

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Invasion, Replikation und Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii*  
in permanenten ZNS-Zelllinien der Ratte

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Tobias Abele

aus Besigheim

Würzburg, Juni 2002

Referent: Prof. Dr. med. U. Groß  
Korreferent: Prof. Dr. med. R. Gold  
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2003

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Erstbeschreibung des Parasiten	1
1.2 Biologie des Parasiten	1
1.3 Epidemiologie und Klinik der Toxoplasmose	2
1.4 Diagnostik und Therapie der Toxoplasmose	4
1.5 Toxoplasmose und HIV	5
1.6 Immunstatus des ZNS	6
1.7 Fragestellung	8
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Material	10
2.1.1 Geräte	10
2.1.2 Chemikalien	10
2.1.3 Antikörper	11
2.1.3.1 Primär-Antikörper	11
2.1.3.2 Sekundär-Antikörper	11
2.1.4 Immunmodulatoren	12
2.1.5 Lösungen und Puffer	12

2.1.6	Stammlösungen	12
2.1.7	Verwendete Zellen	13
2.1.7.1	Ratten Zellen	13
2.1.7.2	Murine Zellen	17
2.1.7.3	<i>Toxoplasma gondii</i> Isolate	18
2.1.8	Zellkulturmedien und Zusätze	18
2.1.9	Zellkulturmedien	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkulturtechniken	19
2.2.1.1	Auftauen der Zellen	19
2.2.1.2	Umsetzen der Zellen	20
2.2.1.3	Einfrieren der Zellen	20
2.2.1.4	Infektionsversuche	20
2.2.1.5	Isolierung der Parasiten	21
2.2.1.6	Immunfluoreszenztest	22
2.2.1.6.1	Fixierung	22
2.2.1.6.2	Färbung	22
2.2.1.7	<sup>3</sup> H-Uracil-Einbau-Versuche	23
2.2.1.8	Phagozytosehemmung	24
2.2.1.9	Induktion der Stadienkonversion	24
2.2.2	Statistik	25

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	26
3.1	Invasionsfähigkeit von <i>Toxoplasma gondii</i> in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte	26
3.2	Replikation von <i>Toxoplasma gondii</i> in Permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte	32
3.2.1	Ermittlung der Replikationsfähigkeit durch direkte Auszählung von Parasiten pro parasitophorer Vakuole	32
3.2.2	Ermittlung der Replikationsfähigkeit durch die <sup>3</sup> H-Uracil-Methode	36
3.3	Invasionsfähigkeit von <i>Toxoplasma gondii</i> in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte nach Phagozytosehemmung	39
3.4	Stadienkonversion von <i>Toxoplasma gondii</i> in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte	42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	45
4.1	Invasionsverhalten und Replikationsverhalten von <i>Toxoplasma gondii</i> in ZNS-Zellen	45
4.2	Stadienkonversion von <i>Toxoplasma gondii</i> in ZNS-Zellen	50
4.3	Vergleich verschiedener Versuchsmodelle zur Untersuchung von <i>Toxoplasma gondii</i>	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	56
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	58
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	77

## 1. Einleitung

### 1.1 Erstbeschreibung des Parasiten

*Toxoplasma gondii*, der wohl am weitesten verbreitete, obligat intrazellulär lebende Parasit, wurde erstmalig 1908 von C. Nicolle in Nordafrika/Tunis aus einem vorwiegend in der Wüste lebenden Nager, dem Gundi, isoliert.

Nach der anfänglichen Zuordnung zu den Leishmanien entschloss sich der französische Forscher jedoch, den Parasiten wegen seiner bogenförmigen Gestalt *Toxoplasma* (griech. *Bogengebilde*) zu nennen (Nicolle & Manceaux, 1908).

### 1.2 Biologie des Parasiten

Zum Stamme der Apicomplexa bzw. Sporozoa gehörend besitzt das Protozoon *T. gondii* zwei besondere Merkmale. Zum Einen den am Vorderpol hängenden Organellenkomplex, bestehend aus Konoid und Rhoptrien, sowie dem Apicoplasten. Während Konoid und Rhoptrien sowie Mikronemen und Dichte Granula als zum Teil sekretorische Organellen zur Invasion von Wirtszellen dienen, ist der Apicoplast durch sekundäre Endosymbiose entstanden und scheint unter anderem am Fettsäurestoffwechsel beteiligt zu sein (Roos et al, 1999).

Endwirt von *T. gondii* ist die Katze bzw. andere Vertreter der Felidae. Nur in ihnen ist die geschlechtliche Vermehrung, auch Gamogonie genannt, möglich. Katzen scheiden mit dem Stuhl Oozysten aus, welche sich über das Stadium der Sporozysten nach zwei bis vier Tagen zu infektiösen Sporozoiten entwickeln. Diese Formen sind infektiös für alle Zwischenwirte, d.h. Säugetiere, Vögel, und auch für den Menschen (Pfefferkorn, 1990). Letzterer infiziert sich vorwiegend durch den Verzehr von kontaminierter Nahrung, d.h. nicht ausreichend gegartem Fleisch und ungewaschenem Gemüse. Bei Katzenhaltern ist auch eine fäkal-orale Infektion möglich.

Während der Magen-Darm-Passage entsteht aus dem Sporozoiten ein Tachyzoit. Resistent gegenüber den Verdauungsenzymen Pepsin und Trypsin invadiert dieser die Darmwand des Wirtes und dringt in den Blutkreislauf ein (Dubey, 1998a). Durch die anfängliche Parasitämie wird eine zelluläre Immunabwehr induziert, die bei der Stadiendifferenzierung des Parasiten beteiligt zu sein scheint: *T. gondii* wandelt sich dabei in Bradyzoiten um, die innerhalb der Wirtszellen von einer Zystenwand umgeben sind (Remington & Desmonts, 1990).

Geschützt durch diese Zystenwand sowie einer reduzierten Expression von eigenen immunogenen Oberflächenproteinen wie z.B. SAG1, aber auch durch Reduktion von antigenpräsentierenden Proteinen (MHC Klasse II) der Wirtszelle, kann der Bradyzoit so lebenslang in dem von ihm befallenen Organismus persistieren (Burg et al, 1988; McLeod et al, 1992; Smith et al, 1996; Lüder et al, 1998). Bevorzugte Orte der Zystenpersistenz sind das Gehirn sowie Skelett- und Herzmuskel des jeweiligen Wirtes. Eine präferentielle Lokalisation in Neuronen ist ein weiterer Mechanismus, der es dem Parasiten ermöglicht, lange im Wirtsorganismus zu bestehen (Ferguson & Hutchison, 1987a).

### 1.3 Epidemiologie und Klinik der Toxoplasmose

Die Durchseuchung der Bevölkerung mit dem Parasiten ist je nach Region recht unterschiedlich. Während Schätzungen die Weltbevölkerung betreffend ca. 30% infizierte Individuen ergeben, sind in Mitteleuropa je nach Altersgruppe bis zu 70% der Einwohner *Toxoplasma*-positiv (Aspöck & Hermentin, 1987; Manson-Bahr, 1996). In Deutschland entspricht die Durchseuchung mit *T. gondii* ungefähr dem Lebensalter der entsprechend betrachteten Bevölkerungsgruppe. Unter den Neugeborenen rechnet man mit einer Erkrankungshäufigkeit von drei bis vier pro 1000 Neugeborenen (Enders, 1991; Gross, 1994).

Die Klinik der akuten Infektion mit *T. gondii* unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Alter des Patienten. Ein immunkompetenter Erwachsener entwickelt bei der Infektion mit Toxoplasmen, wenn überhaupt, eine nur sehr milde Symptomatik (Guy & Joynson, 1995). Zu beobachten sind hierbei gelegentlich schmerzhafte Lymphknotenschwellungen, vor allem zervikal und nuchal, Fieber sowie Abgeschlagenheit und ein generalisiertes Krankheitsgefühl. Diese Symptome kommen bei weniger als 5% der Infizierten vor, sind nicht stark ausgeprägt und halten meist nur wenige Tage an.

Die pränatale Infektion kann klinisch schwer verlaufen. Die Erstinfektion der Schwangeren im letzten Trimenon führt zwar häufig zur diaplazentaren Infektion der Frucht, klinische Symptome sind dann aber seltener. Infektionen in der Frühschwangerschaft enden dagegen häufig mit dem Abort, spätere Infektionen können zu Hydrozephalus, Chorioretinitis und intrazerebralen Verkalkungen des Kindes führen. Bei ca. 90% der infizierten Feten manifestiert sich die Toxoplasmose allerdings erst viele Jahre nach der Geburt, so dass sie perinatal symptomlos sind (Carter & Frank, 1986; Enders, 1991).

Neben vereinzelt Fällen einer Meningo-Enzephalitis treten echte Enzephalitiden bei einer Toxoplasmose in der Regel nur in immunschwachen (vor allem HIV infizierte) Individuen auf (Israelski et al., 1993). Bei AIDS-Kranken ist die zerebral reaktivierte Toxoplasmose die häufigste opportunistische ZNS-Erkrankung (Luft et al., 1984; Porter & Sande, 1992). Bei dieser Form der Toxoplasmose kommt es zur Rekonversion der Bradyzoiten in die Tachyzoiten-Form. Die dadurch gesteigerte Replikation der Parasiten führt dann wahrscheinlich zu einer mechanischen Ruptur der Zysten und somit zur Zerstörung der Wirtszelle (Luft et al., 1984; Wong et al., 1984; Frenkel et al., 1987; Reiter-Owona et al., 2000).

Klinisch zeigt sich hier das breite Spektrum der Apoplex-Symptomatik mit häufig letalem Ausgang, vor allem bei AIDS-Patienten. Auch schon vor einem messbaren Abfall der T-Helferzellen können sich hier lebensbedrohliche

Krankheitsbilder zeigen (Gervasoni et al., 1993). Neben der HIV-Infektion beeinträchtigen medikamentöse Immunsuppression, maligne Neoplasien sowie angeborene und erworbene Immundefekte die zelluläre Immunantwort des Menschen derart, dass *T. gondii* entweder in einer akuten Infektion nicht kontrolliert bzw. gehemmt werden kann oder dass eine persistierende Infektion reaktiviert wird (Israelski et al., 1993).

#### **1.4 Diagnostik und Therapie der Toxoplasmose**

Am häufigsten werden bei diagnostischen Untersuchungen die im infizierten Organismus entstandenen Antikörper der Immunglobulinklassen IgM, IgA, IgE und IgG als Beweis für eine mehr oder weniger akute Infektion mit *T. gondii* nachgewiesen. Dazu können Immunoblots oder gereinigte Antigene verwendet werden. Sowohl akute als auch chronische Infektionen lassen sich in der Regel serologisch eindeutig nachweisen, schwierig ist jedoch gelegentlich eine Differenzierung der beiden Infektionsarten. Klassische Tests hierfür sind der Farbstest nach Sabin und Feldman, direkte und indirekte Immunfluoreszenztests sowie die Komplementbindungsreaktion. Wie bereits erwähnt sind chronische Infektionen (meist bei immunschwachen Wirten), aber auch Primärinfektionen bei Schwangeren, konnatale und isolierte okuläre Toxoplasmosen schwerer zu diagnostizieren, weil in diesen Fällen oftmals spezifische Antikörper nur in nicht messbarer Konzentration gebildet werden können (Bessières et al., 1992a & b). In solchen Zweifelsfällen ist der direkte Tierversuch die Methode der Wahl. Hierbei wird zumeist Mäusen Blut, Liquor oder Fruchtwasser des zu untersuchenden Patienten intraperitoneal inokuliert und dann ca. einen Monat später mit Hilfe des Sabin-Feldman-Tests nach spezifischen Antikörpern gegen *T. gondii* in dem Versuchstier gesucht. Die Diagnostik mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist eine weitaus empfindlichere und schnellere Methode, die mittlerweile etabliert ist und auch routinemäßig eingesetzt wird (Gross et al., 1992; Grover et al., 1990; Martin, 1999).

Da in den meisten Fällen sowohl die akute als auch die chronische Verlaufsform der Toxoplasmose vor allem im Immungesunden klinisch inapparent oder mit nur sehr blander Symptomatik erscheint, bedarf nur ein geringer Teil der mit *T. gondii*-Infizierten einer medikamentösen Therapie. Typische Indikationen sind die konnatale Toxoplasmose, die Toxoplasmose-Enzephalitis oder eine Chorioretinitis. Jedoch auch der serologische Verdacht eines Primärinfektes in der Schwangerschaft ist behandlungsbedürftig. Die klassische Therapie besteht aus einer kombinierten Gabe von Pyrimethamin und Sulfonamiden. Eine Kombination von Pyrimethamin mit Clindamycin ist ebenfalls verbreitet und zeigt gute Behandlungserfolge. Auch der Einsatz von Atovaquone vor allem gegen Toxoplasma-Zysten ist möglich wobei auch hier keine vollständige Elimination der Zysten gegeben ist (Ferguson et al, 1994). Bei einem okulären Befall hat sich die zusätzliche Gabe von Steroiden zur Vermeidung einer Herxheimer-Reaktion bewährt (Krause & Gubler, 1999).

### **1.5 Toxoplasmose und HIV**

Bei ca. 10-20% der HIV-positiven Patienten zeigen sich neurologische Gesundheitsstörungen als erste Symptome dieser erworbenen viralen Immunschwäche (Mamidi et al, 2002). Ein Großteil dieser Erkrankten, ca. 36%, leiden bereits zu diesem Zeitpunkt an einer Toxoplasmen-Enzephalitis (Ammassari & Cingolani, 2000). Auch unter einer hoch aktiven antiretroviralen Therapie ist das Auftreten einer Enzephalitis durch *T. gondii* möglich, wobei hier nur eine wesentlich geringere Anzahl (0,1%) der AIDS-Kranken befallen ist (Abgrall et al., 2001). Bei ungefähr einem Drittel dieser Patienten endet der Verlauf letal. Ein frühzeitiger Beginn der medikamentösen Standard-Therapie, bestehend aus Pyrimethamin und Sulfadiazin, verspricht jedoch gute Erfolge. Da diese Behandlung oft mit schweren Nebenwirkungen und auch gelegentlich Rezidiven der Infektion verbunden ist, wäre in diesen Fällen das oral jedoch schlechter zu resorbierende Atovaquone eine Therapie-Alternative (Fung & Kirschenbaum, 1996; Scholer et al., 2001; Chirgwin et al., 2002).

## 1.6 Immunstatus des ZNS

Sowohl in der Körper-Peripherie als auch im ZNS spielt die humorale Immunantwort offenbar eine untergeordnete Rolle für die Überwindung einer Toxoplasmen-Infektion. Vor allem der zelluläre Anteil des Immunsystems ist entscheidend für den Verlauf einer Toxoplasmose. Dabei sind sowohl CD8+- als auch CD4+-T-Lymphozyten für die Immunabwehr der aktiven, aber auch der chronischen Infektion mit *T. gondii* besonders wichtig (Suzuki & Remington, 1988; Brown & McLeod, 1990; Gazzinelli et al., 1991; Araujo, 1992). CD8+-T-Lymphozyten spielen dabei während der Effektorphase gegen *T. gondii* eine zentrale Rolle, während CD4+-T-Lymphozyten vor allem regulatorischen Funktionen zukommen. Die Produktion von IFN- $\gamma$ , dem neben TNF- $\alpha$  wichtigsten Immunmodulator während der Infektionsphase, ist wohl die wesentlichste antiparasitäre Funktion dieser T-Zellen (Suzuki Y et al., 1988; Subauste & Remington, 1991; Deckert-Schlüter M et al., 1998).

Aufgrund seiner relativ geringen immunologischen Eigenreaktion auf schädigende Noxen wurde das Gehirn in vergangener Zeit häufig als sogenanntes immunprivilegiertes Organ bezeichnet. Inzwischen weiß man, dass dem ZNS sehr wohl ausgeprägte immunologisch wirksame Mechanismen zu Verfügung stehen, die bei Infektionen äußerst sensibel reguliert werden, um so die unnötige Zerstörung gesunder Zellen in diesem Organ mit doch eingeschränkten Regenerationsmöglichkeiten zu vermeiden. Sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Lymphozyten wurden bei experimentell infizierten Wirten intrazerebral identifiziert (Schlüter et al., 1991, 1995; Hunter et al., 1994a & 1994b). Auch konnte beobachtet werden, dass im Falle einer Infektion oder traumatischen Schädigung des zentralnervösen Systems Leukozyten aus der Körperperipherie zur Infektbekämpfung bzw. Defekt-Demarkierung rekrutiert werden können. Das für den Parasiten sowie für die T-Lymphozyten nötige Überwinden der Blut-Hirn-Schranke ist vor allem bei bakteriellen Erregern Gegenstand der Forschung und noch weitgehend unklar (Streit et al, 1988; Streit & Kincaid-Colton, 1995; Kettenmann & Ransom, 1995; Nassif et al., 2002).

Neuronen und Gliazellen sind die Hauptzellpopulationen im Gehirn. Die wichtigste zelluläre Möglichkeit, das adaptive Immunsystem zu aktivieren, ist die Präsentation von Antigenen in Form von Peptiden des Eindringlings auf speziellen Oberflächenproteinen, MHC I oder MHC II (Major Histocompatibility Complex) genannt, an der Außenseite der Wirtszelle. Diese MHC-präsentierten Antigene aktivieren dann CD4+-T-Zellen bzw. CD8+-T-Zellen, die dann antiparasitäre Immunmodulatoren freisetzen. Somit ist die Fähigkeit zur Expression von MHC-Molekülen eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung immunologischer Kompetenz im ZNS. In den letzten Jahren wurden hauptsächlich Mikroglia, aber auch Astrozyten, nicht jedoch Neuronen, als antigenpräsentierende Zellen im Gehirn nachgewiesen. (Hirsch et al., 1983; Vidovic et al., 1990; Panek & Beneviste, 1995; Shrikant & Beneviste, 1996; Hellendall & Ting, 1997). MHC I wird auf den meisten Körperzellen konstitutiv exprimiert, MHC II nur auf wenigen professionell antigenpräsentierenden Zellen, kann aber auf einer Reihe von Zellen induziert werden. Bei Mikroglia ist ebenso wie bei Astrozyten Interferon- $\gamma$  der wichtigste bekannte Induktor einer solchen MHC II-Expression. TNF- $\alpha$  konnte bei einer durch IFN- $\gamma$  bereits eingeleiteten Expression von MHC II-Molekülen zumindest bei Astrozyten als verstärkender Faktor identifiziert werden (Steimle et al., 1994; Collawn & Beneviste, 1999; Dong et al., 1999).

