiven Procaspase 3 festzustellen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii* mit einer verminderten Aktivierung der Caspasekaskade einhergeht.

Die Spaltung der Procaspase 3 erfolgt bei der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion vor allem durch eine Aktivierung der Caspase 8, bei der Induktion durch zellinterne Signale dagegen durch Aktivierung der Caspase 9. Daher wurde die Aktivierung von Caspase 8 und 9 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten Zellen durch Immunblot untersucht. Zum Nachweis der Aktivierung von Caspase 9 wurde ein Antikörper verwendet, der nur die ungespaltene Proform, nicht jedoch das aktive Spaltprodukt bindet (Abb. 12). In Zellextrakten unbehandelter HL-60- oder

U937-Zellen war 8 Stunden nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 oder in nicht-infizierten Kontroll-Zellen die Procaspase 9 mit einem Molekulargewicht von 48 kDa unverändert stark nachweisbar. Nach Induktion von Apoptose durch 5 µg/ml ActD in HL-60-Zellen bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX in U937-Zellen war in beiden Fällen Procaspase 9 nur schwach vorhanden, was auf eine Spaltung zur aktiven Caspase 9 hindeutet. Bei gleichzeitiger Infektion der Zellen mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 war dagegen im Vergleich zu ActD-behandelten, nicht-infizierten HL-60- bzw. U937-Zellen deutlich mehr Procaspase 9 nachweisbar, was auf eine abgeschwächte Spaltung der Procaspase 9 im Gegenwart von *T. gondii* zurückzuführen sein dürfte.

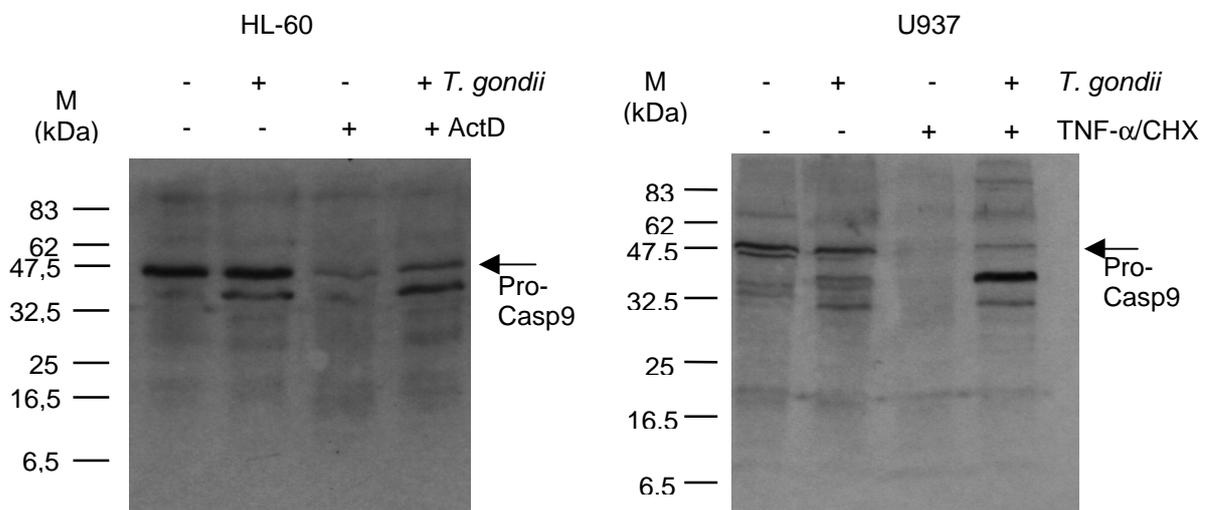


Abb. 12. Nachweis von Procaspase 9 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60- und U937-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später mit 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Procaspase 9 wurde mit einem polyklonalen Antiserum und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. ProCasp9: Procaspase 9; M: Molekulargewichtsmarker.

Caspase 8 wurde in Zellextrakten infizierter und nicht-infizierter HL-60- und U937-Zellen durch Immunblot mit einem Antikörper nachgewiesen, der nur die inaktive Procaspase 8 mit einem Molekulargewicht von 55 kDa erkennt (Abb. 13). Acht Stunden nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 war Procaspase 8 sowohl in unbehandelten als auch in ActD-behandelten (5µg/ml)