Die Möglichkeit zur Invasion und Replikation von *T. gondii* konnte in Mikroglia, Astrozyten sowie in Neuronen bisher mehrfach dargestellt werden (Jones et al., 1986; Peterson et al., 1995; Halonen et al., 1996; Fischer et al., 1997a; Lüder et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mikroglia- und/ oder Astrozytenzellen fähig sind, die intrazellulären Parasiten in ihrer Replikation spontan oder nach Zugabe von Interferon- $\gamma$  bzw. anderer Immunzytokinen zu hemmen. Dies könnte erklären, warum intrazerebrale Zysten von *T. gondii* hauptsächlich in Neuronen identifiziert wurden. In geringerer Menge wurden solche Zysten auch in Astrozyten, fast nie jedoch in Mikrogliazellen gefunden (Ferguson & Hutchinson, 1987; Sims et al., 1989).

## 1.7 Fragestellung

Vor allem die Persistenz im ZNS und die damit im Zusammenhang stehende Stadienkonversion sind für das Überleben des Parasiten extrem wichtig, machen ihn jedoch auch, zumindest für den immunschwachen Wirt, gefährlich. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, das intrazelluläre Verhalten des Parasiten zu erforschen. Entweder werden lebende Organismen experimentell infiziert (*in-vivo*) oder primäre bzw. permanente Zellen (*in-vitro*) in Zellkultur-Modellen verwendet. Zur Untersuchung der Stadienkonversion in ZNS-Zellen wurden bisher häufig Tiermodell-Versuche herangezogen. Favorisiert wurden hierbei Experimente an spezifischen Maus- bzw. Ratten-Stämmen (Ferguson & Hutchinson, 1987 a & b; Freyre et al, 2001; Kristensson et al, 2002).

Parallel zu *in-vivo* Infektionsversuchen sind Zellkultur-Versuche eine sehr wichtige Methode, um Invasions- und Replikationsverhalten, sowie die Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii* zu untersuchen. Einige *in-vitro* Versuche an primären Zellen von Mäusen oder Ratten wurden bisher veröffentlicht (Chao et al., 1993b; Lüder et al., 1999). Sie weisen gegenüber den Tierversuchen eine meist leichtere Reproduktionsfähigkeit, sowie eine geringere Anfälligkeit gegenüber externen Störungen auf. Zudem sind *in-vitro* Versuche ethisch unbedenklicher und kostengünstiger. Hier wurden bisher häufig primäre Zellen zu *in-vitro* Versuchen benutzt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Invasionsverhalten und Wachstumscharakteristik von *T. gondii* in permanenten Zelllinien mit der Infektionsbiologie von *T. gondii* in primären Zellen des ZNS vergleichbar sind. Außerdem wurde untersucht, ob unter diesen Umständen eine spontane oder induzierte Stadienkonversion zu beobachten ist. Auch sollte untersucht werden ob Zellart-spezifische Unterschiede zwischen Neuronen, Gliazellen oder z.B. Muskelzellen bei oben genannten Kriterien vorhanden sind. Hierbei wurden hauptsächlich Zelllinien aus dem Nervensystem von Ratten benutzt, weil der

klinische Verlauf einer Toxoplasmose in Ratten dem der humanen Toxoplasmose eher gleicht, als beispielsweise einer Toxoplasma-Infektion in Mausstämmen (Dubey 1998; Zenner et al., 1998).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysenwaage:	Modell R 160P, Sartorius
Brutschränke:	BB6220, Heraeus, Osterode
Photomikroskop:	Aristoplan, Leitz, Wetzlar
pH-Meter:	Modell pH 530, WTW
Sterilbank:	LaminAir HB 2472, Heraeus
Szintillationszähler:	1205 Betaplate, Wallac Pharmacia
Zentrifugen:	
Zellkultur:	Omnifuge 2.0 RS, Heraeus
Ultrazentrifuge:	FL-100, Beckmann
Tischzentrifuge:	Biofuge 15, Heraeus

Zellkulturplatten und -flaschen, sowie weitere Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Braun, Melsungen;  
 Eppendorf, Hamburg;  
 Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg;  
 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach;  
 Nunc, Roskilde, DK;  
 Sartorius, Göttingen.

#### 2.1.2 Chemikalien

[5,6-<sup>3</sup>H]-Uracil [1 mCi/ml]      NEN, Dupont, Bad Homburg

Proteine und Enzyme:

    Biomol, Hamburg;

Boehringer, Mannheim;  
Sigma, Deisenhofen.

Chemikalien und Feinchemikalien:

Becton-Dickinson, Heidelberg;  
BioRad, München;  
Boehringer, Mannheim;  
Gibco, Gaitersburg, USA  
Merck, Darmstadt;  
Sigma, Deisenhofen.

### **2.1.3 Antikörper**

#### **2.1.3.1 Primär-Antikörper:**

Polyklonales anti-Toxoplasma-Serum (Kaninchen)

Institutseigene  
Herstellung

DC11, bradyzoitenspezifischer monoklonaler  
Ratten-Antikörper

(Groß et al. 1995)

#### **2.1.3.2 Sekundär-Antikörper:**

Esel-anti-Kaninchen IgG (DTAF-konjugiert)

Dianova, Hamburg

Esel-anti-Kaninchen IgG (Cy3-konjugiert)

Dianova, Hamburg

Esel-anti-Ratte IgG (Cy2-konjugiert)

Dianova, Hamburg

### 2.1.4 Immunmodulatoren

Lipopolysaccharid (LPS)	Boehringer, Mannheim
Nerve Growth Factor 2,5 (NGF)	Boehringer, Mannheim
Ratten-Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Boehringer, Mannheim
Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Boehringer, Mannheim

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

Einfrierlösung	FCS 40%, DMSO 20%, 40% Zellkultur-Medium
Fixierungspuffer	PBS 4% Formaldehyd
Cetrimide-Lysepuffer	1% Cetrimide, Amidoschwarz 10B 0,05% in 0,1 M Essigsäure
Propidiumjodid	
Trypanblau	

### 2.1.6 Stammlösungen

LPS	10 $\mu$ g/ml in H <sub>2</sub> O
Myxothiazol	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Natriumnitroprussid	30 mg/ml in H <sub>2</sub> O
N-monomethyl-L-arginine	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Oligomycin	1 mg/ml in Ethanol
TNF- $\alpha$	10 $\mu$ g/ml in H <sub>2</sub> O

## 2.1.7 Verwendete Zellen

### 2.1.7.1 Ratten Zellen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich adhärent wachsende Zellen verwendet. Das Anhaften der PC12 Zellen während der Versuche wurde durch eine Beschichtung der Deckplättchen mit Kollagen erreicht.

	Zellart	Besonderheiten
C6	Gliazellen	Phagozytose, Ran-1
B12	Gliazellen	
B92	Gliazellen	
B50	Neuronen	
B65	Neuronen	
PC12	Phäochromozytomzellen	Dendritenentwicklung nach Zugabe von NGF, Ran-1
33B	Schwannomzellen	Phagozytose, Ran-1
L6 C10	Muskelzellen	Ausbildung langer kontraktiler Zellverbände
208F	Fibroblastenzellen	

### C6

C6 sind Nitrosomethylurease-induzierte Gliom-Tumor-Zellen der Ratte. Diese Zelllinie wurde im Gegensatz zu einigen der oben bereits erwähnten Zellen in der Literatur wesentlich genauer erforscht und beschrieben. Direkt nach der Erstbeschreibung (Benda et al, 1968) wurde bei C6-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Oberflächenprotein, das für Gliazellen typische S100, entdeckt und beschrieben (Benda, 1968; Pfeiffer et al, 1970 & 1971; Hagiwara & Sueoka, 1995). Ebenso früh wurde eine deutliche Phagozytose mit noch unklarem, jedoch von dem der

Makrophagen abweichendem Mechanismus erkannt. Diese Fähigkeit war bisher häufig Gegenstand von Untersuchungen. So konnte gezeigt werden, dass C6 in der Lage ist, Mikroorganismen wie Nocardien, aber auch Eisenoxid-Partikel aktiv zu inkorporieren und intrazellulär das Wachstum der Krankheitserreger zu hemmen (Beaman & Beaman, 1994; Zimmer, 1995). Auch konnte mit Hilfe der Phagozytose eine Reihe von glykolytischen Enzyme (z.B. Hexokinase, jedoch auch D-Glyceralaldehydphosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase) an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran detektiert werden (Daum et al, 1988).

Eine weitere Enzymausstattung, die parallel zu den o.g. B65-Neuronen besteht, ist das Vorhandensein sowohl einer adulten, als auch einer embryonalen Glutamatdecarboxylase (Bond et al, 1990). Auch die Adhäsion von C6-Zellen gelingt scheinbar durch dieselben Glycoprotein-Rezeptoren und Ganglioside wie in B65, wobei auch hier der Glycoprotein-Fibronectin-Bindung die größere Bedeutung zukommt (Williams, 1985).

Ebenfalls parallel zu B65 besitzen C6 mindestens einen Typ von GABA-Rezeptoren, jedoch konnte bisher keine GABA-erge Reaktionen der Zellen nachgewiesen werden (Kasckow et al, 1992; Hales & Tyndale, 1994; Tyndale et al, 1994).

Im infizierten Zustand exprimieren C6 ähnlich wie reaktive Astrozyten sehr viel GFAP (glial filament acidic protein) (Bovolenta, 1993).

Aktuell wurden C6 auch zu Apoptose-Versuchen verwendet, und es konnte entdeckt werden, dass sie ebenso wie B12-Gliazellen einen für die Neuronenentwicklung und das Neuritenwachstum bedeutsamen neurotrophen Faktor produzieren (Krajci et al, 2000; Armstrong & Niles, 2002)

## **B12**

B12 ist eine weitere durch Nitrosoethylurease induzierte Tumorzelllinie, ausgehend von Gliazellen der Ratte. Aktionspotentiale konnten an der Zellmembran nachweislich nicht ausgelöst werden. Auch die enzymatische

Ausstattung dieser Zellen (Acetylcholinesterase, Butyrylthiocholinesterase) bzw. Produktion von Transmitterstoffen z.B. Gammaaminobuttersäure (GABA) ist nur sehr gering (Schubert et al., 1974).

## **B92**

Ebenso wie B12 ist diese Gliom-Zelllinie wenig reaktiv, zeigt jedoch eine deutlich höhere Aktivität von Acetylcholin- und Butyrylthiocholinesterase (Schubert et al., 1974).

## **B50, B65**

B50 und B65 sind zwei ebenfalls durch Nitrosoethylurease induzierte permanente Neuronenzelllinien des ZNS der Ratte. Sowohl bei B50 als auch bei B65 ist nach ausreichendem Stimulationsreiz ein Aktionspotential an der Zellmembran auslösbar (Schubert et al., 1974). Beide Zelllinien sind neurochemisch eher diskret, wobei B50 cholinerge und B65 catecholaminerge Zellen sind (Lai et al., 1993). Unter dem Einfluss von Natriumbutyrat zeigte sich bei beiden Zelllinien eine Induktion von Natriumkanälen aller drei Subtypen (Baines et al, 1992).

Bei B65-Zellen konnte ebenso wie bei C6 und PC12 ein Rezeptor für Gammaaminobuttersäure (GABA) beschrieben werden, jedoch zeigten alle drei Zelllinien unter Zugabe von GABA keine spezifischen Reaktionen (Kasckow et al, 1992; Hales & Tyndale, 1994; Tyndale et al, 1994).

Sowohl B65 als auch C6 Zellen exprimieren mRNA für adulte bzw embryonale Isotypen der Glutamatdecarboxylase. Somit eignen sich beide Zelllinien als günstiges Zellmodell für die Frühphase der ZNS-Zell-Differenzierung (Bond et al., 1990). Die Adhäsion von B65-Zellen betreffend konnte frühzeitig Glycoprotein-Rezeptoren sowie Gangliosiden eine große Bedeutung zugewiesen werden. Eine Blockade der oben genannten Oberflächenproteine zeigte eine

deutliche Hemmung der Zell-Adhäsion an Fibronectin (Stallcup, 1988). Diese neuronalen Zell-Adhäsions-Moleküle (N-CAM) konnten auch bei Zellen der Gliazelllinien C6 und B12 entdeckt werden (Williams, 1985).

## **PC 12**

Die herausragende Eigenschaft dieser Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte ist das Tragen eines Rezeptors für den Nerve-Growth-Faktor (NGF). Unter regelmäßiger Zugabe dieses Wachstumsfaktors konnte die Bildung von dendriten-ähnlichen Ausläufern mikroskopisch beobachtet werden. Alle Versuche wurden mit diesen Zellen mit und ohne NGF-Zugabe durchgeführt. Die mit dem Wachstumsfaktor behandelten Zellen werden in dieser Arbeit als PC12 mit dem Zusatz + ausgewiesen. Zusätzlich ist auch eine Fähigkeit zur Produktion von Katecholaminen bei PC12 beschrieben (Greene & Tischler, 1976; Biocca et al., 1983; Levi et al, 1985; Weber et al, 1996). Bei den Infektionsversuchen wurden PC12 mit (PC12+) und ohne (PC12) Zugabe von NGF untersucht. Um die oben beschriebenen Zellausläufer bilden zu können, wurden PC12+ bei jedem Versuch 24h vor den restlichen Zellen ausgesät.

## **33B**

33B sind wie die meisten dieser permanenten Zelllinien N-ethyl-N-nitrosourease-induzierte Tumor-Zellen des ZNS der Ratte. Früh wurden sie als Schwannom-Zellen identifiziert, wobei auch der Nachweis des gliaspezifischen Oberflächenproteins Ran-1 hilfreich war. Ran-1-positiv sind ebenso die Zelllinien C6 und PC12 (Fields, 1977; Fields & Dammerman, 1985).

Nach Zugabe von Lymphokinen konnte bei 33B eine deutliche Phagozytosefähigkeit nachgewiesen werden (Band & Talwar, 1986; Band et al, 1986a; Band et al, 1987b). Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Phagozytosemechanismus dem von Makrophagen ähnlich ist (Band et al, 1986b; Band et al,

1987a). Auch die Fähigkeit zur Expression eines Nerve-Growth-Factor-Rezeptors geringer Affinität wurde nachgewiesen (Kahle & Hertel, 1992).

### **L6 C10**

Da in der Literatur häufig auch in Muskelgewebe Toxoplasma-Zysten beschrieben wurden lag es nahe zur vergleichenden Betrachtung neben all den ZNS-Zelllinien eine Muskelzelllinie mit in die Versuche einzubeziehen. L6 C10 ist, als Subklon von L6, eine Zelllinie der Skelettmuskulatur der Ratte. In Zellkultur konnte eine Fusion zu mehrkernigen Myotubes und auch quergestreiften Muskelfasern beschrieben werden. Unregelmäßige spontane Kontraktionen dieser Formationen sind literarisch erwähnt. Diese Eigenschaft schwindet jedoch mit der Dauer der Zellkulturpassage (Yaffe, 1968; Richler & Yaffe, 1970; Mandel & Pearson, 1974; Osawa et al, 1996 a & b).

### **208F**

Diese Fibroblastenzelllinie wurde als Subklon eines Fischer-Ratten-Stammes isoliert (Topp, 1981). Bisher wurden in der Literatur keine auffälligen Zelleigenschaften beschrieben. Sie wurden dieser Arbeit als Kontrollgruppe verwendet.

#### **2.1.7.2 Murine Zellen**

### **L929**

Murine Fibroblasten zur Parasiten-Kokultur

### 2.1.7.3 *Toxoplasma gondii* Isolate

NTE (Groß et al., 1991)

### 2.1.8 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM	Biochrom, Berlin
HAM	Biochrom, Berlin
RPMI	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin
Natrium-Bikarbonat	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
MEM-Vitamine	Biochrom, Berlin
Pferdeserum (HS)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco, Gaitersburg, USA

### 2.1.9 Zellkulturmedien

<b>L6 C10</b>	10% FCS (50 ml)
<b>33B</b>	5ml Penicillin/Streptomycin
<b>B50, B65</b>	5ml Natrium-Pyruvat
<b>B92</b>	ad 500 ml DMEM
<b>C6</b>	10% FCS
	5ml Penicillin/Streptomycin
	5ml Glutamin
	ad 500 ml HAM

<b>B12</b>	5% FCS 5ml Penicillin/Streptomycin ad 500 ml DMEM
<b>PC 12</b>	10% FCS 5% HS 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml Glutamin ad 500ml RPMI1640
<b>L929</b>	5% FCS 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml Natrium-Pyruvat 5ml Glutamin ad 500 ml RPMI 1640

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkulturtechniken**

#### **2.2.1.1 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und ca. 1 min lang in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in ca. 40 ml des entsprechenden bereits erwärmten Zellkulturmediums geschüttet.

Bei 1360 rpm wurden die Zellen dann 5 min lang zentrifugiert, um danach in 1 ml Medium aufgenommen und auf vier Näpfe einer 6-Napf Platte verteilt zu werden.

### **2.2.1.2 Umsetzen der Zellen**

Die in Abwesenheit von Collagen nicht-adhären wachsenden PC12-Zellen wurden als Suspension auf ca. 1/3 – 1/4 des Volumens reduziert, sobald nach etwa 2-3 Tagen der Farbindikator des Mediums eine pH-Änderung zum sauren Bereich hin anzeigte.

Alle restlichen Zelllinien wuchsen adhären und wurden, sobald konfluente Zellrasen entstanden, im Verhältnis 1:4 - 1:6 gesplittet. Hierbei wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und 1 ml EDTA-Lösung je Napf einer 6-Napf-Platte auf die Zellen gegeben. Diese führte als  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Komplexbildner zu einer Hemmung der eventuell vorhandenen Trypsininhibitoren, was die nachfolgende Ablösung der Zellen durch Trypsin erleichterte. Lichtmikroskopisch wurde anschließend unter Zuhilfenahme von Verdünnungsreihen die Zellzahl bestimmt und auf die gewünschte Konzentration gebracht, in der die Zellen dann wieder in ihr entsprechendes Medium eingebracht wurden.

### **2.2.1.3 Einfrieren der Zellen**

Die Zellen wurden, falls nötig wie unter 2.2.1.2 beschrieben vom Boden der Brutplatten abgelöst und dann bei 1360 rpm 5 min lang zentrifugiert. Anschliessend wurde die Zellzahl bestimmt und auf  $1 \times 10^7$  /ml eingestellt. Daraufhin wurden je Kryoröhrchen 500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension und 500  $\mu\text{l}$  Einfriermedium einpipettiert. Übernacht wurden die Zellen dann bei  $-80$  °C eingefroren, um am nächsten Tag in den Stickstoff-Behälter überführt zu werden.