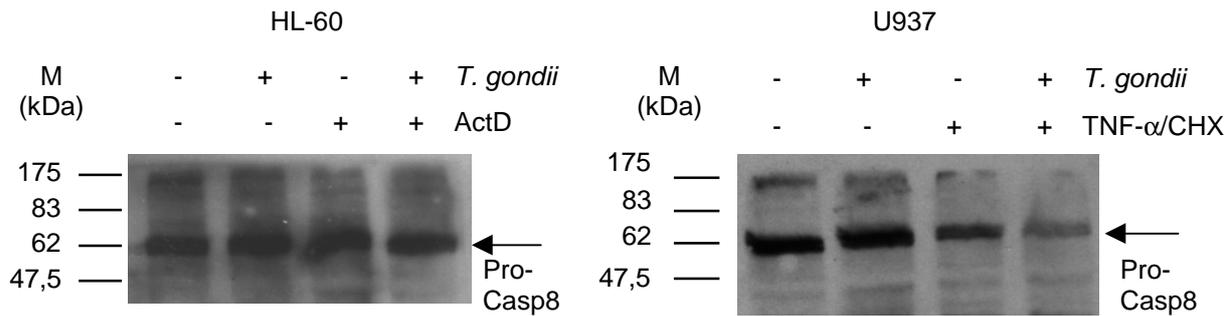


Abb. 13. Nachweis von Procaspase 8 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60- und U937-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später mit 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Procaspase 8 wurde mit einem polyklonalen Antiserum und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. ProCasp8: Procaspase 8; M: Molekulargewichtsmarker.

HL 60-Zellen gleich stark vorhanden wie in nicht-infizierten Kontrollzellen. Demgegenüber war in U937-Zellen acht Stunden nach Apoptoseinduktion mit 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX weniger Procaspase 8 vorhanden als in Kontrollkulturen ohne Apoptoseinduktion, was auf eine Spaltung in die aktive Caspase 8 hindeutet. Durch gleichzeitige Infektion der U937-Zellen mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 konnte die Verminderung von Procaspase 8 nicht rückgängig gemacht werden, sie wurde sogar leicht verstärkt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *T. gondii* die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 vermindert. Dagegen scheint *T. gondii* die proteolytische Spaltung der Caspase 8 nach Bindung von TNF-α an seinen Rezeptor nicht vermindern zu können.

3.4.4 Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)

Ein wichtiges Substrat von Caspase 3 ist PARP, die bei normaler Zellfunktion einen Überlebensfaktor darstellt, indem sie zusammen mit anderen Faktoren zur DNS-Reparatur beiträgt. Bei stärkeren DNS-Schädigungen fördert PARP dagegen den Zelltod. Caspase 3 spaltet das 116 kDa-Protein direkt oder indirekt in zwei Fragmente der Größen 85 und 25 kDa. In Abb. 14 ist die Expression und proteolytische Spaltung von PARP in HL-60- bzw. U937-Zellen nach Infektion mit *T. gondii* bzw. nach Induktion von Apoptose im Immunblot dargestellt, der verwendete Antikörper erkennt das 116 kDa Protein und das 85 kDa Fragment.

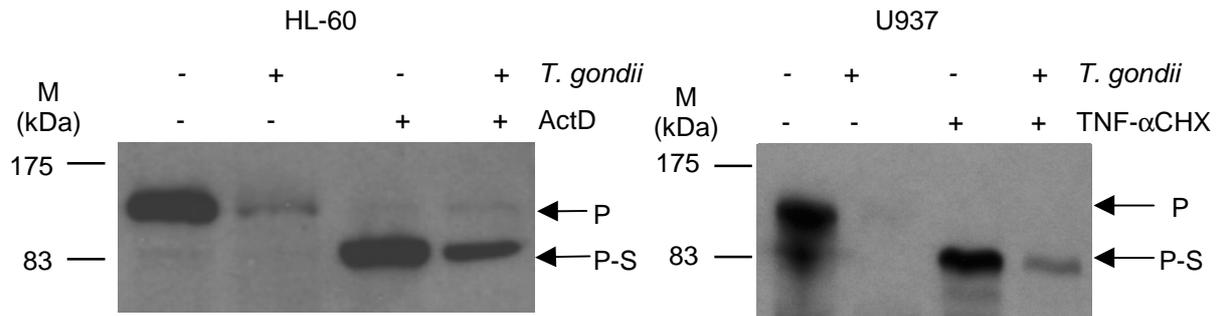


Abb. 14. Nachweis von PARP in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60- und U937-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. PARP wurde mit einem monoklonalen Antikörper und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. P: PARP; P-S: PARP-Spaltungsprodukt; M: Molekulargewichtsmarker.

Interessanterweise wurde die Expression von PARP in beiden Zelllinien nach Infekt-Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 stark herunterreguliert. Nach Induktion der Wirtszellapoptose durch 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) wurde das 116 kDa Protein nahezu vollständig gespalten. Bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 und Apoptoseinduktion wurde PARP stark herunterreguliert, jedoch weiterhin gespalten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die PARP-Expression durch *T. gondii* unabhängig von der oben gezeigten Inhibierung der Caspaseaktivierung herunterreguliert wird.