### **2.2.1.4 Infektionsversuche**

Die Invasion, sowie die Replikation des Parasiten wurde in folgenden Infektionsversuchen bestimmt. Monolayer der einzelnen Zelllinien wurden von einem parallelen Versuchsansatz von einem Glasdeckplättchen mit Cetrimidlysepuffer abgelöst, ausgezählt und nach Bestimmung der Zellzahl die übrigen Zelllinien mit einer fünffach höheren Dosis von Toxoplasmen infiziert. Die Bestimmung

der Invasionsfähigkeit von *T. gondii* erfolgte 24h und 48h post infectionem durch Immunfluoreszenzmikroskopie, wobei der Anteil der infizierten Zellen bestimmt wurde. Dafür wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt. Um die Replikation des Parasiten zu bestimmen, wurden 48h nach Infektion 100 parasitophore Vakuolen ausgezählt und die durchschnittliche Anzahl Parasiten pro Vakuole errechnet.

#### **2.2.1.5 Isolierung der Parasiten**

Die Toxoplasmen wurden in L929-Mausfibroblasten passagiert. In einer 12-Napf-Zellkulturplatte wurden Wirtszellen und Parasiten in verschiedenen Verhältnissen ausgesät. Nach einer Woche wurden frisch durch Parasitenvermehrung lysierte Zellen resuspendiert und zuerst die Wirtszellreste durch 5 min Zentrifugieren bei 300 rpm sedimentiert. Danach wurde der Überstand aus diesem 50 ml Röhrchen in ein weiteres überführt und dann erneut, jedoch bei 1350 g über 10 min lang und bei langsamer Beschleunigung bzw. Abbremsung, zentrifugiert. Anschliessend wurde das parasitenhaltige Sediment in 1 ml RPMI mit 1% FCS aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer die Parasitenkonzentration bestimmt.

### **2.2.1.6 Immunfluoreszenztest**

Zum Nachweis sowohl der Tachyzoiten als auch der Bradyzoiten wurde die Methode der doppelten Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

Hierbei wurden als Primär-Antikörper polyklonales anti-Toxoplasma-Serum und der monoklonale, bradyzoiten-spezifische Antikörper DC11 verwendet. Die Bindung der Antikörper an Toxoplasmen wurde mit folgenden Antikörpern nachgewiesen:

Esel-anti-Kaninchen IgG (DTAF-konjugiert)

Esel-anti-Kaninchen IgG (Cy3-konjugiert)

Esel-anti-Ratte IgG (Cy2-konjugiert)

#### **2.2.1.6.1 Fixierung**

Alle Zellen und Parasiten wurden vor Ihrer Anfärbung entweder eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank in 4%igem Paraformaldehyd fixiert.

Danach wurde die Fixierungslösung mit PBS weggespült; die Glasdeckplättchen konnten dann weiterhin in 0,02%iger Natriumazidlösung bis zur endgültigen Färbung bei 10 °C gelagert werden.

#### **2.2.1.6.2 Färbung**

Nach jeweils 10 min Spülen in PBS und 50 mM NH<sub>4</sub>Cl/PBS wurden die Glasdeckplättchen in 1% bovinem Serumalbumin, 0,1 mg/ml Saponin in PBS eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde 3 x 10 min in 0,1 mg/ml Saponin in PBS gespült. Dann wurden die Glasplättchen umgekehrt auf einen Tropfen von ca. 30 µl der jeweiligen Primärantikörper-Lösung gelegt, abgedeckt und so wiederum 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der polyklonale Antikörper wurde 1: 2500 (beim isolierten Nachweis der Tachyzoiten) bzw. 1: 500 (beim Nachweis der Bradyzoiten) und der monoklonale,

bradyzoitenspezifische Antikörper (DC 11) 1 : 50 verdünnt in 0,1 mg/ml Saponin, 1% BSA in PBS eingesetzt. Nach weiterem dreimaligem Spülen in Saponin/PBS-Lösung wurde in derselben Weise wie der Primärantikörper nun der Nachweisantikörper hinzugegeben. Ein letztes Mal wurde 3 x 10 min mit der Saponin/PBS-Lösung gespült und danach mit reinem PBS. Die Gesamtzellpopulation wurde durch 5 minütige Inkubation mit 5 µg/ml Propidiumjodid in PBS gefärbt. Abgeschlossen wurde die Immunfluoreszenzfärbung nach weiterem Spülen in PBS durch das Eindeckeln der Plättchen auf Glasobjektträger in Mowiol.

### **2.2.1.7 <sup>3</sup>H-Uracil-Einbau-Versuche**

Als weitere Möglichkeit, die Replikationsfähigkeit des Erregers zu untersuchen, wurde die <sup>3</sup>H-Uracil-Methode gewählt. Da ausschließlich der Parasit und nicht die Wirtszelle Uracil verstoffwechselt, zeigt der Anstieg der gemessenen Aktivität zwischen den einzelnen Intervallen den Wachstumsindex der Toxoplasmen an (Pfefferkorn & Pfefferkorn 1977 a und b). Hierbei wurde in drei aufeinander folgenden 24-stündigen Intervallen Tritium-markiertes Uracil in einer Aktivität von 80 µCi/ml den infizierten Wirtszellen zugegeben. Zuerst wurden die Wirtszellen in 96-Napf-Platten ausgesät. Die Näpfe der PC12- Zelllinie wurden vorher mit Poly-L-Ornithin beschichtet, um die Adhärenz dieser Zellen zu garantieren. Mit drei unterschiedlichen Mengen von Parasiten (15 000, 30 000, 60 000 je Napf) wurden dann 24h später alle Zelllinien infiziert.

Zu Beginn der jeweiligen Zeitintervalle (0-24h p.i., 24-48h p.i., 48-72h p.i.) wurde dann das <sup>3</sup>H-Uracil zugegeben und nach Ablauf der 24 Stunden die Zellen auf Filtermatten geerntet. Diese wurden nach dem Trocknen in Szintillationsflüssigkeit eingebettet, eingeschweißt und dann in einem Beta-Plate-Szintillationszähler ausgewertet. Zur Ermittlung der genauen Aufnahme des <sup>3</sup>H-Uracil wurden jeweils parallel uninfizierte Zellen als Leerwert gemessen.

### 2.2.1.8 Phagozytosehemmung

Um eine aktive Invasion des Erregers von einer zellulär bedingten Phagozytose unterscheiden zu können, wurden die Zellen kurz vor der Infektion mit 0,001% Glutaraldehyd behandelt und fixiert (Nichols & O'Connor, 1981).

Es wurden wie oben beschrieben Zellen ( $1 \times 10^5$  je Zelllinie) auf Glas-Deckplättchen ausgesät, so dass 24h später ein dichter Monolayer entstanden war. Das Glutaraldehyd wurde in Acetat-Veronal-Puffer mit 7% Sucrose gelöst und fünf Minuten lang auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde noch einmal mit Acetat-Veronal-Puffer, allerdings ohne den Zusatz von Sucrose und Glutaraldehyd, gespült. Nach weiterem Spülen mit Medium wurden Toxoplasmen in 5- bzw. 10-facher Zellzahl hinzugegeben. Drei Stunden später wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Glasplättchen mit Toxoplasma-infizierten Zellen wurden mit einem Cy2-markierten polyklonalen Antikörper und Propidiumjodid gefärbt. Von 500 Zellen wurde nun 24h p.i. direkt mikroskopisch der Anteil jener Zellen, die Toxoplasmen intrazellulär enthielten bestimmt.

### 2.2.1.9 Induktion der Stadienkonversion

Ebenfalls auf Glas-Deckplättchen wurden hierbei jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Einen Tag später wurden diese im Verhältnis 1:1, 3:1 oder 5:1 mit Toxoplasmen infiziert. Direkt danach wurden die jeweiligen Induktoren zugegeben und entsprechend alle 24 oder 48 Stunden erneuert, bis 4 bzw 6 Tage p.i. die Zellen nach zweimaligem Spülen in PBS in 4 % Paraformaldehyd fixiert wurden.

Alternativ wurde zur Fixierung der Zellen eiskaltes Methanol verwendet.

Als Induktoren wurden verwendet:

Interferon  $\gamma$  25 U/ml + LPS 10 ng/ml

Interferon  $\gamma$  50 U/ml

Interferon  $\gamma$  100 U/ml

Interferon  $\gamma$  100 U/ml + NMMA 100 $\mu$ M

Interferon  $\gamma$  100 U/ml + TNF  $\alpha$  50 ng/ml

Oligomycin 0,5 µg/ml

Oligomycin 2 µg/ml

SNP 70 µM

SNP 100 µM

Myxothiazol 0,1 µg/ml

Oligomycin und Myxothiazol wurde nur alle 48h zugegeben, während SNP sowohl 24- als auch 48- stündig erneuert wurde. Anfänglich wurde ein Mediumwechsel nur jeden zweiten Tag durchgeführt, später je nach Farbumschlag des Mediums auch täglich direkt vor Zugabe der Induktoren.

### **2.2.2 Statistik**

Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zur Ermittlung der Mittelwerte je Versuchsreihe wurde zusätzlich der Standardfehler des Mittelwertes errechnet und ausgewiesen. Auf eine weitere statistische Aufarbeitung wurde aufgrund der geringen Anzahl von Reproduktionen verzichtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Invasionsfähigkeit von *Toxoplasma gondii* in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte

Zur Ermittlung der Infektionsrate von *T. gondii* in ZNS-Zelllinien der Ratte sowie der Kontrollgruppe 208F-Fibroblasten wurden Monolayer der Zellen mit einer fünffach höheren Dosis an Toxoplasmen infiziert, dann 24h und 48h post infectionem (p.i.) mit einem polyklonalen Antikörper in einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt und anschließend parasitpositive Zellen gezählt.

Schon nach den ersten Vorversuchen zur Ermittlung der idealen Zellanzahl pro Glasplättchen und der entsprechenden Infektionsdosis konnte erkannt werden, dass in allen verwendeten Zelllinien Toxoplasmen intrazellulär darstellbar sind. Dadurch wurde gezeigt, dass der Parasit generell in der Lage ist, sämtliche Zellen *in-vitro* zu infizieren. 24 und 48 Stunden p.i. sind Parasiten durch Immunfluoreszenzfärbung in allen Zellkulturlinien nachzuweisen (Abb.1-8).

Außerdem zeigte sich, dass in C6-Zellen deutlich häufiger intrazellulär gelegene Parasiten nachzuweisen waren, als in den restlichen Zelltypen. Mindestens die Hälfte aller C6-Zellen zeigte 24h und 48h p.i. nach der Immunfluoreszenzfärbung intrazellulär angefärbte Parasiten (Abb.1, 9 u. 10). Die übrigen Zelllinien der Gliazellen, B12 und B92, zeigten zu beiden Untersuchungszeitpunkten relativ homogene Infektionsraten zwischen 8 und 14%. Neuronen zeigten etwas unterschiedlichere Ergebnisse. Während 24h p.i. Invasionsraten von B50- und B65-Zellen durchschnittlich bei 16% bzw 21% lagen, waren die Werte mit jedoch höherem Standardfehler 48h nach der Infektion etwas niedriger.

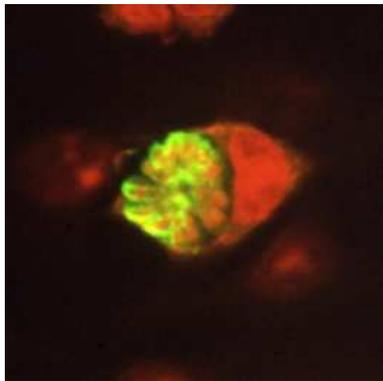


Abb.1

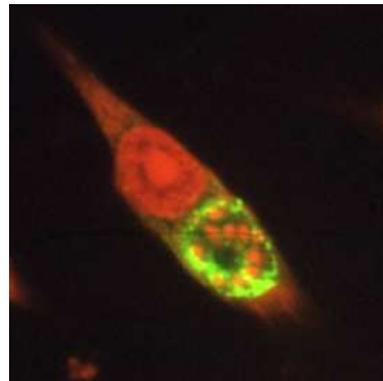


Abb.2

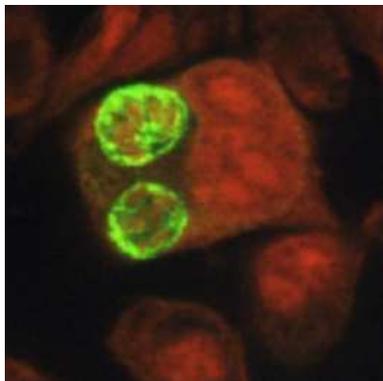


Abb.3

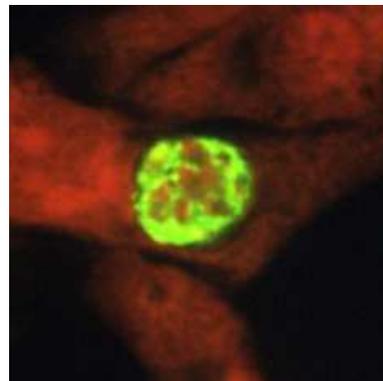


Abb.4

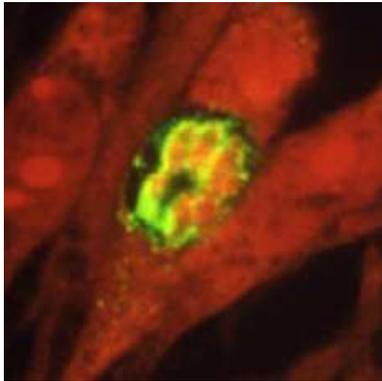


Abb.5

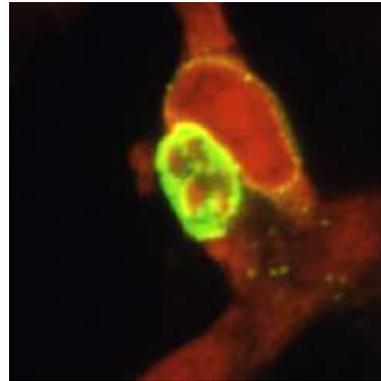


Abb.6

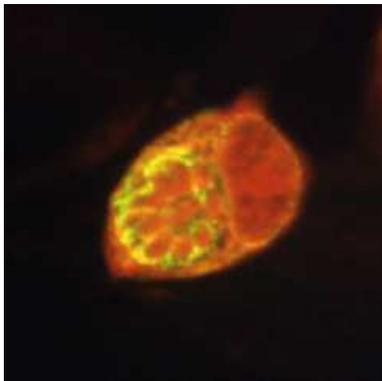


Abb.7

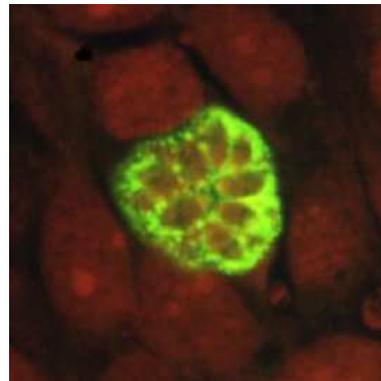


Abb.8

Abb.1-8: Immunfluoreszenz-Färbung und Mikroskopie von *Toxoplasma gondii* infizierten Tumorzelllinien des ZNS und Kontrollzellen der Ratte. 48 h nach *in-vitro* Infektion wurden die Parasiten primär mit einem polyklonalen Antikörper markiert. Anschließend wurde dieser durch Zugabe eines fluoreszein-konjugierten Sekundär-Antikörper (grün-leuchtend) angefärbt. Die Propidiumjodid-Färbung der Zellekerne und der Parasitkerne ist rot dargestellt.

(Abb.1-3: C6/ B12/ B92 – Gliazellen; Abb.4-5: B50/ B65-Neuronen; Abb.6: 33B- Oligodendrozyten; Abb.7: L6 C10- Muskelzellen; Abb.8: 208F- Fibroblasten). Nicht gezeigt PC12 und PC12+.

Im Gegensatz hierzu zeigten PC12 sowohl mit (PC12+) als auch ohne Zugabe des Wachstumsfaktors NGF unter beiden Versuchsbedingungen ziemlich konstante Werte. 24h und 48h p.i. waren PC12+ mit ca. 12% parasitpositiven Zellen geringfügig höher infiziert als PC12 mit weniger als 10% infizierter Zellen je Versuch. Bei der Oligodendrozytenzelllinie 33B konnten unterschiedliche Infektionsraten ermittelt werden. Während 24h p.i. über 14% der Zellen intrazellulär Parasiten trugen, waren es 48h p.i. weniger als 4%. Muskelzellen L6C10 waren wenig infiziert und zeigten ebenso wie die Kontrollzelllinie 208F in beiden Experimenten konstante Infektionszahlen, wobei die der Kontrollgruppe mit je 8% etwas höher war.

Am auffälligsten ist sicherlich die Infektionsrate von *T. gondii* in C6-Gliazellen, die trotz beträchtlichem Standardfehler einen deutlichen Unterschied zu allen anderen Zelllinien hat. Die bei 48h p.i. generell niedrigere Anzahl an Zellen mit intrazellulär dargestellten Toxoplasmen lässt sich durch das Wachstum der nicht-infizierten Zellen in den 24 Stunden zwischen den Versuchen erklären. Mikroskopisch konnten 48h p.i. spezifische Unterschiede zwischen den Zellarten (siehe farbliche Gruppierungen in den Abbildungen) nicht beobachtet werden. Durch die herausragenden Invasionsraten der C6-Zellen zeigte sich jedoch in der Gruppe der Gliazelllinien eine deutliche Inhomogenität der Ergebnisse, während bei Neuronen und PC12-Zellen eher ein gleichmäßiges Verhalten bezüglich der Invasionsfähigkeit des Parasiten zu erkennen war.