3.4.5 Novel Proteinkinase C δ (nPKC δ)

Als weiteres direktes oder indirektes Substrat der Caspase 3 wurde die Spaltung der Proteinkinase Cδ (nPKC δ) im Immunblot untersucht. Dabei wurde ein Antikörper, der sowohl die 79 kDa große nPKC δ als auch deren 47 kDa großes Spaltprodukt erkennt, verwendet. Abb. 15 zeigt, dass nach Infektion von unbehandelten HL-60-Zellen mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 die Expression der nPKC δ in HL-60-Zellen gegenüber nicht-infizierten Kontroll-Zellen nicht verändert war. Nach Apoptoseinduktion mit 5 µg/ml ActD wurde nPKC δ dagegen deutlich gespalten, wie an der Zunahme der 47 kDa-Untereinheit ersichtlich war. Diese

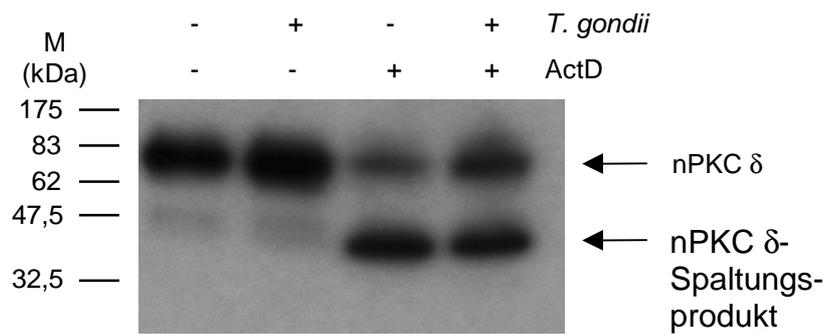


Abb. 15. Nachweis von nPKC δ in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. nPKC δ wurde mit einem polyklonalen Antiserum und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. M: Molekulargewichtsmarker.

Spaltung fiel jedoch geringer aus, wenn die HL-60-Zellen gleichzeitig mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert waren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die verminderte Spaltung der Caspase 3 nach Infektion mit *T. gondii* tatsächlich physiologische Bedeutung besitzt, indem Substrate in geringerem Ausmaß gespalten werden.

3.4.6 Cytochrom c

Cytochrom c ist ein in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiertes Protein der Atmungskette, das bei der Regulation von zellintern induzierter Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Dabei tritt es aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma über und aktiviert dadurch zusammen mit dem apoptosis-activating factor 1 (Apaf1) und dATP die Caspase 9. Die Verteilung von Cytochrom c in der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60 Zellen wurde durch Immunblot untersucht (Abb. 16). In Zellextrakten unbehandelter HL-60-Zellen war 8 Stunden nach Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 oder in nicht-infizierten Kontroll-Zellen das 15 kDa große Cytochrom c hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Da sich die Menge an mitochondrialem Cytochrom c nach Infektion der Wirtszellen gegenüber der Kontrolle nicht änderte, wurde davon ausgegangen, dass die Mitochondrien des Parasiten den

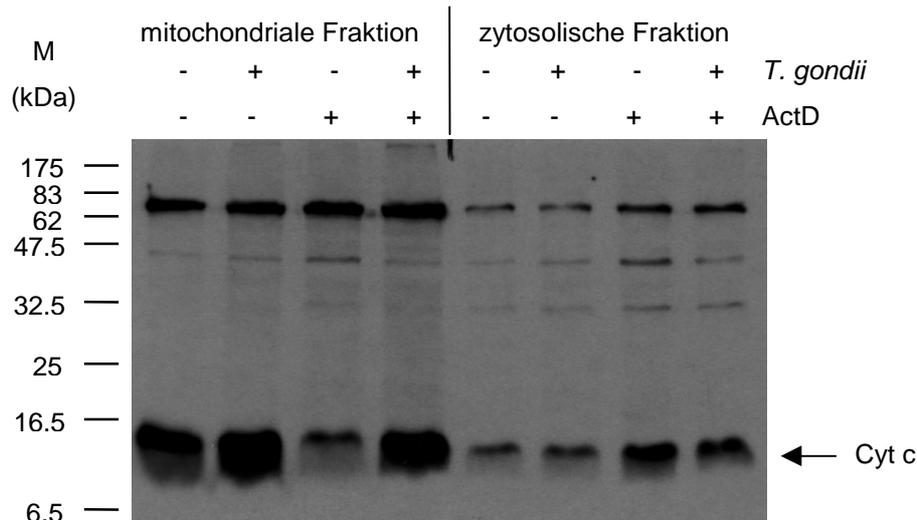


Abb. 16. Die Verteilung von Cytochrom c in der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert, 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Cytochrom c wurde mit einem monoklonalen Antikörper und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. Cyt c: Cytochrom c; M: Molekulargewichtsmarker.

Western-Blot nicht beeinflussen. Nach Induktion von Apoptose durch 5 µg/ml ActD für 8 Stunden in HL 60-Zellen nahm der Gehalt an Cytochrom c in der mitochondrialen Fraktion gegenüber Kontrollzellen deutlich ab, wohingegen er in der zytosolischen Fraktion zunahm. Dieser Effekt wurde bei gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 deutlich abgeschwächt, das Cytochrom c wurde wieder hauptsächlich im Mitochondrium nachgewiesen.

Um das Ergebnis aus dem Immunblot auf Einzelzellebene zu bestätigen, wurde die Verteilung von Cytochrom c in der Zelle zusätzlich durch Dreifachimmunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie untersucht (Abb. 17). In unbehandelten HL-60-Zellen war das Cytochrom c offensichtlich in den Mitochondrien lokalisiert, was an der granulären Verteilung in den Zellen erkennbar war (Abb. 17A). Wurde mit 5 µg/ml ActD Apoptose induziert, so war in apoptotischen Zellen eine gleichmäßige Verteilung des Cytochrom c im Zytoplasma erkennbar, was auf eine Translokation in das Zytoplasma hindeutet, wohingegen nicht apoptotische Zellen der gleichen Kultur eine granuläre Verteilung des Cytochrom c zeigten (Abb. 17B). Bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion und Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1

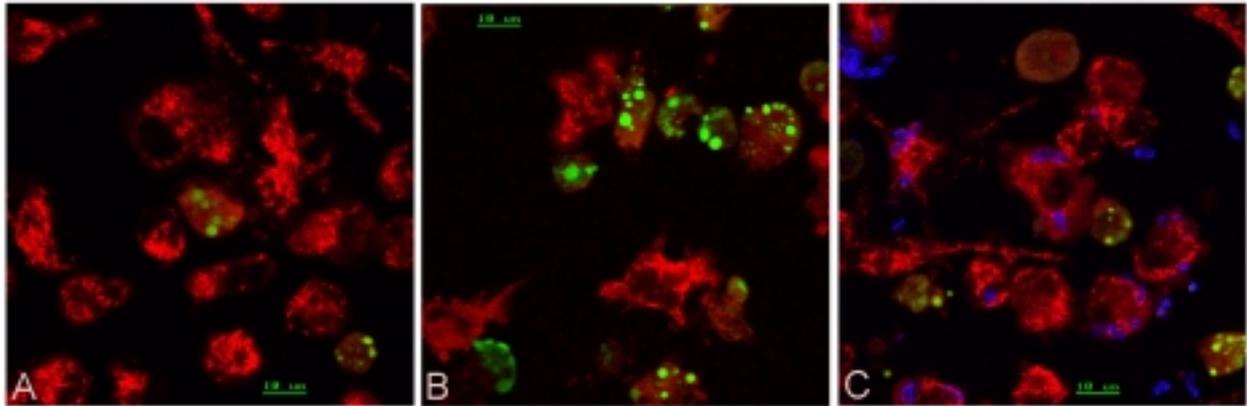


Abb. 17. Subzelluläre Verteilung von Cytochrom c in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für den IFT gefärbt. Der Nachweis von Cytochrom c erfolgte durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper, der durch einen entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurde (rot), apoptotische Zellen wurden mit dem TUNEL-Reagenz grün angefärbt und *T. gondii* wurde mit einem spezifischen Antiserum und entsprechenden Cy5-konjugierten Sekundärantikörper markiert (blau). A zeigt eine nicht-infizierte Kontrollkultur ohne Zugabe von ActD, in B wurde Apoptose induziert und in C nach Infektion mit *T. gondii* Apoptose induziert.

war deutlich erkennbar, dass das Cytochrom c bei nicht-apoptotischen, parasit-positiven Zellen in den Mitochondrien verteilt war, wohingegen bei apoptotischen, parasit-negativen Zellen die Lokalisation des Cytochrom c im Zytoplasma erkennbar war (Abb. 17C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien von HL-60-Zellen in das Zytoplasma nach Infektion mit *T. gondii* herunterreguliert war.