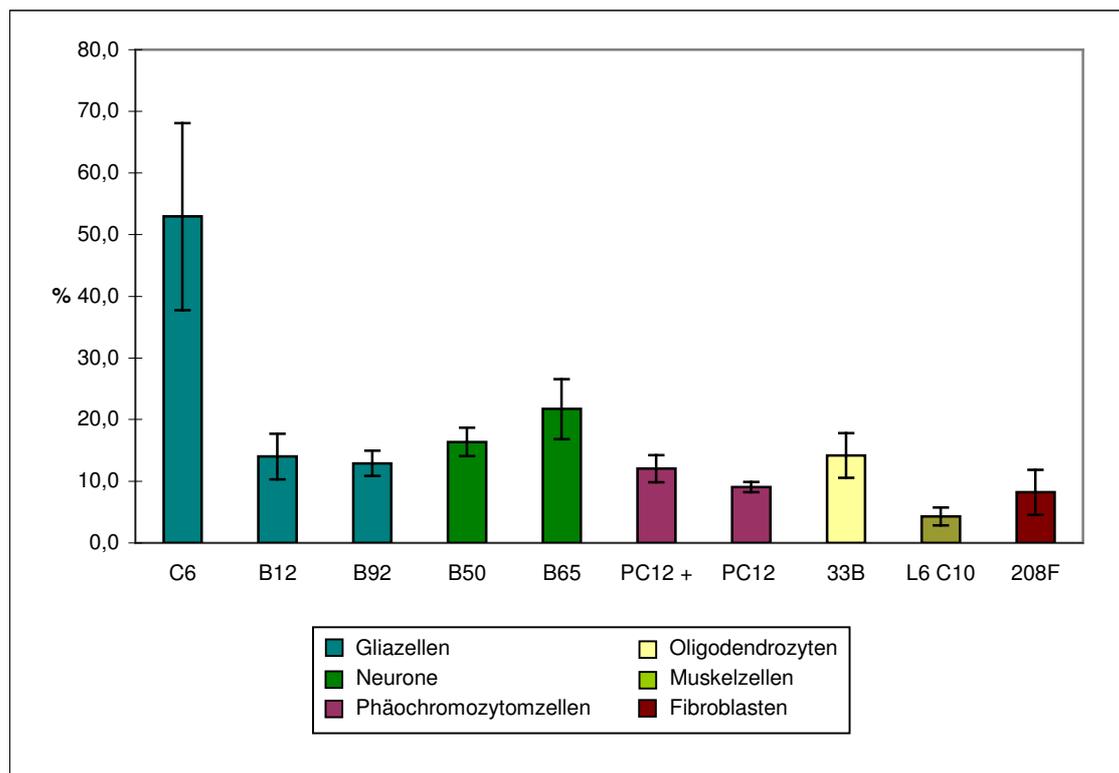


Abb.9: Prozentsatz infizierter ZNS-Tumorzelllinien und Kontrollzellen der Ratte 24h p.i. mit *T. gondii*. Nach Infektion und Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem anti-Toxoplasma-Antikörper und Färbung der Gesamtzellpopulation mit Propidiumjodid wurden von 500 Zellen der *T.gondii*-positive Anteil der Zellen direkt mikroskopisch bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler aufgetragen.

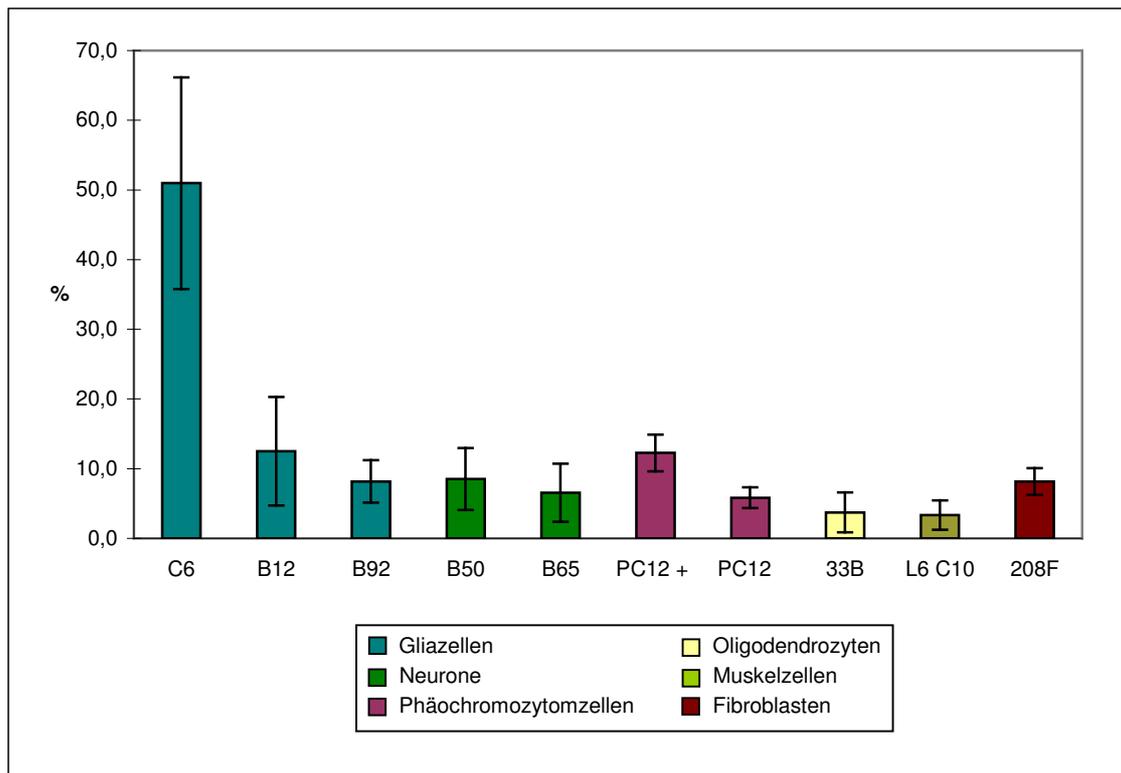


Abb.10: Prozentsatz infizierter ZNS-Tumorzelllinien und Kontrollzellen der Ratte 48h p.i. mit *T. gondii*. Nach Infektion und Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem anti-Toxoplasma-Antikörper und Färbung der Gesamtzellpopulation mit Propidiumjodid wurden von 500 Zellen der *T.gondii*-positive Anteil der Zellen direkt mikroskopisch bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen mit Standardfehler aufgetragen.

### **3.2 Replikation von *Toxoplasma gondii* in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte**

#### **3.2.1 Ermittlung der Replikationsfähigkeit durch direkte Auszählung von Parasiten pro parasitophore Vakuole**

Um das intrazelluläre Wachstum des Parasiten beurteilen zu können, wurde die Entwicklung von *T. gondii* 48h p.i. nach Immunfluoreszenzfärbung in den parasitophoren Vakuolen beobachtet.

Zwei Tage nach Infektion mit *T. gondii* zeigten sich in allen Zellkulturlinien parasitophore Vakuolen von heterogener Größe. Die durch die ersten drei bis vier synchronisierten Teilungen des Parasiten entstehende typische Rosettenbildung war hierbei in allen benutzten Zellkultur-Linien sichtbar (Abb.1-8). Somit wurde eine Einteilung der Vakuolen nach der Anzahl intrazellulärer Parasiten möglich (Tab.1). Infizierte C6 Zellen zeigten hier die höchste Zahl an PV mit nur 1-2 Toxoplasmen. Mehr als 2/3 aller sichtbaren Vakuolen konnten dieser kleinsten Gruppe zugezählt werden. Ebenfalls hohe Prozentzahlen von ca. 60 % dieser kleinen PV waren bei PC 12, sowohl mit als auch ohne NGF, der Gliazelllinie B12 sowie den 208F-Fibroblasten zu ermitteln. Große PV waren neben der Gliazelllinie B92 und den Fibroblasten nur in den Zellen neuronalen (B50, B65) und muskulären (L6C10) Ursprungs zu finden.

Die niedrige Parasitenlast in den parasitophoren Vakuolen der Gliazelllinie C6 wurde auch durch Berechnung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro parasitophorer Vakuole deutlich (Abb.11). Auch hier zeigte sich in der Gruppe der Zelllinien neuroglialer Herkunft nach Ermittlung der durchschnittlichen Anzahl von Toxoplasmen je PV ein recht heterogenes Bild. So waren im Gegensatz zu den C6-Zellen in den Zellen der B92-Linie im Durchschnitt 6-8 Parasiten pro PV vorhanden. Damit wurden in B92-Zellen Werte ermittelt, die im Bereich derer von Neuronen-Zelllinien lagen. Die höchste Anzahl Parasiten je PV zeigten jedoch die Muskelzelllinie L6C10 mit durchschnittlich  $9,1 \pm 2,1$  Toxoplasmen/PV, neben der Oligodendrozytenzelllinie 33B mit ca.  $8,2 \pm 1,3$  Toxoplasmen/PV.

Ähnlich wie C6, B12 und 208F zeigten PC12 unter beiden Wachstumsbedingungen im Durchschnitt ungefähr 4 Parasiten/PV. B50 und B65 enthielten als Neuronen-Zellen mehr als durchschnittlich 6 Parasiten/PV, gehörten also einheitlich zu den Zelllinien, in denen ein Wachstum von *Toxoplasma gondii* in höherem Maße möglich war. PC12-Zellen zeigten unter Zugabe von NGF eine nur gering höhere durchschnittliche Parasitenzahl/PV als ohne.

Das stärkste Wachstum von Toxoplasmen in intrazellulären parasitophoren Vakuolen war in der Muskelzelllinie L6C10 vor der Oligodendrozytenzelllinie 33B zu beobachten. Neuronen (B50/B65) ließen ebenfalls relativ homogen ein deutliches Parasitenwachstum erkennen. Die Gruppe der Gliazelllinien bot im Gegensatz hierzu eher unterschiedliche Ergebnisse. Während C6 und B12 nur geringes Parasitenwachstum in der parasitophoren Vakuole zeigte, war die durchschnittliche Anzahl von Toxoplasmen/PV in B92 Gliazellen mit 6,8 Parasiten/PV sogar etwas höher als die der Neuronenzelllinie B65.

Die Ursache hierfür könnte in der Differenzierung der Gliazelllinien liegen. In Mikroglia konnte *in-vivo* als auch *in-vitro* nach Infektion deutlich weniger Zystenbildung beobachtet werden als in Astroglia. Es scheint daher, dass C6 sich eher mikroglia-, B92 mehr astrozytentypisch verhält. Auch die in der Einleitung erwähnte präferentiell hohe Anzahl von Zysten in Neuronen wird durch diese Ergebnisse eher bestätigt (Suzuki, 2002).

Tabelle 1:

**Replikation von *Toxoplasma gondii* in permanenten ZNS-Zelllinien und Kontrollzellen der Ratte**

**prozentualer Anteil parasitophorer Vakuolen je Zelllinie 48h p.i. \***

	<u>1-2 T.g./PV</u>	<u>4-8 T.g./PV</u>	<u>16-32 T.g./PV</u>	<u>&gt;32 T.g./PV</u>
<b>C6</b>	<b>68,3±2,6</b>	<b>30,1±1,9</b>	<b>1,7 ±1,2</b>	<b>0</b>
<b>B12</b>	<b>59,6±6,3</b>	<b>29,7±7,3</b>	<b>7,4 ±3,3</b>	<b>0</b>
<b>B92</b>	<b>32,2±7,4</b>	<b>56,7±5,2</b>	<b>10,4±3,2</b>	<b>0,7±0,7</b>
<b>B50</b>	<b>31,0±8,7</b>	<b>49,7±4,3</b>	<b>18,6±4,1</b>	<b>0,7±0,3</b>
<b>B65</b>	<b>48,4±7,1</b>	<b>37,9±4,9</b>	<b>13,4±10,8</b>	<b>0,3±0,3</b>
<b>PC12 + NGF</b>	<b>58,1±2,8</b>	<b>40,7±2,3</b>	<b>2,9 ±0,4</b>	<b>0</b>
<b>PC12</b>	<b>62,7±9,2</b>	<b>34,4±8,3</b>	<b>2,9 ±1,7</b>	<b>0</b>
<b>33B</b>	<b>39,9±4,6</b>	<b>38,0±4,7</b>	<b>22,1±6,2</b>	<b>0</b>
<b>L6 C10</b>	<b>28,0±11,7</b>	<b>42,3±7,0</b>	<b>23,1±5,5</b>	<b>3,3±2,0</b>
<b>208F</b>	<b>62,8±3,0</b>	<b>31,2±1,7</b>	<b>5,6 ±3,2</b>	<b>0,3±0,3</b>

Bestimmung nach Immunfluoreszenzfärbung und mikroskopischer Auswertung

\* Mittelwerte ± Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten

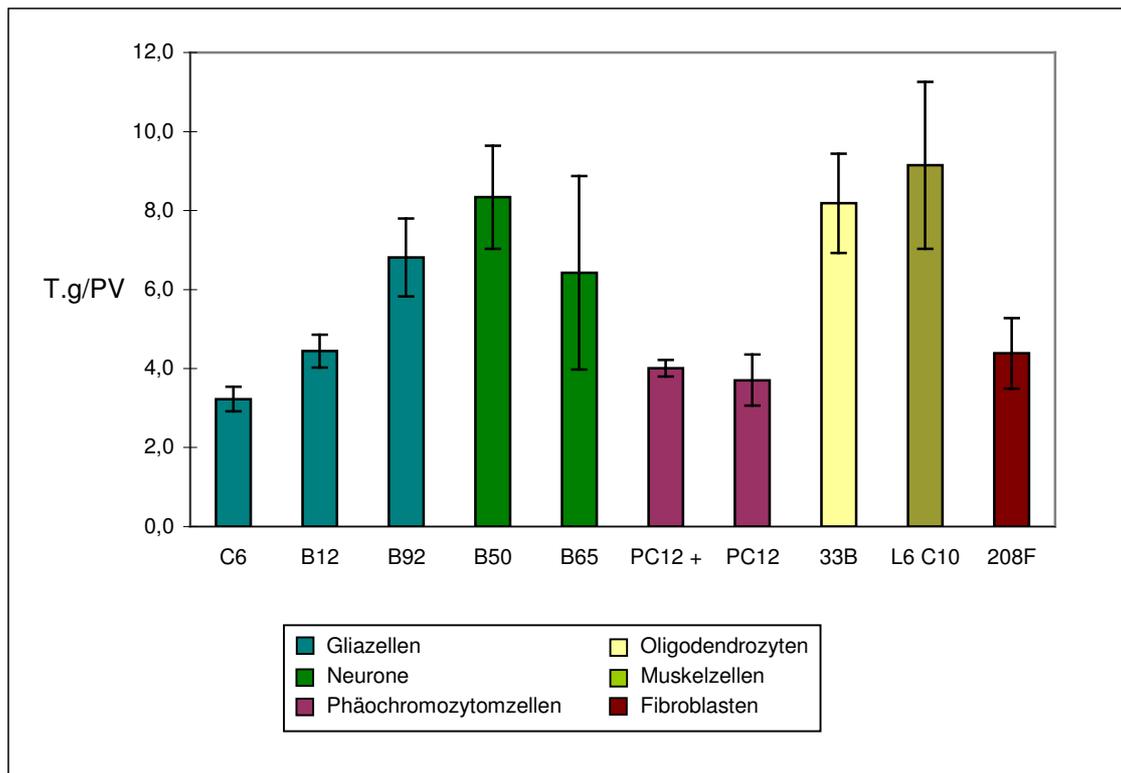


Abb.11: Durchschnittliche Anzahl von *Toxoplasma gondii* je parasitophorer Vakuole in ZNS-Tumor-Zelllinien und Kontrollzellen der Ratte. 48h p.i. nach Immunfluoreszenzfärbung mit polyclonalem anti-Toxoplasma-Antikörper und Färbung der Gesamtpopulation mit Propidiumjodid wurden 100 PV je Zelllinie mikroskopisch ausgezählt, die durchschnittliche Parasitenanzahl errechnet und der Mittelwert mit Standardfehler ausgewiesen. (T.g./PV = T. gondii je parasitophore Vakuole)

### 3.2.2 Ermittlung der Replikationsfähigkeit durch die $^3\text{H}$ -Uracil-Methode

Eine weitere Möglichkeit die Replikationsfähigkeit des Parasiten zu erforschen, bietet die  $^3\text{H}$ -Uracil-Methode. Diese beruht auf der Fähigkeit des Parasiten im Gegensatz zu seiner Wirtszelle  $^3\text{H}$ -markiertes Uracil in seinem Stoffwechsel verwerten zu können. Die Radioaktivität des so in die Nucleinsäure des Parasiten eingebauten Uracils konnte gemessen werden und steht im direkten Zusammenhang zur Stoffwechselaktivität der Toxoplasmen (Pfefferkorn & Pfefferkorn, 1977 a & b).

Es wurde die  $^3\text{H}$ -Uracil-Aufnahme in drei 24-stündigen Intervallen gemessen, um somit eine Bestimmung des Wachstumsindex ohne Einfluss der Infektionsrate zu ermöglichen. Hierbei wurden als Zeiträume 0-24, 24-48 und 48-72 Stunden post infectionem gewählt.

Die 24-Stunden-Werte der  $^3\text{H}$ -Uracil-Aufnahme von 24-48h p.i. und 48-72h p.i. wurden durch den jeweils vorhergehenden dividiert und somit die Wachstumsindices von Tag 1-2 und 2-3 ermittelt. Während bei der niedrigsten Infektionsdosis von 15.000 Toxoplasmen nur eine geringe Einbaurrate von  $^3\text{H}$ -Uracil festzustellen war (nicht-gezeigte Ergebnisse), waren bei der Infektion mit 30.000 und 60.000 Parasiten deutliche Einbauraten zu messen. Die Verwendung der Zelllinie C6 zeigte hier den höchsten  $^3\text{H}$ -Uracil-Einbau (Abb.12 und 13). Auch bei Nutzung der Neuronenzelllinie B65 sowie der Schwannomzelllinie 33B, neben der Gliazelllinie B92 und 208F Fibroblasten wurde im Vergleich zu den anderen Zelllinien viel  $^3\text{H}$ -Uracil in die Nucleinsäure der Parasiten eingebaut. Bei diesen vier Zellkultur-Linien war zu beobachten, dass die Parasiten in den ersten zwei Tagen deutlich mehr  $^3\text{H}$ -Uracil einbauten als am dritten Tag. Die niedrigste Aufnahme von Tritium-markiertem Uracil in allen Versuchen zeigte PC12, wobei diese nach Zugabe von NGF noch etwas geringer war als bei dessen Abwesenheit. B12-Gliazellen sowie die Muskelzelllinie L6C10 zeigten bei dieser Methode eher niedrige Wachstumsraten, wobei L6C10 am 3. Tag ein stärkeres Wachstum zeigte als am Tag zuvor. Wie schon in den bisherigen Versuchen konnte auch hier Zellart-spezifisches Verhalten nur begrenzt beobachtet

werden. Auch hier sei auf den teilweise recht großen Standardfehler bei drei Versuchen hingewiesen.