3.4.7 Proteine der Bcl-2-Familie

Die Proteine der Bcl-2-Familie, die hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert sind, spielen bei der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle, wobei zumindest bei einem Teil dieser Proteine die mit der Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma verbundenen Prozesse betroffen sind. Das antiapoptotisch wirkende Bcl-2, welches ein Molekulargewicht von 26 kDa hat, war nach Infektion mit *T. gondii* und Inkubation mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ActD für 8 Stunden ähnlich stark exprimiert wie in nicht-

infizierten oder nicht-behandelten Kontrollzellen (Abb. 18). Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob das Parasit-Wirtszellverhältnis 10:1 oder 20:1 betrug.

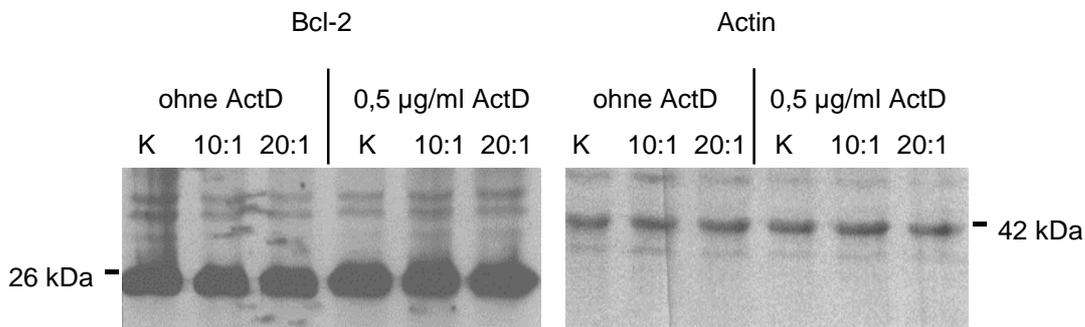


Abb. 18. Expression von Bcl-2 und Actinkontrolle in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im angegebenen Parasit-Wirtszellverhältnis infiziert und 30 min später wurde mit 0,5 µg/ml ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bcl-2 und Actin wurden jeweils mit einem monoklonalen Antikörper und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. K: Kontrolle ohne *T. gondii*.

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die Expression des 42 kDa großen Mcl-1, einem ebenfalls antiapoptotisch wirkenden Mitglied der Bcl-2-Familie, durch Infektion mit *T. gondii* beeinflusst wurde (Abb. 19). Nach Induktion von Apoptose mit

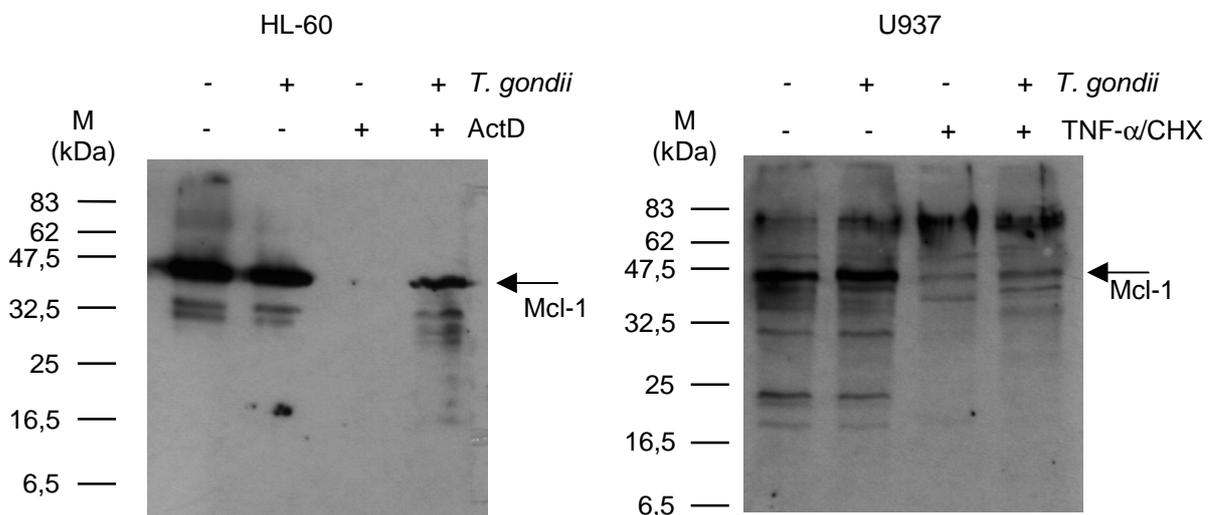


Abb. 19. Nachweis von Mcl-1 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60- und U937-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD (HL-60) bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX (U937) für 8 Stunden Apoptose induziert. Anschließend wurden Zellextrakte in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mcl-1 wurde mit einem polyklonalen Antiserum und entsprechendem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über das ECL-System sichtbar gemacht. M: Molekulargewichtsmarker.

5 µg/ml ActD bei HL-60- bzw. 40 ng/ml TNF-α und 2 µg/ml CHX bei U937-Zellen sank die Expression von Mcl-1 gegenüber nicht-behandelten Kontrollzellen deutlich. Bei Infektion mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 und anschließender Apoptoseinduktion wurde dieser Effekt jedoch erheblich abgeschwächt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Bcl-2 an der Inhibierung der *in vitro* induzierten Apoptose durch *T. gondii* wahrscheinlich nicht beteiligt ist, wohingegen die verstärkte Expression von Mcl-1 bei Infektion mit *T. gondii* und anschließender Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle spielen könnte.

3.4.8 Inhibierungsversuche von Mcl-1

Als antiapoptotisch wirkender Regulator der Bcl-2-Familie könnte die verstärkte Expression von Mcl-1 nach *T. gondii*-Infektion wesentlich zur verminderten Aktivierung der Caspase-Kaskade und damit zur Apoptoseinhibierung beitragen. Durch Einsatz von Mcl-1-Inhibitoren sollte daher die funktionelle Bedeutung der veränderten Mcl-1-Expression für die Apoptoseinhibierung durch *T. gondii* untersucht werden. Mcl-1 lässt sich durch Entzug des Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF) inhibieren, da dieser für die Bildung von Mcl-1 nötig ist (Klampfer et al., 1999). GM-CSF wurde deshalb durch Zugabe von GM-CSF-spezifischen Antikörpern zum Zeitpunkt der Infektion von HL-60-Zellen mit *T. gondii* im Parasit- Wirtszellverhältnis von 30:1 neutralisiert, anschließend mit 5 µg/ml ActD Apoptose induziert und 8 Stunden später der Anteil apoptotischer Zellen durch Hoechst-Färbung bestimmt. Parallel wurde eine Isotypkontrolle des Antikörpers untersucht, die Ergebnisse aus dem IFT sind in Abb. 20 zusammengefasst. Nach Zugabe des neutralisierenden Antikörpers ging die Apoptoserate in den Gesamtpopulationen nicht-infizierter und infizierter Kulturen sowie in den parasit-positiven Zellen der infizierten Kultur leicht zurück, der Effekt schien allerdings unspezifisch zu sein, da der Rückgang in der Apoptoserate nicht dosisabhängig war und ebenfalls bei der Isotypkontrolle auftrat. Eine Aufhebung des antiapoptotischen Effekts intrazellulärer *T. gondii* konnte nicht beobachtet werden.