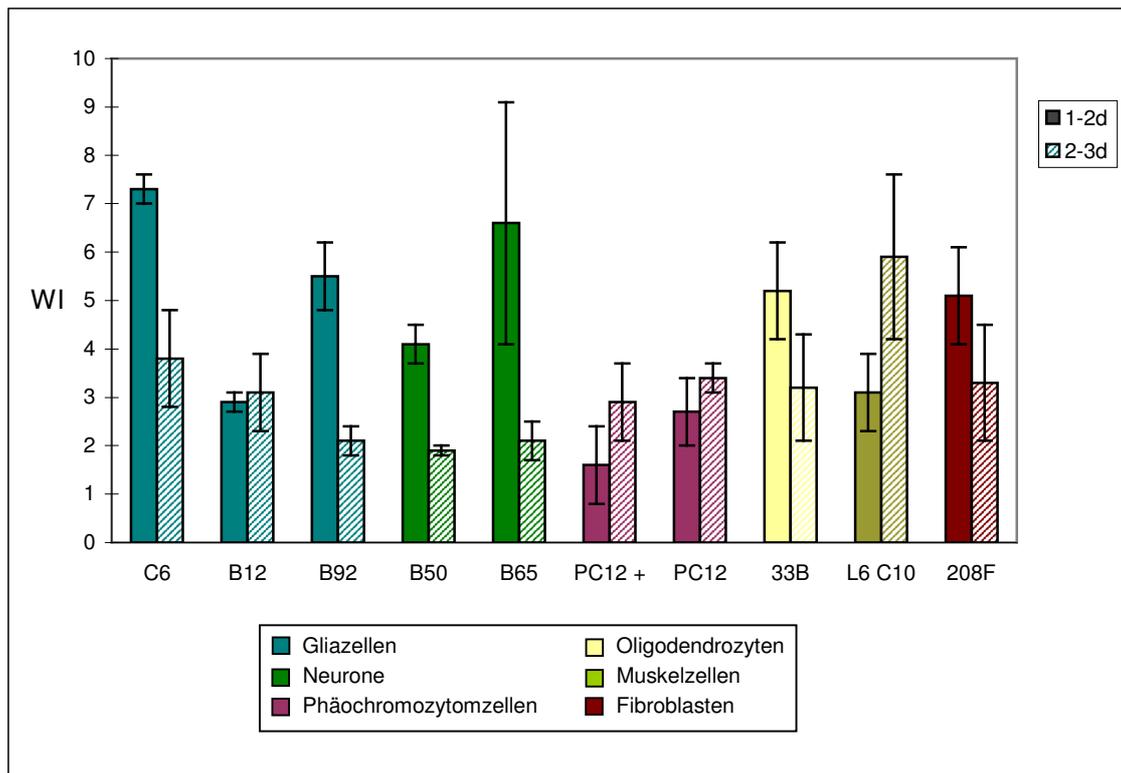


Abb.12: Wachstumsindices von *T. gondii* in ZNS-Zelllinien und Kontrollzellen der Ratte p.i. mit 30 000 Parasiten nach der  $^3\text{H}$ -Uracil-Methode.  $^3\text{H}$ -Uracil-Aufnahme wurde in 24h-Intervallen an den Tagen 1, 2 und 3 p.i. gemessen. Abzüglich der uninfizierten Nullwerte wurde die Steigerung zwischen den drei 24h-Werten als Faktor für das intrazelluläre Wachstum der Parasiten bestimmt. Der Mittelwert mit Standardfehler wurde hier aufgeführt. (WI = Wachstumsindex)

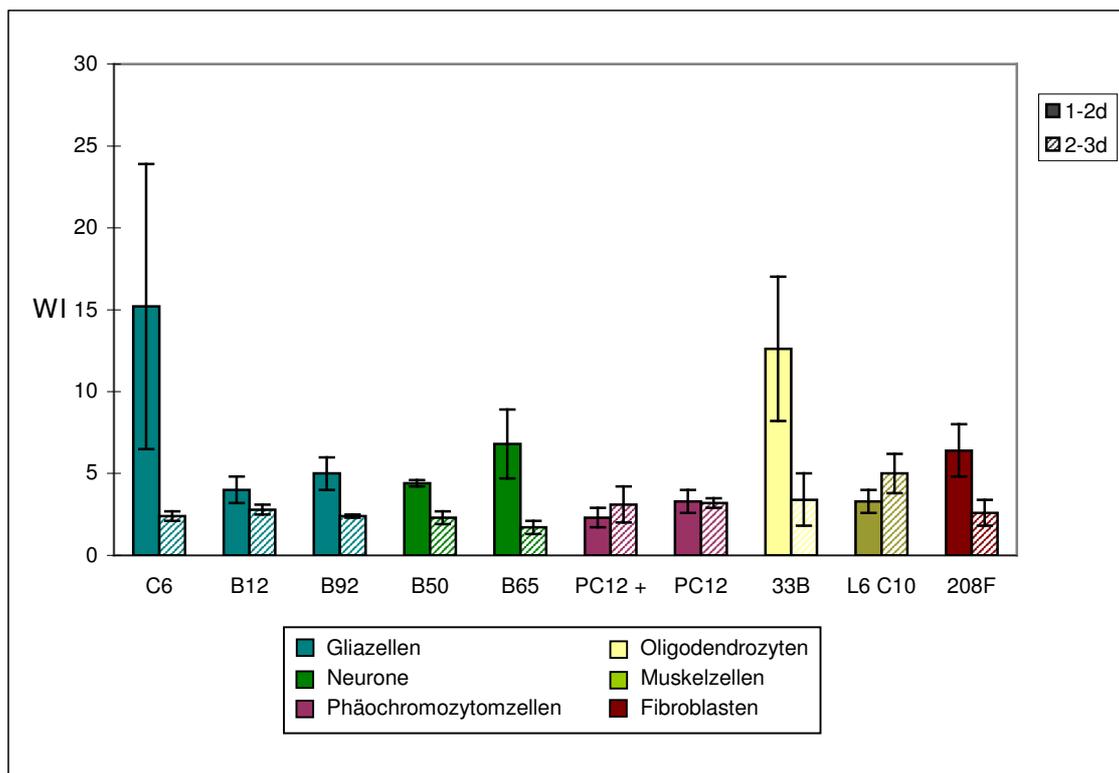


Abb.13: Wachstumsindizes von *T. gondii* in ZNS-Zelllinien der Ratte und Kontrollzellen p.i. mit 60.000 Parasiten nach der  $^3\text{H}$ -Uracil-Methode.  $^3\text{H}$ -Uracil-Aufnahme wurde in 24h-Intervallen an den Tagen 1, 2 und 3 gemessen. Abzüglich der uninfizierten Nullwerte wurde die Steigerung zwischen den drei 24h-Werten als Faktor für das intrazelluläre Wachstum der Parasiten bestimmt. Der Mittelwert mit Standardfehler wurde hier aufgeführt. (WI = Wachstumsindex)

### 3.3 Invasionsfähigkeit von *Toxoplasma gondii* in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte nach Phagozytosehemmung

*T. gondii* verfügt über ausgeprägte Mechanismen wahrscheinlich alle Zellarten aktiv invadieren zu können. Um eine Phagozytose der Zellen als Ursache für die intrazellulär vorhandenen Parasiten auszuschließen, wurden die hier verwendeten Zellen prä infectionem mit Glutaraldehyd (GA) behandelt. Durch diese Fixation konnte bei den so behandelten Zellen eine Fähigkeit zur Phagozytose für die folgenden Infektionsversuche ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Zellen mit 5- bzw. 10-facher Dosis an Parasiten wie oben beschrieben inkubiert.

Die so ermittelten Ergebnisse bestätigen die unter 3.1 beschriebenen Resultate aus den Invasionversuchen (Abb.14-15). Zu beachten ist, dass bei Verwendung der höheren zehnfachen Infektionsdosis versuchsbedingt alle Zellen durchschnittlich höher infiziert sind als bei der niedrigen Dosis.

Erneut konnten alle Zelllinien deutlich infiziert werden, und erneut waren auch hier C6-Gliazellen mit Abstand am häufigsten infiziert. Interessanterweise konnte erkannt werden, dass in fast allen Zelllinien nach der Behandlung mit Glutaraldehyd deutlich weniger Zellen parasit-positiv waren als ohne GA-Behandlung. Einzig C6 zeigten kaum unterschiedliche Invasionsraten mit und ohne Fixation durch GA unter beiden Versuchsbedingungen. Beide anderen Gliazelllinien (B12, B92) ließen nach ihrer Behandlung mit GA deutlich weniger intrazelluläre Parasiten erkennen als ohne. Ebenso waren die Neuronenzelllinien B50 und B65 ohne GA-Phagozytosehemmung deutlich stärker parasitiert als nach dieser Fixierung der Zellen. Auch PC12 zeigten eine erheblich niedrigere Invasionsrate durch *T. gondii* nach Behandlung der Zellen mit GA, wobei die Werte mit und ohne Zugabe von NGF annähernd identisch waren. Die Oligodendrozytenzelllinie 33B war, neben 208F-Fibroblasten als Kontrollgruppe und der Muskelzelllinie L6C10 nach Phagozytosehemmung wesentlich geringer infiziert als vorher. L6C10 zeigten jedoch auch den größten Standardfehler.

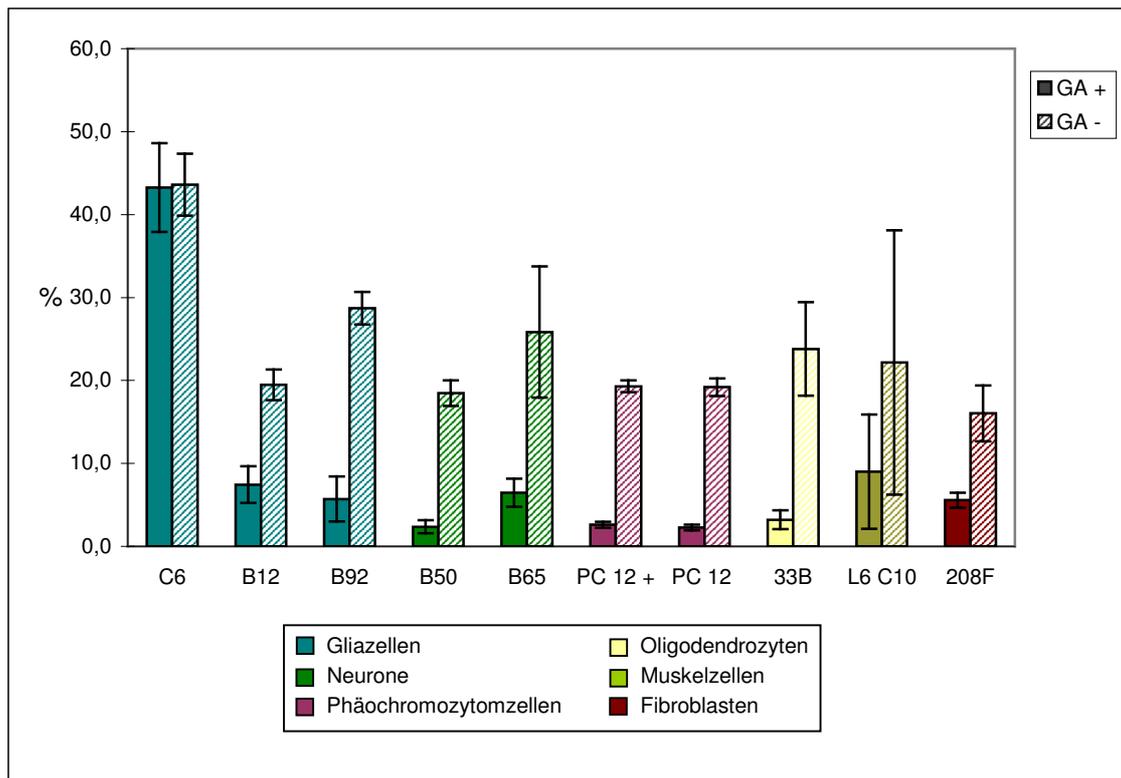


Abb.14: Prozentsatz infizierter ZNS-Tumorzellen und Kontrollzellen der Ratte 24h nach Infektion mit fünffach höherer Anzahl von *T. gondii*. Ergebnisse mit (GA+) und ohne (GA-) vorhergehende Phagozytosehemmung durch Glutaraldehyd. Nach Infektion und Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem anti-Toxoplasma-Antikörper und Färbung der Gesamtzellpopulation mit Propidiumjodid wurden von 500 Zellen mikroskopisch der *T.gondii*-positive Anteil der Zellen direkt bestimmt.

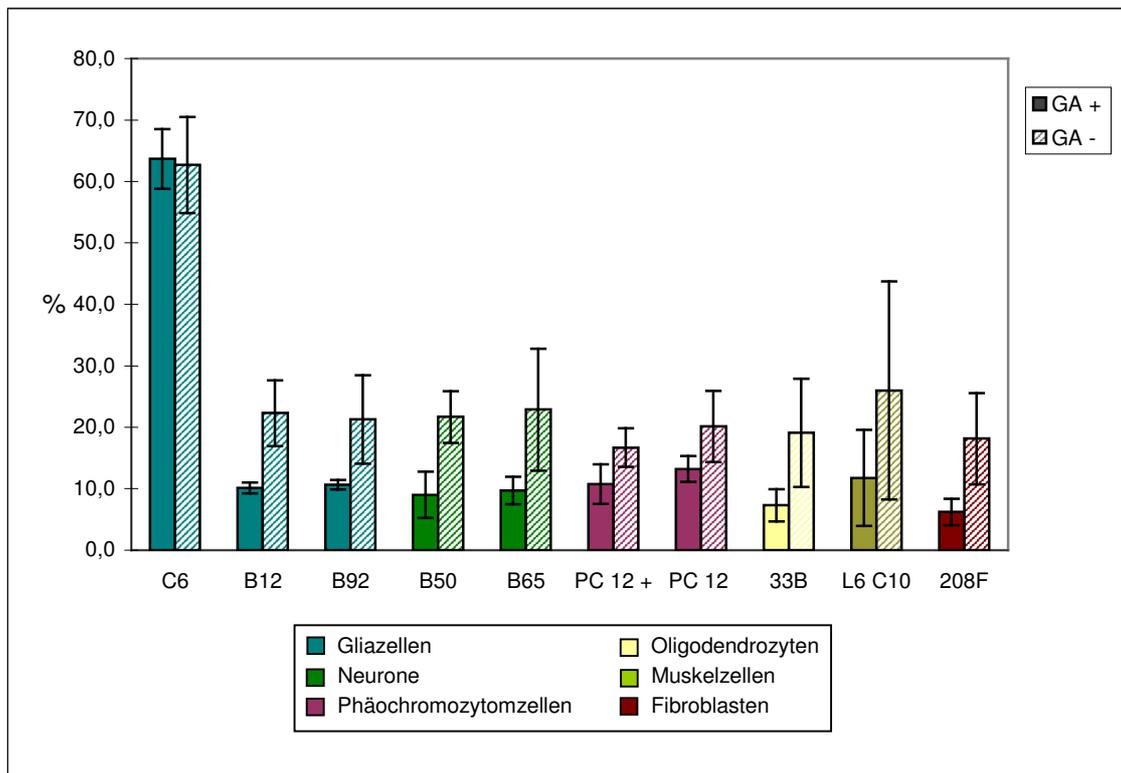


Abb. 15: Prozentsatz infizierter ZNS-Tumorzellen und Kontrollzellen der Ratte 24h nach Infektion mit zehnfach höherer Anzahl von *T. gondii*. Ergebnisse mit (GA+) und ohne (GA-) vorhergehende Phagozytosehemmung durch Glutaraldehyd. Nach Infektion und Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem anti-Toxoplasma-Antikörper und Färbung der Gesamtzellpopulation mit Propidiumjodid wurden von 500 Zellen mikroskopisch der T.gondii-positive Anteil der Zellen direkt bestimmt.

### 3.4 Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii* in permanenten Zelllinien des ZNS der Ratte

Wohl einer der effektivsten Mechanismen für die Persistenz von *T. gondii* in seinem Wirtsorganismus ist die Stadienkonversion vom schnell-replizierenden immunogenen Tachyzoiten zum langsam replizierenden Bradyzoiten mit reduzierter Stoffwechselaktivität. Um zu überprüfen, ob diese Stadienkonversion auch in den hier verwendeten permanenten ZNS-Tumorzelllinien stattfinden kann, wurden folgende Infektionsversuche durchgeführt.

Es wurden die bekannten Zelllinien in den Verhältnissen 1:1, 3:1, 5:1 mit *T. gondii* infiziert und 4 bzw. 6 Tage p.i. nach Doppelimmunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung eines bradyzoit-spezifischen Antikörpers mikroskopisch ausgewertet. Neben dem Versuch, eine spontane Stadienkonversion zu beobachten, wurden auch verschiedene, in der Literatur beschriebene Induktoren einer Stadienkonversion eingesetzt.

Als wichtigster Modulator für die Stadienkonversion wurde Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) beschrieben, das in den unten aufgeführten Dosen eingesetzt wurde. Darüber hinaus scheint die Kombination von IFN- $\gamma$  mit Lipopolysaccharid (LPS) oder dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ebenfalls an der Stadienkonversion beteiligt zu sein. Um die mögliche Einflussnahme von NO zu prüfen, wurde sowohl N-monomethyl-L-arginin (NMMA) als NO-Donator als auch Natriumnitroprussid (SNP) als externer NO-Donor in den Versuch eingebracht. Oligomycin ist ein Inhibitor der Atmungskette, dessen Einsatz überprüfen sollte, ob durch eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette eine Stadienkonversion des Erregers herbei geführt werden könnte (Bohne et al., 1993b & 1994). Auch Myxothiazol wurde mit seiner Fähigkeit in den mitochondrialen Elektronentransport einzugreifen als Induktor der Stadienkonversion von *T. gondii* beschrieben (Tomavo & Boothroyd, 1995).

Benutzt wurden diese Induktoren in folgender Kombination und Dosierung:

Interferon  $\gamma$  25 U/ml + LPS 10 ng/ml  
Interferon  $\gamma$  50 U/ml  
Interferon  $\gamma$  100 U/ml  
Interferon  $\gamma$  100 U/ml + NMMA 100  $\mu$ M  
Interferon  $\gamma$  100 U/ml + TNF  $\alpha$  50 ng/ml  
Oligomycin 0,5  $\mu$ g/ml  
Oligomycin 2  $\mu$ g/ml  
SNP 70  $\mu$ M  
SNP 100  $\mu$ M  
Myxothiazol 0,1  $\mu$ g/ml

Bei der Durchführung dieser Experimente waren vor allem bei den hohen Infektionsraten sehr häufig lysierte Zellen zu erkennen. Oft waren vor allem bei den hohen Infektionsverhältnissen am Ende der 4 bzw. 6 Tage p.i. kaum noch Zellen vorhanden, um die entsprechende Anzahl Zellen auszuzählen. Daher war es nicht möglich, in allen 3 unabhängigen Versuchen Bradyzoiten nachzuweisen.