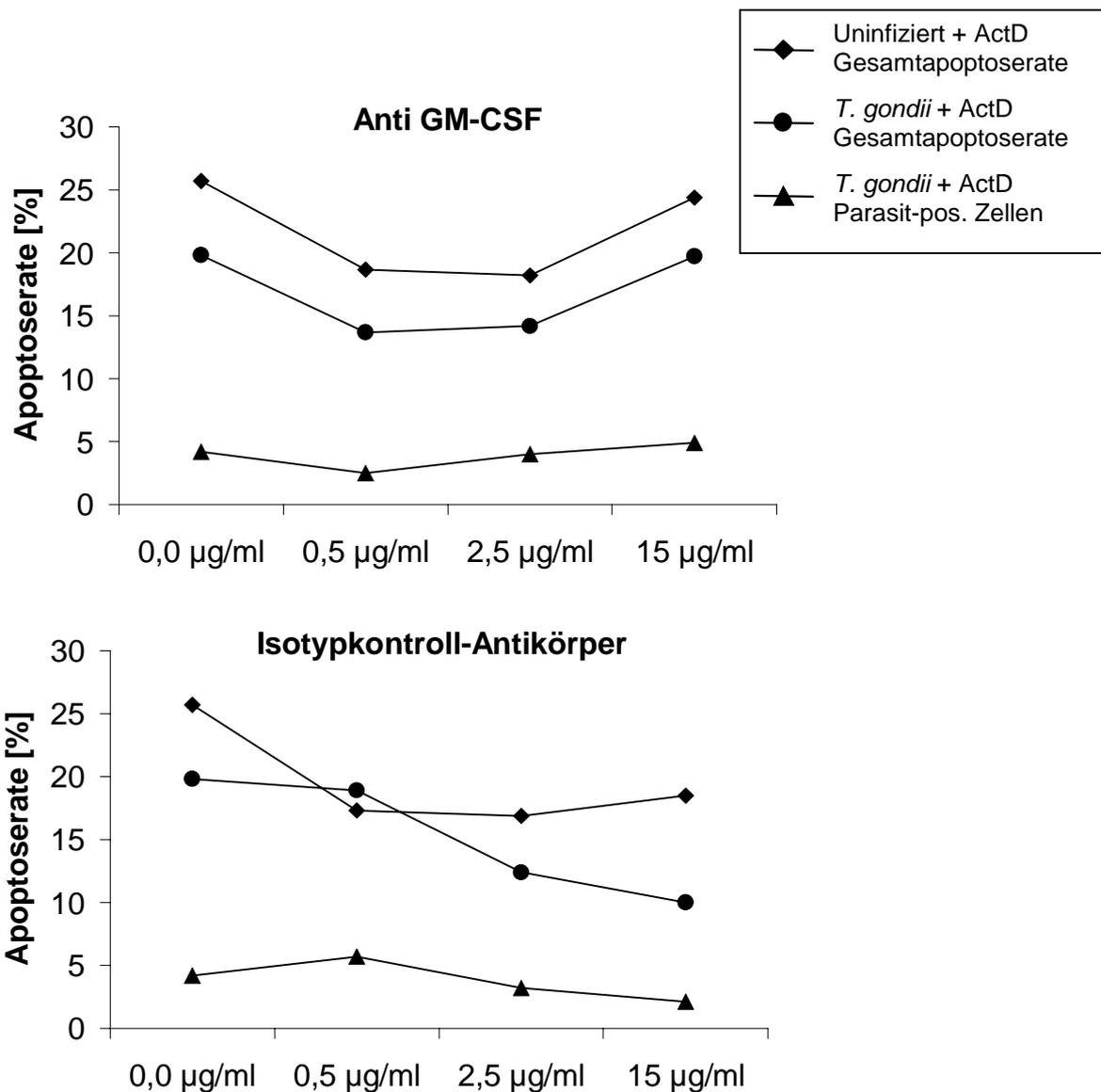


Abb. 20. Veränderung der Apoptoserate nach Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen GM-CSF in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 µg/ml ActD für 8 Stunden Apoptose induziert. Der neutralisierende Antikörper und die Isotypkontrolle wurden bei Infektion zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert, im IFT mit dem Hoechst 33258-Farbstoff angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurden pro Ansatz mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Rauten zeigen die Gesamtapoptoserate in uninfizierten Kulturen, in denen Apoptose mit ActD induziert wurde; die Kreise zeigen die Gesamtapoptoserate in *T. gondii*-infizierten Kulturen, in denen mit ActD Apoptose induziert wurde; und die Dreiecke zeigen die Apoptoserate in parasit-positiven Zellen der gleichen Kultur.

Als weitere Inhibitoren von Mcl-1 wurden 4-Aminopyridin (Wang et al., 1999b), Wortmannin und LY 294002 (Wang et al., 1999a) beschrieben, deren Wirkung auf die *T. gondii*-induzierte Apoptoseinhibierung in weiteren Versuchen untersucht wurde. Die Apoptoserate wurde dabei nach Infektion von HL-60-Zellen mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 und anschließender Inkubation mit 5 µg/ml

ActD für 8 Stunden im IFT mit der Hoechstfärbung untersucht, die Mcl-1-Inhibitoren wurden 2 Stunden (Wortmannin und LY 290002, nach Wang et al., 1999a) bzw. eine Stunde (4-Aminopyridin, nach Wang et al., 1999b) vor Apoptoseinduktion zugegeben. Da Wortmannin und LY 294002 in DMSO gelöst waren, wurden Kontrollansätze parallel mit 1,5 µg/ml DMSO inkubiert. In Abb. 21 sind die Ergebnisse für die Inhibitoren 4-Aminopyridin, Wortmannin und LY 294002 zusammengefasst. Nach der Behandlung mit 4-Aminopyridin und Wortmannin änderten sich die Gesamtapoptoseraten in nicht-infizierten und infizierten, ActD-behandelten Kulturen und in den parasit-positiven Zellen der infizierten Kultur nur wenig gegenüber der Kontrollkultur ohne Inhibitor. Zudem waren die Abweichungen in der Apoptoserate nicht dosisabhängig. Demgegenüber konnte nach Zugabe von LY 294002 ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate sowohl in der Gesamtpopulation bei nicht-infizierten und infizierten Kulturen, die ActD-behandelt waren, als auch in den parasit-positiven Zellen der infizierten Kultur beobachtet werden. Zudem wurde in den parasit-positiven Zellen eine Apoptoserate von 24,5% festgestellt, die somit deutlich über denen in parasit-positiven Zellen von unbehandelten oder mit anderen Mcl-1-Inhibitoren behandelten Kulturen lag.