Alle Gliazelllinien (C6, B12, B92) zeigten intrazellulär spontan bis zu 2% Bradyzoiten. Nur unter Zugabe von IFN- $\gamma$  100 U/ml und NMMA 100  $\mu$ M bzw von 2  $\mu$ g/ml Oligomycin konnte bei C6 einmalig eine Steigerung von 3% bzw 9% beschrieben werden. Nach Zugabe der Induktoren waren bei B12- und B92-Gliazellen mit 0-1% in allen Kombinationen weniger Bradyzoiten als ohne Zusätze nachweisbar. B50 und B65 als Neuronenzelllinien zeigten ebenfalls ohne Induktoren 2% bradyzoiten-positive Toxoplasmen. Hier jedoch konnten nach Zugabe jeglicher Induktorkombinationen geringere Zahlen (0-1%) erkannt werden. In der Oligodendrozytenzelllinie 33B konnte man eine niedrige Spontankonversionsrate von 1% erkennen. Eine Steigerung auf 3% war einmalig unter Induktion durch IFN- $\gamma$  100 U/ml und NMMA 100  $\mu$ M möglich. Bei den restlichen Induktorkombinationen war der Anteil an bradyzoit-positiven

Parasiten < 1%. Parasitophore Vakuolen von *T. gondii* in L6C10-Muskelzellen enthielten spontan maximal 1% Bradyzoiten. Unter Verwendung von Oligomycin 2µg/ml konnten bis zu 4% Bradyzoiten nachgewiesen werden. 208F-Fibroblasten enthielten unter spontanen Bedingungen 4% Toxoplasmen, die bradyzoitenspezifische Antigene exprimierten. Auch hier ließ sich dieser Prozentsatz weder unter Addition von Interferon-γ, bzw. Kombinationen mit TNF-α oder LPS, noch durch Zusatz von NO-Donor oder Inhibitoren der Atmungskette steigern.

Zusammenfassend ist eine spontane Stadienkonversion in allen Zelllinien beobachtet worden. Bei der Fibroblasten-Kontrollgruppe 208F ließ sich der Höchstwert von 4% nachweisen. Eine Steigerung der Konversions-Rate war nur selten und geringfügig möglich, wobei hier keine klaren Induktor- oder Zellart-spezifischen Unterschiede zu erkennen waren. Zu beachten ist, dass die angegebenen Werte Ergebnisse einzelner unabhängiger Versuche waren, und somit weder Mittelwert noch Standardfehler zu errechnen waren.

#### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der intrazellulären Entwicklung von *T. gondii* in permanenten Zellen des zentralnervösen Systems von Ratten erforscht. Unter Verwendung dieses *in-vitro* Systems konnte dargestellt werden, dass Neuronen und verschiedene Gliazellen, ähnlich wie die als Kontrolle verwendeten Zellen der Skelettmuskulatur und fibroblastische Wirtszellen von *T. gondii* sein können. Interessanterweise boten bestimmte Gliazelllinien dem Parasiten gute Möglichkeiten zur intrazellulären Replikation, während vor allem in den C6-Zellen ein Wachstum von *T. gondii* nur in geringem Maße beobachtet wurde. Auch Bradyzoiten waren in allen Zellen nach entsprechender Zeit zu identifizieren, so dass anzunehmen ist, dass in allen Zellen auch die Entstehung von *Toxoplasma*-Zysten möglich ist.

##### 4.1 Invasionsverhalten und Replikationsverhalten von *Toxoplasma gondii* in ZNS-Zellen

Da die *in-vivo* Untersuchung und Erforschung einer humanen Toxoplasmose aus ethischen und moralischen Gründen nur eingeschränkt möglich ist, werden hierfür häufig Tiermodelle verwendet. Wenn auch das Maus-Modell eine weite Verbreitung gefunden hat, so ist die Ratte doch aufgrund der Klinik für die Erforschung der humanen Toxoplasmose das interessantere Versuchstier. Mit Hinblick auf den Verlauf und die Letalität des Wirtes nach einer Infektion mit *T. gondii* unterscheiden sich die üblicherweise verwendeten Mausstämmen und der Mensch erheblich. Während Mäuse häufig sowohl an einer oralen als auch parenteralen experimentellen Infektion versterben, sind Ratten typischerweise in der Lage, eine Toxoplasmose erfolgreich zu kontrollieren (Lecomte et al., 1992; Creuzet et al., 1998; Dubey, 1997 & 1998b). Dennoch ist über den Verlauf einer Toxoplasmose bzw. toxoplasmatischen Enzephalitis (TE) in der Ratte wenig bekannt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass in Gehirnen von experimentell Toxoplasmen-infizierten Mäusen der größte Anteil von Zysten in Neuronen zu beschreiben war (Ferguson et al, 1987a & b). Die Ursachen dieser Wirtszellpräferenz und das Entstehen der Zysten-Form im ZNS ist noch weitgehend unklar, könnte jedoch mit dem dortigen spezifischen immunologischen Status zusammenhängen. In der Frühphase einer Invasion des ZNS mit *T. gondii* zeigen sich deutliche Infiltrationen von T-Zellen und Zytokinausschüttungen, bei üblicherweise niedrigen Konzentrationen von Zytokinen im gesunden Gehirn (Hunter & Remington, 1994; Dubey et al, 1998 a & b). In immunkompetenten Mäusen können *in-vivo* alle *T. gondii* Stämme Zysten in Astrozyten, Neuronen und Mikroglia-Zellen bilden (Ferguson et al., 1989; Sims et al., 1989; Chao et al., 1993a). Auch der hoch-virulente RH-Stamm, der üblicherweise keine Zysten bildet, kann durch Hitze- oder chemische Behandlung dazu angeregt werden (Soëte et al., 1994). *In-vitro* können Astrozyten ebenso wie Mikrogliazellen und davon abstammende Zelllinien ein intrazelluläres Wachstum von Tachyzoiten unterstützen, und in manchen Fällen auch die Entwicklung von Zysten zeigen (Peterson et al., 1993; Fischer et al., 1997).

Nach Infektion der in dieser Arbeit verwendeten permanenten ZNS-Zellen der Ratte konnten sehr deutlich intrazelluläre Tachyzoiten nach Immunfluoreszenzfärbung gesehen werden (Abb. 1-8; Kap. Ergebnisse). Da jedoch eine Invasion von *T. gondii* in allen bisher hierauf untersuchten eukaryontischen Zellen möglich war, trat dieses Ergebnis nicht unerwartet auf (Joiner & Dubremetz, 1993). Eine Gliazelllinie (C6) war allerdings mit über 50% wesentlich häufiger infiziert als die restlichen im dem Versuch verwendeten Zellen. Bei Versuchen an primären ZNS-Zellen der Ratte konnte auch mit über 30% infizierten Zellen eine deutlich erhöhte Invasionsrate bei Mikroglia ermittelt werden (Lüder et al, 1999).

Das unterschiedliche Maß der infizierten Zellen kann Ergebnis verschiedener Parameter sein. Zellgröße, Oberflächenrezeptoren, Zellteilung sowie die

Zytokinproduktion der infizierten aber auch der benachbarten Zellen können die Invasionsfähigkeit des Parasiten beeinflussen.

Neuronen von Mäusen können ebenso wie Fibroblasten von Toxoplasmen infiziert werden und eine intrazelluläre Zystenbildung zeigen (Fischer et al., 1997). Jedoch wurde mehrfach nachgewiesen, dass Neuronen aus dem Bereich des Hippocampus der Ratte wesentlich weniger von Toxoplasmen infiziert wurden als die entsprechenden Astrozyten (Creuzet et al., 1998; Halonen et al., 1996). Auch konnte nachgewiesen werden, dass Neuronen aus dem Kleinhirn der Ratte weniger infiziert wurden als die aus dem Hippocampus stammenden Neuronen (Fagard et al., 1999). Der topographische Ursprung der Neuronen könnte von Bedeutung sein.

Die Größe der Neuronen von Säugetieren variiert zwischen 10-15  $\mu\text{m}$ . Sie sind damit wesentlich größer als *T. gondii* (2-4  $\mu\text{m}$ ). Die Größendifferenz könnte jedoch auch der limitierende Faktor für eine bei Neuronen selten, bei Astrozyten (100 $\mu\text{m}$ ) allerdings häufiger beobachtete Mehrfachinfektion der Zellen sein (Halonen et al., 1996). Ein solches Verhalten konnte bei B92 Gliazellen in dieser Arbeit ebenfalls festgestellt werden (Abb. 3). Im Gegensatz dazu zeigten die meisten C6 Zellen nur wenige Tachyzoiten pro Zelle. Um die Bedeutung der Zellgröße deutlich zu machen sollte erwähnt werden, dass sich bei einer Verdoppelung der Zelllänge das Volumen der Zellen achtfach vergrößert.

Die Unterschiede der Invasion der einzelnen Zelllinien könnte auch mit der Ausstattung der jeweiligen Zellmembran zusammenhängen. Ein für die Invasion des Parasiten notwendiger Oberflächenrezeptor könnte in unterschiedlicher Qualität und Quantität vorhanden sein. Es konnte gezeigt werden, dass Integrine ein wichtiges Bindungsprotein für *T. gondii* ist, und es wurde angeregt, dass Laminin für das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle nötig sei. Das könnte teilweise eine Erklärung für die unterschiedlichen Invasionsraten sein, da zumindest bei Neuronen im Subtyp von den meisten Säugerzellen abweichende Integrine gefunden wurden. Jedoch auch wenn Integrine und Laminin dem

Parasiten das Eindringen in Zellen erleichtern konnte die absolute Notwendigkeit ihres Vorhandenseins für die Invasion nicht bewiesen werden (Joiner, 1991; Furtado et al., 1992).

Auch der Zellzyklus der potentiellen Wirtszelle könnte von Bedeutung für das Überwinden der Zellmembran durch *T. gondii* sein. In der Mitte der S-Phase konnte ein erhöhtes Bindungsverhalten zwischen Wirtszelle und Parasit erkannt werden. Eine Erklärung wäre auch hier die Existenz eines Rezeptors der in der Zeit dieser Zellphase maximal exprimiert wird (Grimwood et al.; 1996).

Wie schon erwähnt sind im gesunden, nicht-infizierten Gehirn nur niedrige Spiegel an Zytokinen zu finden. Eine toxoplasmatische Enzephalitis bewirkt jedoch einen Anstieg dieser Immunmodulatoren. Dies geschieht hauptsächlich durch Stimulation von Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen sowie eingewanderten Makrophagen und Lymphozyten (Hunter & Remington, 1994; Däubener & Hadding, 1997). Versuche mit Injektionen von Antikörpern gegen IFN- $\gamma$  sowie gegen TNF- $\alpha$  zeigten *in-vivo*, dass eine bei Mäusen bestehende *Toxoplasma*-Enzephalitis sich nach Neutralisation dieser Zytokine gravierend verschlimmerte. Daher ist anzunehmen, dass sowohl IFN- $\gamma$  als auch TNF- $\alpha$  eine anti-parasitäre Wirkung von endogenen und eingewanderten Zellen im ZNS vermitteln können. Während IFN- $\gamma$  alleine eine Infektion hemmen kann, scheint TNF- $\alpha$  ebenso wie IL6 eine synergistische Wirkung mit IFN- $\gamma$  zu besitzen (Hunter et al., 1994; Suzuki et al., 1996). Andere Zytokine wirken eher indirekt. So stimulieren beispielsweise IL-1 $\beta$  und IL12 bei immundefizienten Mäusen die Produktion von IFN- $\gamma$  in natürlichen Killer-Zellen (Hunter et al., 1995).

Auch *in-vitro* scheint der Effekt von Zytokinen von der Zielzelle abhängig zu sein. In Mikrogliazellen der Maus hemmt IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Infektion von *T. gondii* durch ein intrazelluläres Abtöten der Parasiten (Chao et al., 1993a). In humanen Glioblastom-Zellen und Pigment-Zellen der Retina, die ebenfalls neuronalen Ursprungs sind, wird durch Induktion derIDO (Indolamine-2,3-dioxygenase) eine Reduktion von Tryptophan und somit ein Mangel dieser für den Parasiten lebenswichtigen Aminosäure erzeugt. Mikroglia-Zellen der Maus

zeigen in solcher Situation jedoch eine Erhöhung der Produktion von Stickstoffmoxid (NO) (Chao et al., 1993b). Während in humanen Astrozytomzelllinien die alleinige Gabe von TNF- $\alpha$  ausreicht, wird bei primären Astrozyten dieser Spezies die Anwesenheit von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  benötigt, um das Parasitenwachstum zu hemmen (Pelloux et al., 1996). Auch diese Hemmung geschieht entweder durch Induktion von IDO, oder durch eine gesteigerte NO-Produktion (Peterson et al., 1995; Fischer et al., 1997b). Man nimmt an, dass NO als Trigger für die Konversion von Tachy- zu Bradyzoiten wirkt, und somit als Verstärker der Zystenbildung fungiert (Gross et al., 1996).

Insgesamt können zwei Wege der Immunantwort beschrieben werden: erstens das intrazelluläre Abtöten des Parasiten in Mikrogliazellen, sowie zweitens eine Zystenbildung vornehmlich in Astrozyten. Ausgehend davon, dass die in dieser Arbeit verwendeten C6-Zelllinien eher den mikroglia-ähnlichen Teil und B92 eher den Astrozyten-Anteil von Gliazellen repräsentieren, können oben genannte Beobachtungen in den permanenten ZNS-Zellen der Ratte bestätigt werden. C6 zeigten wie Mikroglia eine hohe Infektionsrate mit intrazellulär jedoch reduziertem Wachstum der Parasiten, wobei in B92 mit einer wesentlich geringeren Invasionsrate mehr Toxoplasmen in den parasitophoren Vakuolen zu erkennen waren.

Auch stammspezifische Unterschiede der Erreger können die Infizierbarkeit von Wirtszellen jeglicher Herkunft beeinflussen. Das intrazelluläre Wachstumsverhalten der Parasiten wird entscheidend von der Virulenz des Erregerstammes geprägt. Avirulente Stämme zeigen in Astrozyten ein geringeres Replikationsverhalten als in Mikroglia-Zellen (Fagard et al., 1999). Solche Unterschiede sind bei virulenten Stämmen wie z. B. RH nicht nachzuweisen (Fischer et al., 1997a). Andererseits wurden bei humanen Astrozytom-Zellen nach Infektion mit verschiedenen Stämmen von *T. gondii* eine ähnliche Expression von Zytokin-Kombinationen induziert (Pellox et al., 1994). Die in dieser Arbeit verwendeten Parasiten vom Stamm NTE sind Mäusen und Ratten

gegenüber zwar avirulent, jedoch gut für eine Zystenbildung geeignet (Gross et al, 1991).

Die Fähigkeit der Wirtszelle zur Phagozytose wäre eine weitere Erklärung für die hohe Anzahl einzelner intrazellulär gelegener Parasiten. Typischerweise in Makrophagen, aber auch in Mikrogliazellen ist diese Eigenschaft Teil der antimikrobiellen Aktivität dieser Zellen. Zusätzlich zur aktiven Aufnahme wird anschließend der Erreger intrazellulär nicht nur an der Replikation gehemmt sondern zumeist auch lysiert und damit abgetötet. Solches Verhalten ist bei zahlreichen Zelllinien beschrieben, so auch bei den hier benutzten Zelllinien C6 und 33B (Band & Talwar, 1986; Band et al, 1986a; Band et al, 1987b; Beaman & Beaman, 1994; Zimmer, 1995). Die Infektionsversuche nach Hemmung der Phagozytosefähigkeit mittels Glutaraldehyd konnten diese Ergebnisse jedoch nur teilweise bestätigen. Während in allen Zelllinien eine deutlich geringere Infektionsrate nach Vorbehandlung der Zellen mit Glutaraldehyd zu beobachten war zeigten sich bei der C6-Zelllinie nur geringe Unterschiede. Dies spricht dafür, dass die intrazellulär in C6 vorhandenen Parasiten nicht durch Phagozytose aufgenommen wurden, sondern durch aktive Invasion des Parasiten, was eine präferentielle Infektion der C6-Zelllinie vermuten lässt.

#### **4.2 Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii* in ZNS-Zellen**

Die Entwicklung einer chronischen Toxoplasmose ist eng verknüpft mit der Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten bzw der Entstehung von Zysten. Wie schon erwähnt sind diese vorzugsweise im Gehirn aber auch in Muskelgewebe zu finden. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass dieser Vorgang innerhalb von 3 Wochen nach Einsetzen der spezifische Immunantwort abgeschlossen ist. Zysten waren hauptsächlich in Neuronen zu sehen (Ferguson & Hutchinson, 1987a & b; Sims et al., 1989). Es bleibt in diesen *in vivo* Studien jedoch unklar, ob diese bevorzugte Lokalisation Ergebnis einer erleichterten Zysten-entwicklung in Neuronen ist, oder ob alle ZNS-Zellen

hierzu fähig sind. Es wäre auch denkbar, dass nicht-neuronale infizierte Zellen immunologisch eliminiert werden, während Neuronen mit intrazellulären Zysten hiervon verschont werden um die Funktion des ZNS aufrecht zu erhalten. Die Unfähigkeit von Neuronen, Antigene MHC II-vermittelt zu präsentieren, unterstützt diese Theorie (Shrikant & Benveniste, 1996). Es gibt bereits mehrere Studien, die gegen die Annahme einer selektive Zystenbildung in Neuronen sprechen. Durch Verwendung von Bradyzoiten- oder Zystenwand-spezifischen Antikörpern konnte sowohl in humanen als auch in murinen Gliazellen Stadienkonversion als auch Zystenbildung dargestellt werden (Jones et al., 1986; Halonen et al., 1996; Fischer et al., 1997; Lüder et al., 1999).

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (mAk) war es möglich, in dieser Arbeit die Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten zu verfolgen. Hierzu wurde der bradyzoitenspezifische mAk DC11 verwendet (Gross et al., 1995). Die Entstehung von Bradyzoiten wurde mit und ohne Zugabe von Induktoren der Stadienkonversion untersucht, so dass auch das Beurteilen einer spontanen Stadienkonversion möglich war. Als Induktor wurde unter anderem IFN- $\gamma$  in verschiedenen Konzentrationen verwendet. IFN- $\gamma$  ist als Trigger der Stadienkonversion ein essentieller Mediator sowohl zur Überwindung einer akuten als auch zur Verhinderung einer toxoplasmatischen Enzephalitis notwendig (Subauste & Remington, 1991; Bohne et al., 1993a). Daher wurde der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Stadienkonversion auch den hier verwendeten Zelllinien untersucht.

In murinen Makrophagen wird nach Aktivierung mit IFN- $\gamma$  und LPS die Expression einer NO-Synthase induziert, die große Mengen an NO bildet (Ding et al., 1988). NO wirkt in hohen Konzentrationen mikrobizid auf Parasiten; in geringen Konzentrationen führt es zu einer verminderten Parasitenreplikation (Adams et al., 1990; Liew & Cox, 1991; Kolb & Kolb-Bachofen, 1992). In humanen Fibroblasten hingegen wird durch IFN- $\gamma$ -Behandlung das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase induziert. Dieses Enzym baut Tryptophan zu N-Formylkynurein ab und verursacht dadurch einen intrazellulären Tryptophanmangel. Der Mangel dieser essentiellen Aminosäure bewirkt eine Hemmung der

Toxoplasmenreplikation (Pfefferkorn et al, 1986). Es ist bekannt, dass Lipopolysaccharid oder TNF- $\alpha$  synergistisch mit IFN- $\gamma$  eine NO-Bildung in Makrophagen besonders effektiv induziert (Langermans et al., 1992; Sibley et al, 1991). Die NO-Bildung kann in IFN- $\gamma$ /LPS behandelten Makrophagen an verschiedenen Punkten der Signalkette inhibiert werden, dementsprechend sind verschiedene Inhibitoren der NO-Produktion beschrieben.