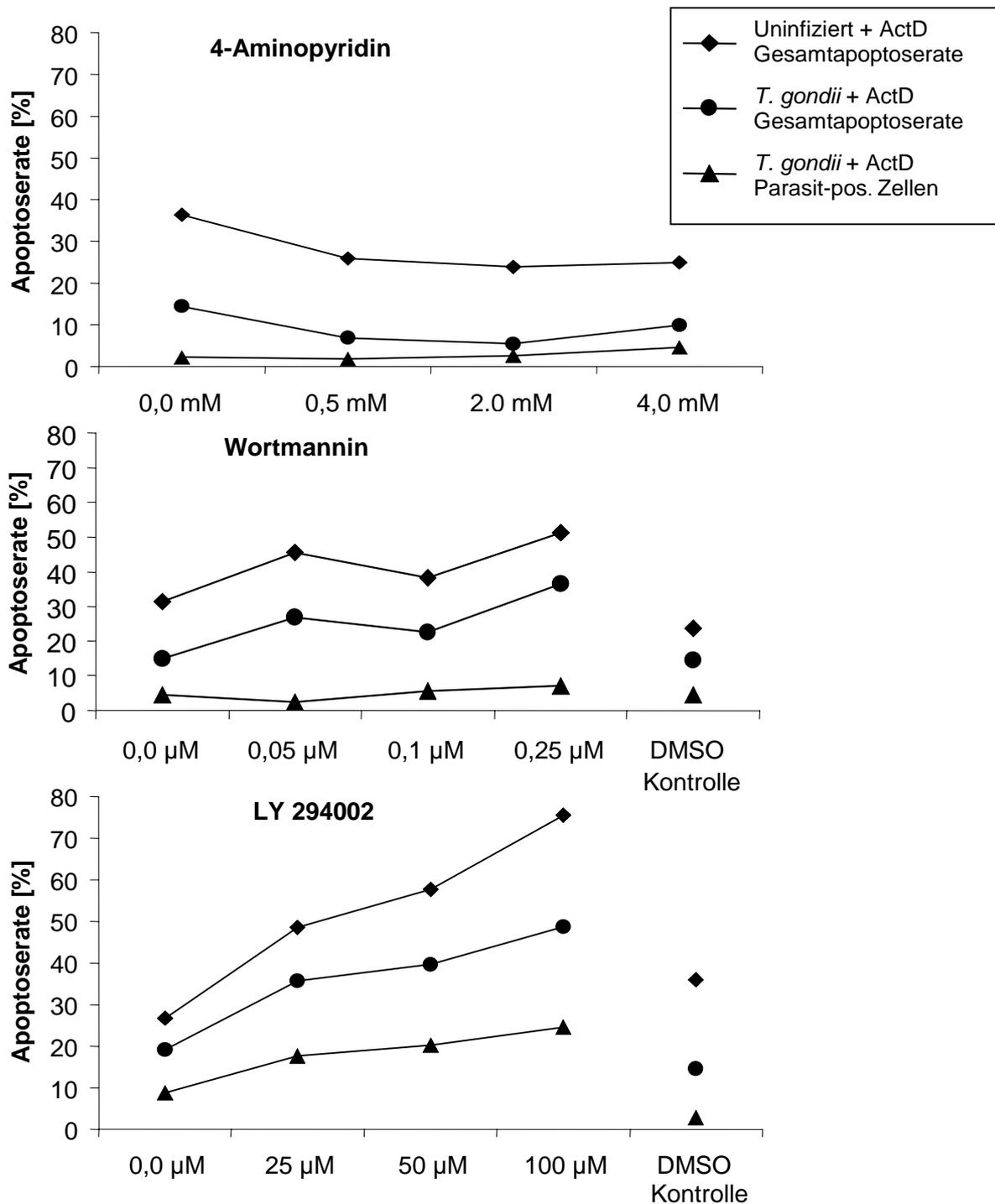


Abb. 21. Veränderung der Apoptoserate nach Zugabe der Mcl-1-Inhibitoren 4-Aminopyridin, Wortmannin und LY 294002 in *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten HL-60-Zellen. Die Zellen wurden mit *T. gondii* im Parasit-Wirtszellverhältnis von 30:1 infiziert und 30 min später wurde mit 5 μ g/ml für 8 Stunden Apoptose induziert. Die Mcl-1-Inhibitoren wurden 2 Stunden (Wortmannin und LY 290002) bzw. eine Stunde (4-Aminopyridin) vor Apoptoseinduktion zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert, im IFT mit dem Hoechst 33258-Farbstoff angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurden pro Ansatz mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Rauten zeigen die Gesamtapoptoserate in uninfizierten Kulturen, in denen Apoptose mit ActD induziert wurde; die Kreise zeigen die Gesamtapoptoserate in *T. gondii*-infizierten Kulturen, in denen mit ActD Apoptose induziert wurde; und die Dreiecke zeigen die Apoptoserate in parasit-positiven Zellen der gleichen Kultur.