L-Arginin, genauer gesagt seine terminale Aminogruppe dient als Substrat für die NO-Produktion. Ein Analogon für dieses L-Arginin ist NMMA (Adams et al, 1990; Liew & Cox, 1991; Noack & Murphy, 1991). Somit würde NMMA eine durch IFN- $\gamma$  oder LPS induzierte NO-Produktion inhibieren, so dass ein ungehemmtes Parasitenwachstum stattfinden würde.

Eine zentrale Rolle von NO könnte durch die exogene Gabe von NO verifiziert werden. Natriumnitroprussid (SNP) bildet spontan NO und ist geeigneter NO-Donor für *in-vitro* Zellkulturversuche (Noack & Murphy, 1991; Dimmeler et al, 1993).

In aktivierten Makrophagen führt die hohe Konzentration von NO zur Inhibierung von Proteinen, die an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind (Drapier & Hibbs, 1988). Oligomycin ist ein weiterer Inhibitor der Atmungskette, der direkt die ATPase der Mitochondrien hemmt. Ebenfalls ein Inhibitor der Atmungskette ist Myxothiazol, der den Elektronentransport der Mitochondrien hemmt (Tomavo & Boothroyd, 1995).

Die oben genannten potentiellen Induktoren der Stadienkonversion von *T. gondii* wurden in den Kombinationen und Konzentrationen eingesetzt, in denen sie in primären Makrophagen der Maus eine Bildung von Bradyzoiten deutlich induzierten (Bohne et al, 1993 a & b).

Sowohl 4 als auch 6 Tage nach Infektion der Zellen mit *T. gondii* konnten in allen Gliazelllinien ebenso wie in neuronalen Zellen Bradyzoiten mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden. Auch in der Muskelzelllinie L6C10, sowie in den Phäochromozytom-Zellen PC12 und den Ratten-Fibroblasten waren Bradyzoiten intrazellulär zu finden.

Eine bevorzugte Lokalisation der Bradyzoiten in Neuronen war weder in dieser Arbeit als auch in Versuchen mit primären ZNS-Zellen nicht zu beobachten

(Lüder et al., 1999). Der Einsatz von IFN- $\gamma$  in Konzentrationen von 25, 50 und 100 U/ml auch kombiniert mit LPS 10 ng/ml konnte die Rate von Bradyzoiten nicht steigern. Ebenso ergab die Addition von je 100  $\mu$ m NMMA oder 50 ng/ml TNF- $\alpha$  addiert zur eingesetzten Höchst-Dosis von IFN- $\gamma$ , (100 U/ml) keinen Unterschied in der Expression von bradyzoitenspezifischen Antigenen. Oligomycin und Myxothiazol als Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette konnten ebenso wie der exogene NO-Donor SNP nur maximal 2-3% bradyzoiten-spezifisch gefärbte Toxoplasmen je Zelllinie aufweisen. Bei drei unabhängigen Versuchen lag jedoch die prozentuale Anzahl von intrazellulären Bradyzoiten in allen Zelllinien zwischen 0 und 9%. Diese Werte entsprechen der spontanen Stadienkonversionsrate, so dass bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien keine induzierbare Stadienkonversion zu beschreiben war (Bohne et al., 1994).

#### **4.3 Vergleich verschiedener Versuchsmodelle zur Untersuchung von *Toxoplasma gondii***

Zur Erforschung der Toxoplasmose sowie anderen erregerbedingten Erkrankungen stehen im Prinzip drei Modellmöglichkeiten zur Verfügung. Zu unterscheiden sind grundsätzlich *in-vivo* und *in vitro* Modelle.

Im Tiermodell wird das Versuchstier auf unterschiedliche Arten mit dem zu untersuchenden Erreger infiziert und dann, nach gewünschten Zeiträumen, das Tier getötet. Die Organe des infizierten Organismus werden entsprechend der Fragestellung untersucht. Dieses Modell hat den Vorteil, dass z.B. eine Toxoplasmose in geschlossenen Organsystemen mit den vorhandenen Interaktionen der beteiligten Zellen erforscht werden kann. Da die Differenzierung dieser Vorgänge jedoch oft sehr schwierig ist, kann darin allerdings auch ein Nachteil gesehen werden. Ein zusätzliches Problem ist die Auswahl einer geeigneten Versuchstierspezies: Arten, die den Menschen besonders nahe stehen wie z.B. Menschenaffen sind aus ethisch-moralischen und gesetzgeberischen Gründen nur in eingeschränktem Umfang möglich, dagegen ist die

Übertragbarkeit von Versuchsergebnisse der üblicherweise verwendeten Nagetiermodelle auf die Situation beim Menschen häufig problematisch. Bei der Toxoplasmose ist das Maus-Modell weit verbreitet. Mäuse sind leicht zu halten und es gibt mittlerweile eine große Menge genetisch unterschiedlich determinierter Stämme, die eine multiple Variation der Versuchsbedingungen erlauben. Im Verlauf einer Toxoplasmose jedoch weisen Mensch und Maus erhebliche Unterschiede auf, so dass eine Vergleichbarkeit oft sehr schwierig ist. Während die meisten Maus-Stämme eine einfache Toxoplasmen-Infektion nicht überleben, ist bekanntlich der Verlauf im Menschen in der Regel inapparent. Ein unter diesem Aspekt wohl besseres Modell wäre die Verwendung von Ratten als Versuchstiere. Da dieses *in-vivo* Modell weniger Verbreitung findet, ist die oben genannte Variation der Versuchsbedingungen aufgrund der bisher geringeren Erkenntnisse noch eingeschränkt.

Eine weitere Möglichkeit *T. gondii* intrazellulär zu studieren, ist das Verwenden von primären Zellen. Hier werden Zellen aus den gewünschten Organen eines gewählten Wirtsorganismus entnommen und anschließend *in-vitro* kultiviert. Bei dieser Methode ist die Übereinstimmung der einzelnen Zellen mit der *in-vivo*-Situation in Abhängigkeit des Zelltyps und der Kulturdauer zumindest teilweise gegeben. Ein komplexes Zusammenwirken des gesamten Organismus auf eine *in-vitro* erzeugte Infektion ist aufgrund der Isolation des Gewebes vom ursprünglichen Lebewesen natürlich nicht möglich. Bei der Betrachtung und Erforschung einzelner Zellarten, weist diese *in-vitro* Methode mit primären Zellen gelegentlich Schwierigkeit auf. Eine Isolation einzelner Zellarten aus den Verband des Organsystems ist oftmals sehr schwierig bis unmöglich. Zudem ist die präparatorisch bedingte Gefahr einer Kontamination mit Zellen des Bluts und anderer Begleitflora gegeben.

Hier zeigt sich der Vorteil von Zellkulturversuchen mit permanenten Zelllinien. Meist durch chemische Tumorinduktion immortalisierten Zellen können isoliert als einzelne Zelllinien in Kultur genommen und gehalten werden. Dieses ermöglicht spezifische Untersuchungen an diesen Zellen mit oder ohne deren Infektion. Bis zu einem gewissen Maß ist eine Erzeugung von *in-vivo*-ähnlichen Situationen durch Kombination mit Zelllinien anderer Art und, wie hier

durchgeführt, durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und Induktoren möglich. Auch ist die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen unter Verwendung der gleichen Zelllinien leichter möglich. Nachteile bieten sich bei dieser Methode jedoch gerade darin, dass die komplexen Vorgänge in einem kompletten Wirtsorganismus vor als auch nach einer Infektion mit einem Erreger auf diesem Wege nicht zu simulieren sind. Auch gilt es zu beachten, dass die Behandlung zur Tumorinduktion Differenzen zur Ursprungs-Zelle erzeugt, die sich auch im Versuchverhalten zeigen könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche an ZNS-Zelllinien der Ratte zur näheren Betrachtung der Fähigkeit von *Toxoplasma gondii* zur Invasion, Replikation und Stadienkonversion zeigten, dass an dem hier etablierten Modell mit permanenten Zellen differenzierte Aussagen über spezifische Fragestellungen möglich sind. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wäre allerdings eine weitergehende Erforschung der Zelllinien wünschenswert und sollte Gegenstand weitere Untersuchungen sein. Die Möglichkeit eines Ersatzes der *in-vitro* Verfahren mit primären Zellen oder der Tierversuche ist jedoch nicht zu erkennen. Vielmehr können in dem hier etablierten Modell einfachere, isolierte Fragestellungen bezüglich des intrazellulären Verhaltens eines Erregers beantwortet werden, während die Erforschung komplexerer Zellsysteme eher eine Domäne der oben erwähnten Verfahren ist.

## 5. Zusammenfassung

Durch zunehmendes Auftreten von erworbenen Immunschwächen bei HIV-Infektionen oder Chemotherapien gewinnt die Toxoplasmen-Enzephalitis zunehmend an Bedeutung. Der in Zystenform hauptsächlich im Gehirn persistierende Erreger überwindet hierbei die Immunabwehr und führt so reaktiviert häufig zu einem letalen Ausgang der Erkrankung. Diese zerebralen Zysten von *T. gondii* sind deshalb seit längerem Gegenstand der Forschung und konnten bei *in-vivo* Versuchen in der Mehrheit in Neuronen lokalisiert werden. Allerdings konnten auch andere Zellen des ZNS wie Mikroglia oder Astrozyten als mögliche Wirtszellen des Parasiten identifiziert werden.

Neben bereits bestehenden *in-vitro* Untersuchungen an primären ZNS-Zellen von Mäusen und Ratten wurde in dieser Arbeit ein weiteres Verfahren mit permanenten ZNS-Zelllinien der Ratte etabliert. Es sollte überprüft werden, ob das intrazelluläre Verhalten von *T. gondii* in diesen permanenten ZNS-Zelllinien vergleichbar ist mit dem in primären Zellen oder *in-vivo* Versuchen.

Drei Gliazelllinien (C6, B12, B92) und zwei Zelllinien neuronalen Ursprungs (B50, B65) wurden neben einer Muskelzelllinie (L6C10), einer Schwannomzelllinie (33B) und einer Phäochromozytomzelllinie (PC12) hinsichtlich der Invasions- und Replikationsfähigkeit sowie der Möglichkeit zur Stadienkonversion von *Toxoplasma gondii* nach einer Infektion dieser Zellen untersucht.

Neben recht gleichmäßigen Ergebnissen für Invasion und Replikation des Parasiten in Neuronen, zeigt sich in der Gruppe der Gliazelllinien diesbezüglich heterogenes intrazelluläres Verhalten von *T. gondii*. Eine Stadienkonversion war spontan in allen Zelllinien ohne präferentielle Unterschiede nachweisbar, während eine klare Induktion zur gesteigerten Bildung von Bradyzoiten nicht zu erkennen war. Somit eignet sich nachweislich dieses Infektionsmodell mit permanenten ZNS-Zelllinien der Ratte zur Untersuchung spezifischer Fragestellungen in Hinblick auf das Verhalten von *T. gondii* in isolierten Zellen. Da Unterschiede zu primären Zellen bestehen, ist die Verwendung von Zelllinien

jedoch kein Ersatzverfahren für den Einsatz von primären Zellen oder *in-vivo* Versuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

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* Nov 15; 33 (10): 1747-1755

Adams, W. B., Hibbs, J. B., Taintor, R. R. Jr., Krahenbuhl, J. (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 144, 2725-2729

Ammassari, A., Cingolani, A., Pezzotti, P., De Luca, D. A., Murri, R., Giancola, M. L., Larocca, L. M., Antinori, A. (2000) AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy. *Neurology* Oct 24; 55 (8): 1194-1200

Armstrong, K. J., Niles, L. P. (2002) Induction of GDNF mRNA expression by melatonin in rat C6 glioma cells. *Neuroreport*, Mar 25; 13 (4): 473-475

Aspöck, H., Hermentin, K. (1987) Übertragung, Verbreitung und Ausbreitung von *Toxoplasma gondii*: Stand der Kenntnisse und aktuelle Probleme. *Heidelberger Geographische Arbeiten* 83: 167

Baines, D., Mallon, B. S., Love, S. (1992) Effects of sodium butyrate on the expression of sodium channel by neuronal cell lines derived from the rat CNS. *Brain Res Mol Brain Res*, Dec; 16 (3-4) : 330-338

Band, H., Talwar, G. P., (1986) Effect of macrophage activators on the phagocytosis of mycobacteria by schwann cells. *J Neuroimm*, 13: 109-113

Band, H., Bhattacharya, A., Talwar, G. P., (1986a) Mechanism of phagocytosis by schwann cells. *J Neurol Sci*, Aug; 75 (1) : 113-119

Band, H., Chitamber, S. D., Bhattacharya, A., Talwar, G. P., (1986b) Mechanism of phagocytosis of mycobacteria by schwann cells and their comparison with macrophages. *Int J Lepr Other Mycobact Dis Jun*; 54 (2) : 294-299

Band, H., Sinha, S., Talwar, G. P., (1987a) Inhibition of the interaction of mycobacteria with schwann cells by antimycobacterial antibodies. *J Neuroimm*, 14: 235-239

Band, H., Bhattacharya, A., Talwar, G. P., (1987b) Lack of mycobacterium leprae-specific uptake in schwann-cells. *Int J Lepr Other Mycobact Dis Mar*; 54 (1) : 71-78

Beaman, L., Beaman, B. L., (1994) Differences in the interactions of *Nocardia asteroides* with macrophage, endothelial, and astrocytoma cell lines. *Infect Immun*, May; 62 (5): 1787-1798

Benda, P., (1968) S-100 protein and glial cells in rats. *Rev Neurol (Paris)*, May; 118 (5): 364-367

Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371

Bessières, M. H., Roques, C., Berrebei, A., Barre, V., Cazaux, M., Séguéla, J. P. (1992a) IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 45: 605

Bessières, M. H., Le Breton, S., Séguéla, J. P. (1992b) Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol Res* 78: 222-228

Biocca, S., Cattaneo, A., Calissano, P. (1983) A macromolecular structure favouring microtubule assembly in NGF-differentiated pheochromocytoma cells (PC12) *J EMBO* 2 (5): 643-648

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1993a) Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun* 61, 1141-1145

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1993b) Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. *Parasitol Res* 79, 485-487

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1994) Reduced Replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: A possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and Immunity* 62, 1761-1767

Bovolenta, P., Wandosell, F., Nieto-Sampedro, M., (1993) Neurite outgrowth inhibitors associated with glial cells and glial cell lines. *NeuroReport* 5, 345-348

Bond, R. W., Wyborski, R. J., Gottlieb, D. I. (1990) Developmentally regulated expression of an exon containing a stop codon in the gene of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* Nov; 87 (22): 8771-8775

Burg, J. L., Perelma, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., Boothroyd, J. C. (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 141: 3584-3591

Carter, A. O., Frank, J. W. (1986) Congenital toxoplasmosis. Epidemiological features and control. *Can. Med. Assoc. J.* 135: 618

Chao, C. C., Hu, S., Gekker, G., Novick, Jr. W. J., Remington, J. S., Peterson, P. K. (1993a) Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells. J Immunol 150, 3404-3410

Chao, C. C., Anderson, W. R., Hu, S., Gekker, G., Martella, A., Peterson, P. K. (1993b) Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. Clin Immunol Immunopathol 67, 178-183

Chirgwin, K., Hafner, R., Leport, C., Remington, J., Andersen, J., Bosler, E. M., Rogue, C., Rajcic, N., McAuliffe, V., Morlat, P., Jayaweera, D. T., Vidle, J. L., Luft, B. J. (2002) Randomized phase 2 trial of atovaquone with pyrimethamine or sulfadiazine for treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: ACTG 237/ANRS 039 Study. AIDS Clinical Trials Group 237/ Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, Essai 039 Clin Infect Dis May 1 ; 34 (9) : 1243-1250

Collawn, J. F., Benveniste, E. N. (1999) Regulation of MHC class 2 expression in the central nervous system. Microbes Infect 1, 893-902

Creuzet, C., Robert, F., Roisin, M. R., Van Tan, H., Benes, C., Dupouy-Camet, J., Fagard, R. (1998) Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. Parasitol Res 84, 25-30

Daum, G., Keller, K., Lange, K. (1988) Association of glycolytic enzymes with the cytoplasmic side of the plasma membrane of glioma cells. Biochem Biophys Acta, Apr 7; 939 (2): 277-281

Däubener, W., Pilz, K., Zennati, S. S., Bilzer, T., Fischer, H. G., Hadding, U. (1993) Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon- $\gamma$ . J Neuroimmunol 43, 31-38

Däubener, W., Hadding, G. (1997) Cellular immune reaction directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. *Med Microbiol Immunol* 185, 195-206

Deckert-Schlüter, M., Blüthmann, H., Rang, A., Hof, H., Schlüter, D. (1998) Critical role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol* 160, 3427-3436

Ding, A. H. , Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141, 2407-2412

Dimmeler, S., Ankarcona, M., Nicotera, P., Brüne, B. (1993) Exogenous nitric oxide (NO) generation or IL-1 $\beta$ -induced intracellular NO production stimulates inhibitory auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyd-3-phosphatedehydrogenase in RINm5F cells. *J Immunol* 150, 2964-2971

Dong, Y., Rohn, W. M., Benveniste, E. N. (1999) IFN- $\gamma$  regulation of the type 4 class 2 transactivator promoter in astrocytes. *J Immunol* 162, 4731-4739

Drapier, J. C., Hibbs, j. B. (1988) Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-Arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells *J Immunol* 140, 2829-2838

Dubey, J. P. (1997) Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: A comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitol* 115, 15-20

Dubey, J. P. (1998a) Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitol* 116: 43-50

Dubey , J.P. (1998b) Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* Bradyzoites in rats and mice. J Parasitol 84(6), 1282-1285

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 11, 267-299

Enders, G., Shah, P. M., Stille, W. (1991) Toxoplasmose in der Schwangerschaft. Infektion durch *Toxoplasma gondii*. Socio-medico Verlag, Gräfelfing S. 33

Fagard, R., Van Tan, H., Creuzet, C., Pelloux, H. (1999) Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. Parasit Today Vol. 15, No. 12, 504-507

Ferguson, D. J. P., Hutchinson, W. M. (1987a) An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitology Research 73: 483-491

Ferguson, D. J. P., Hutchinson, W. M. (1987b) The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Archiv A 411, 39-43

Ferguson, D. J. P., Hutchison, W. M., Petterson, E. (1989) Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. Parasitol Res 75, 599-603

Ferguson, D. J. P., Huskinson-Mark, J., Araujo, F. G., Remington, J. S. (1994) An ultrastructural study of the effect of treatment with atovaquone in brains of mice chronically infected with the ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. Int J Exp Pathol 75: 111-116

Fields, K. L., (1977) Biochemical studies of the common and restricted antigens, two neural cell surface antigens. *Prog Clin Biol Res*, 15 : 179-190

Fields, K. L., Dammerman, M., (1985) A monoclonal antibody equivalent to anti-rat neural antigen-1 as a marker for schwann cells. *Neuroscience* 15, No. 3, 877-885

Fischer, H.-G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Gross, U., Hadding, U. (1997a) Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res* 83, 637-641

Fischer, H. G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Hadding, U. (1997b) Cytokine response induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglia cells. *Eur J Immunol* 27, 1539-1548

Fung, H. B., Kirschenbaum, H. L. (1996) Treatment regimens for patients with toxoplasmic encephalitis. *Clin Ther Nov-Dec*; 18 (6): 1037-1056; discussion 1036

Furtado, G. C., Cao, Y., Joiner, K. A. (1992) Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\beta 1$  integrin receptor  $\alpha 6\beta 1$  on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 60, 4925-4931

Frenkel, J.K., Escajadillo, A. (1987) Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 517-522

Freyre, A, Correa, O, Falcon, J, Mendez, J, Gonzalez, M, Venzal, J. M. (2001) Some factors influencing transmission of toxoplasma in pregnant rats fed cysts. *Parasitol Res Nov*; 87 (11), 941-944

Gervasoni, C., Bini, T., Franzetti, F., Ridolfo, A. L., d'Arminio Monforte, A. (1993) Central nervous system toxoplasmosis in HIV-1 infected patients with persistently normal CD4+ cell counts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* 12 : 787

Greene, L.A., Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A Jul; 73 (7): 2424-2428

Grimwood, J., Mineo, J. R., Kasper, L. H. (1996) Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependant. Infect Immun 64, 4099-4104

Greene, L. A., Tischler, A. S., (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, No. 7: 2424-2428

Gross, U., Müller, W. A., Knapp, S., Heesemann, J., (1991) Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. Infect. Imm. 59, 4511-4516

Gross, U., Roos, T., Appoldt, D., Heesemann, J. (1992) Improved serological diagnosis of *Toxoplasmosis gondii* infection by detection of immunoglobulin A and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. J Clin Microbiol 30: 1436-1441

Gross, U., (1994) Toxoplasmose. Immunologische und molekulare Parasitologie. Jena, Gustav Fischer Verlag, 83-103

Gross, U., Bormuth, H., Gaissmaier, C., Dittrich, C., Krenn, V., Bohne, W., Ferguson, D. J. P., (1995) Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying tachyzoite – bradyzoite interconversion in vivo. Clin. and Diag. Lab. Imm. 2, 542-548

Gross, U. (1996) Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today 12, 30-33

Grover, C. M., Thulliez, P., Remington, J. S., Boothroyd, J. C. (1990) Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28: 2297-2301

Guy, E. C., Joynson, D. H. M. (1995) Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active toxoplasma infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.* 172 : 319-322

Hales, T. G., Tyndale, R. F. (1994) Few cell lines with GABAA mRNAs have functional receptors. *J Neurosci Sep*; 14 (9) : 5429-5436

Halonen, S. K., Lyman, W. D., Chiu, F. C. (1996) Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 1150-1156

Halonen, S. K., Chiu, F. C., Weiss, L. M., (1998) Effects of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect Immun* 66, 4989-4993

Hellendall, R. P., Ting, J.P.-Y. (1997) Differential regulation of cytokine-induced major histocompatibility complex 2 expression and nitric oxide release in rat microglia and astrocytes by effectors of tyrosine kinase, protein kinase C, and cAMP. *J Neuroimmunol* 74, 19-29

Hirsch, M. R., Wietzerbin, J., Pierres, M., Goridis, C. (1983) Expression of 1a antigens by cultured astrocytes treated with gamma-interferon. *Neurosci Lett* 41, 199-204

Hagiwara, N., Sueoka, N. (1995) Regulation of the rat S100 $\beta$  gene expression: The role of the 2 kb 5'-upstream sequence in glial specific expression. *J Neurosci Res*, 42: 603-612

Hunter, C. A., Litton, M. J., Remington, J. S., Abrams, J. S. (1994a) Immunocytochemical detection of cytokines in the lymphnodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 170, 939-945

Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., Remington, J.S. (1994b) Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii* infected SCID mice: regulation by interleukin 10, interleukin 12, and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Infect Immun* 62, 2818-2824

Hunter, C. A., Chizzonite, R. , Remington, J. S. (1995) IL1 $\beta$  is required for IL12 to induce production of IFN- $\gamma$  NK-cells. A role for IL1 $\beta$  in the T-cell independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 155, 4347-4354

Hunter, C. A., Remington, J. S. (1994) Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 170, 1057-1067

Joiner, K. A. (1991) Cell attachment and entry by *Toxoplasma gondii*. *Behring Inst Mitt* 88, 20-26

Joiner, K.A., Dubremetz, J. F. (1993) *Toxoplasma gondii*: A protozoan for the nineties. *Infect Immun* 61, 1169-1172

Jones, T. C., Bienz, K. A., Erb, P. (1986) In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Inf Immun* 51, 147-156

Kahle, P., Hertel, C. (1992) Nerve growth factor receptor on rat glial cell lines. Evidence for NGF internalization via p75NGFR. *J Biol Chem* Jul 15; 267 (20): 13917-13923

Kasckow, J. W., Tillakarante, N. J., Kim, H., Strecker, G. J., Tobin, A. J., Olsen, R. W. (1992) Expression of GABAA receptor polypeptides in clonal rat cell lines. *Brain Res*, May 22; 581 (1) : 143-147

Kasper, L. H., Pfefferkorn, E. R. (1982) Hydroxyurea inhibition of growth and DANN synthesis in *Toxoplasma gondii*: characterization of a resistant mutant. *Mol Biochem Parasitol Sep*; 6 (3): 141-150

Kettenmann, H., Ransom B. R. (1995) *Neuroglia* Oxford University Press, 1995

Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. (1992) Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 13, 157-160

Kristensson, K., Mhlanga, J. D., Bentivoglio, M. (2002) Parasites and the brain: neuroinvasion, immunopathogenesis and neuronal dysfunctions. *Curr Top Microbiol Immunol* 265, 227-257

Krause, M., Gubler, J., (1999) *Systemische Infektionen: Toxoplasmose* Thiemes Innere Medizin (Ed. Flasnoecker, M.); pp.1828-1829 Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Krajci, D., Mares, V., Lisa, V., Spanova, A., Vorlicek, J. (2000) Ultrastructure of nuclei of cisplatin-treated C6 glioma cells undergoing apoptosis. *Eur J Cell Biol*, May; 79 (5): 365-376

Lai, M., Griffiths, H., Pall, H., Williams, A., Lunec, J., (1993) An investigation into the role of reactive oxygen species in the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinr toxicity using neuronal cell lines. *Biochem Pharmacol* Feb 24;45 (4): 927-933

Liew, F. Y., Cox, F. E. G. (1991) Nonspecific defense mechanism: the of nitric oxide. *Immunol Today* A17-A21

Langermans, J. A. M., van der Hulst, N. E. B., Nibbering, P. H., Hiemstra, P. S., Fransen, L., van Furth, R. (1992) IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasma-static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 148, 568-574

Lecomte, V., Chumpitazi, B. F. F., Pasquier, B., Ambroise-Thomas, P., Santoro, F. (1992) Brain-tissue cysts in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 78, 267-269

Levi, A., Eldrige, J. D., Paterson, B. M. (1985) Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229: 393-395

Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E., Remington, J. S. (1984) Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 257: 913-917

Lüder, C. G. K., Lang, T., Beuerle, B., Gross, U. (1998) Downregulation of MHC class 2 molecules and inability to up-regulate class 1 molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 112, 308-316

Lüder, C. G. K., Giraldo-Velásquez, M., Sendtner, M., Gross, U., (1999) *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: Differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol* 93, 23-32

Mamidi, A., DeSimone, J. A., Pomerantz, R. J. (2002) Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol* Jun; 8 (3): 158-167

Mandel, J. L., Pearson, M. L. (1974) Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. *Nature* 251: 618-620

Manson-Bahr, P. E. C., Bell, D. R. (1996) *Toxoplasmosis Manson's Tropical Diseases*. London. Bailliere Tindall

Martin, J. F. (1999) Evaluierung von zehn Primerpaaren zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Fruchtwasser, Liquor und Venenblut durch die Polymerase-Ketten-Reaktion. Med. Dissertation, Universität Tübingen

McLeod, R., Mack, D. G., Brown, C., Skamene, E. (1992) Secretory IgA, antibody to SAG1, H-2 class 1-restricted CD8+ T-lymphocytes and the INT1 locus in protection against *Toxoplasma gondii*. in *Toxoplasmosis*, Smith J. E. (Ed)

Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugène E., Couraud, P.-O. (2002) How do extra-cellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* Vol. 10, No. 5 May, 227-232

Nichols, B.A, O'Connor, G. R. (1981) Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. *Laboratory Investigation* 44, 324ff.

Nicolle, D., Manceaux, L. (1908) Sur une infection à corps de Leishmna (ou organismes voisins) du gondi. *Compt. Rend. de l' Acad. Sci (Paris)* 147: 763

Noack, E., Murphy, M. (1991) Vasodilatation and oxygen radical scavenging by nitric oxide/EDRF and organic nitrovasodilators p. 445-492. *In* Sies, H. (ed), *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic press, London

Osawa, H., Sutherland, C., Robey, R.B., Printz, R.L., Granner, D.K. (1996a) Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin. *J Biol Chem* Jul 12;271(28):16690-16694

Osawa, H., Robey, R.B., Printz, R.L., Granner, D.K. (1996b) Identification and characterization of basal and cyclic AMP response elements in the promoter of the rat hexokinase II gene. *J Biol Chem* Jul 19;271(29):17296-17303

Panek, R. B. , Beneviste, E. N. (1995) Class 2 MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *J Immunol* 154, 1846-2854

Pelloux, H., Ricard, J., Bracchi, J., Makrowicz, Y., Verna, J. M., Ambroise-Thomas, P. (1994) TNF- $\alpha$ , IL1 $\alpha$  and IL6 mRNA expressed by human astrocytoma cells after infection by three different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 80, 271-276

Pelloux, H., Pernod, G., Polack, B., Coursange, E., Ricard, J., Verna, J. M., Ambroise-Thomas, P. (1996) Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitol Res* 82, 598-603

Peterson, P. K., Gekker, G., Hu, S., Chao, C. C. (1993) Intracellular survival and multiplication of *Toxoplasma gondii* in astrocytes. *J Infect Dis* 168, 1472-1478

Peterson, P. K., Gekker, G., Hu, S., Chao, C. C. (1995) Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Infect Dis* 171, 516-518

Pfefferkorn, E. R., Pfefferkorn, L. C. (1977a) *Toxoplasma gondii*: Specific labeling of nucleic acids of intracellular parasites in Lesch-Nyhan cells. *Exp Parasitol* 41, 95-104

Pfefferkorn, E. R., Pfefferkorn, L. C. (1977b) Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool* 24 (3), 449-453

Pfefferkorn, E. R., Eckel, M., Rebhun, S. (1986) Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblast through starvation for tryptophan. *Mol Bioch Parasitol* 20, 215-224

Pfefferkorn, E. R. (1990) The cell biology of *Toxoplasma gondii*. *Modern Parasite Biology: cellular, immunological and molecular aspects*. (Wyler, D. J., Ed), pp. 26-50. Freeman, New York

Pfeiffer, S. E., Herschman, H. R., Lightbody, J., Sato, G. (1970) Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. *J Cell Physiol*, Jun; 75 (3): 329-339

Pfeiffer, S. E., Herschman, H. R., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. (1971) Modifications of cell surface antigenicity as a function of culture conditions. *J Cell Physiol*, Aug; 78 (1): 145-152

Porter, S., Sande, M. A., (1992) Toxoplasmosis in the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 327, 1643-1648

Remington, J. S., Desmonts, G. (1990) Toxoplasmosis, p. 89-195. In Remington, J. S., Klein, J. O. (ed), *Infectious disease of the fetus and newborn infant*. The W. B. Saunders Co., Philadelphia

Richler, C., Yaffe, D., (1970) The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol* 23, 1-22

Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G. K., Kissinger, J. C., Klimczak, L. J., Striepen, B. (1999) Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Op Microbiol*, 2: 426-432

Reiter-Owona, I., Seitz, H., Gross, U., Sahm, M., Rockstroh, J. K., Seitz, H. M. (2000) Is stage conversion the initiating event for reactivation of *Toxoplasma gondii* in brain tissue of AIDS patients? *J Parasitol* Jun; 86(3): 531-536

Schlüter, D., Lohler, J., Deckert, M., Hof, H., Schwendemann, G., (1991) *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterization of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene product. J Neuroimmunol 31, 185-198

Schlüter, D., Hein, A., Dörries, R., Deckert-Schlüter, M. (1995) Different subset of T cells in conjunction with natural killer cells, macrophages, and activated microglia participate in the intracerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. Am J Pathol 146, 999-1007

Scholer, N., Krause, K., Kayser, O., Muller, R. H., Borner, K., Hahn, H., Liesenfeld, O. (2001) Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother Jun; 45 (6): 1771-1779

Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W., Brandt, B. L., (1974) Clonal cell lines from the rat central nervous system. Nature 249 : 224-227

Shrikant, P., Beneviste EN. (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. J Immunol Sep 1; 157 (5) : 1819-22

Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y., Krahenbuhl, J. L. (1991) Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antiplasmal activity of IFN- $\gamma$  primed macrophages. J Immunol 147, 2340-2345

Sims, T. A., Hay, J., Talbot, I. C. (1989) An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. Br J Exp Path 70, 317-325

Smith, J. E., McNei, G., Zhang, Y. W., Dutton, S., Biswas-Hughes, G., Appleford, P. (1996) Serological recognition of *Toxoplasma gondii* cyst antigens.

*Toxoplasma gondii*, Ed. Gross, U., Springer-Verlag Berlin Heidelberg S. 67-76

Soëte, M., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1994) Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol* 78, 361-370

Stallcup, W. B. (1988) Involvement of gangliosides and glycoprotein fibronectin receptors in cellular adhesion to fibronectin. *Exp Cell Res*, Jul; 177 (1): 90-102

Steimle, V., Siegrist, C., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B., Mach, B. (1994) Regulation of MHC class 2 expression by interferon-gamma mediated by the transactivator C2TA. *Science* 265, 106-109

Streit, W. J., Graeber, M. B., Kreutzberg, G. W. (1988) Functional plasticity of Microglia: A Review. *Glia* 1: 301-307

Streit, W. J., Kincaid-Colton, C. A. (1995) The Brain's immune System. *Scientific American* Nov 38-43

Subauste, C. S., Koniarsi, A. H., Remington, J. S. (1991) Murine CD8+ cytotoxic T-lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol* 147: 3955

Subauste, C. S., Remington, J. S. (1991) Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 58-67

Suzuki, Y., Orellana, MA., Schreiber, RD., Remington, JS. (1988) Interferon- $\gamma$ . The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-518

Suzuki, Y., Yang, Q., Yang S., Nguyen, N., Lim, S., Liesenfeld, O., Kojima, T., Remington, J. S. (1996) IL4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. *J Immunol* 157, 2564-2569

Suzuki, Y., (2002) Host resistance in the Brain against *Toxoplasma gondii*. *J Inf Dis* 185 (Suppl.1), S58-S65

Tomavo, S., Boothroyd, J. C. (1995) Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* Nov;25(11):1293-9

Topp, W. C. (1981) Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* 113, 408-411

Tyndale, R. F., Hales, T. G., Olsen, R. W., Tobin, A. J. (1994) Distinctive patterns of GABAA receptor subunit mRNAs in 13 cell lines. *J Neurosci* Sep; 14 (9): 5417-5428

Vidovic, M., Sparacio, S. M., Elovitz, M., Beneviste, E. N. (1990) Induction and regulation of class 2 major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Neuroimmunol* 30, 189-200

Weber, E., Jilling, T., Kirk, K.L. (1996) Distinct functional properties of Rab3A and Rab3B in PC12 neuroendocrine cells. *J Biol Chem* Mar 22;271(12):6963-71

Williams, R. K., Goridis, C., Akeson, R. (1985) Individual neural cell types express immunologically distinct N-CAM forms. *Cell Biol*, Jul; 101 (1): 36-42

Wong, J., Gold, W. M., Brown, A. E., Lange, R., Fried, M., Grieco, D., Mildvan, J., Giron, M. L., Tapper, C., Lerner, C. (1984) Central-nervous-system-toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. *Ann Intern Med* 100: 36-42

Yaffe, D. (1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 61, 477-483

Zimmer, C., Weissleder, R., Poss, K., Bogdanova, A., Wright, S. C. Jr., Enochs, W. S., (1995) MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas. Radiology Nov; 197 (2): 533-538

**7. Abkürzungen**

Ak	Antikörper
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
h	Stunde
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mAk	monoklonaler Antikörper
NGF	nerve-growth-factor
NMMA	N-monomethyl-L-Arginin
NO	Nitrooxid
PBS	Phosphat-Pufferlösung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
ZNS	Zentralnervöses System

## **Danksagung**

Hiob Kap. 38-42

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die permanente persönliche Ermutigung während dieser Arbeit und für ihre Geduld.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Groß für die Überlassung des interessanten Themas und seiner stets freundliche Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. C. Lüder für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. R. Gold danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

## Lebenslauf

von Tobias Michael Abele

Stuttgart, Juni 2002

Wohnhaft: Vogelsangstr. 76  
70197 Stuttgart

Geburt: 05.06.1972 in Besigheim

Vater: Eberhard Karl Abele

Mutter: Margrit Abele geb. Knoll

1978 – 1982 Grund- und Hauptschule Besigheim

1982 – 1988 Realschule Besigheim

1988 – 1991 Wirtschaftsgymnasium Bietigheim-Bissingen

Juli 1991 – September 1992:

Grundwehrdienst

Sanitätsdienst Horb am Neckar bzw. Ludwigsburg

Studium der Medizin:

Mai 1993 – April 1994

Ludwig-Maximilian Universität München

Mai 1994 – Oktober 1999

Julius-Maximilian Universität Würzburg

Oktober 1999 – Oktober 2000

Eberhard Karls Universität Tübingen  
Medizinisch-praktisches Jahr

Kinderheilkunde

Olgahospital Stuttgart

Chirurgie

Diakonissenkrankenhaus Stuttgart

Innere Medizin

Diakonissenkrankenhaus Stuttgart

November 2000

3. Staatsexamen

Dezember 2000 – Mai 2002

Arzt im Praktikum  
Chirurgische Klinik  
Diakonissenkrankenhaus Stuttgart

Gez T. Abele