

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte**

Brutschränke	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	Aristoplan DM IMB, Leitz, Wetzlar
Gel-Dokumentationsanlage	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammer für EMSA	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelelektrophoresekammer für Immunblot	Modell Mini-Protean II, BioRad, München
pH-Meter	Modell pH 530, WTW, Weilheim
Reagenzglasschüttler	Reax 2000, Heidolph, Kehlheim
Semi-Dry-Blotter	Sartorius, Göttingen
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech, Freiburg Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Sterilbank	Gelaire BSB 6A, Flow Laboratories
Thermomixer	Modell 5436 Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Cell Disruptor B 15, Branson Sonifier, Dietzenbach
UV-Lampe	NU-4KL Faust, Konrad Benda, Wiesloch
Waagen	Feinwaage: Research R 160 P, Satorius, Göttingen SAC 62, Satorius, Göttingen
Konfokales Laserscan-Mikroskop	Modell TCS 40, Leica, Heidelberg
Zellkulturmikroskop	Labovert FS, Leitz, Wetzlar
Zentrifugen	Omnifuge 2.0 ORS, Heraeus, Hanau Modell 5417 R, Eppendorf, Hamburg

## 2.1.2 Medien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

### 2.1.2.1 Medien und deren Zusätze

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit 300 mg/l L-Glutamin und 2 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Dulbecco's MEM (DMEM) Medium mit 580 mg/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Natrium-Pyruvat, 100 mM

Penicillin/Streptomycin, 10.000 U / 10.000 µg/ml

Foetales Kälberserum (FCS)

Pferdeserum

EDTA (Versen) 1% (w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

Trypsin (1:250) 0,25% (w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

Alle Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin bezogen.

### 2.1.2.2 Zelllinien

Humane histiozytische Lymphomzellen (U937), (European Collection of Cell Cultures, ECACC No: 85011440)

Humane promyelozytische Leukämiezellen (HL-60, American Type Culture Collection, ATCC CCL-240)

PC-12 Neuronalzellen (Präochromozytomazellen der Ratte, ECACC No: 88022401)

Murine L929-Fibroblasten

Humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF)

HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinomzellen), ECACC 86090201

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen:

Nunc, Roskilde, Dänemark; Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg; Corning/Costar, Bodenheim; Greiner, Frickenhausen.

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

6-Aminocapronsäure	Fluka, Neu-Ulm
Actinomycin D	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Adenosin	Calbiochem, Novabiochem
Agarose	Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz	Sigma, Deisenhofen
4-Aminopyridin	Alexis Biochemicals, Grünberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammonium Persulfat (APS)	BioRad, München
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
C <sub>2</sub> -Ceramid	Biomol, Hamburg
C <sub>8</sub> -Ceramid	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Colchicin	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DNA Purification Resin	Promega, Mannheim
Enhanced Chemiluminescence (ECL)-kit	Amersham Buchler, Braunschweig
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Gliotoxin	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidin Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
Hexadecyltrimethylammonium Bromid	Sigma, Deisenhofen

---

Hepes-Puffer	Biochrom KG, Berlin
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
LY 294002	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (Allgäu)
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker für Western-Blot, Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Schwalbach, Taunus
Mowiol	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
NaCl	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat (NaDOC)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Orthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt
Nerve Growth Faktor (NGF)	Boehringer, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Poly-DL-Ornithin Hydrobromid	Sigma, Deisenhofen
Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly(I)-poly(C))	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ponceau S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
Proteingewichts-Marker	New England Biolabs, Beverly, USA
Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine, BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNAse A	Sigma, Deisenhofen
Rothiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt

Saponin	Sigma, Deisenhofen
SDS, Natriumdodecylsulfat	ICN Biomedicals Inc., Aurora Ohio, USA
Sphingomyelinase	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Temed	Serva, Heidelberg
Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	Boehringer, Mannheim
Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan (=Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Boehringer, Mannheim
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wizard Plus Minipreps, DNA Purification System	Promega, Mannheim
Wortmannin	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.4 Antikörper

Maus anti-human Fas-IgM, (m)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
Kaninchen anti Toxoplasma-Serum (p)	-
Maus anti Cytochrom c (m), Maus IgG <sub>1</sub> , Klon 6H2.B4	PharMingen, Hamburg
Cy2-(Carbocyanin-)konjugiertes Esel-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment anti Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Cy3-(Indocarbocyanin-)konjugiertes Esel (ab') <sub>2</sub> -Fragment anti Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg

Cy3-konjugiertes Esel-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment anti Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Cy5-(Indodicarbocyanin-)konjugiertes Esel-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment anti Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Anti-human GM-CSF monoklonaler neutralisierender IgG-Antikörper aus der Maus, Klon 3209.1	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IgG <sub>1</sub> Isotyp-Kontrollantikörper Klon 11711.11	R&D Systems, Wiesbaden
Actin (m)	Calbiochem, Bad Soden
HSP60 (p)	StressGen, Victoria, Canada
Bcl-2 (m)	Calbiochem, Bad Soden
Caspase 3 (p)	PharMingen, Hamburg
Caspase 8 (p)	PharMingen, Hamburg
Caspase 9 (p)	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
Cytochrom c (m)	PharMingen, Hamburg
PARP, Clone C2-10 (m)	PharMingen, Hamburg
Proteinkinase c $\delta$ , nPKC $\delta$ (C20), (p)	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
Mcl-1 (p)	PharMingen, Hamburg
Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Ziege anti Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg

(m): monoklonal, (p): polyklonal, H+L: schwere und leichte Kette (heavy and light chain)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultur und Isolierung von *T. gondii*

*T. gondii*-Tachyzoiten des maus-avirulenten Stammes NTE (Groß et al., 1991) und des maus-virulenten Stammes RH (Sabin, 1941) wurden in murinen L929-Fibroblasten als Wirtszellen vermehrt. Wirtszellen und Parasiten wurden auf 12-Lochplatten in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und in RPMI 1640, supplementiert mit 1% hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Kurz vor der vollständigen Lyse der Wirtszellen wurden die Parasiten auf frische Wirtszellen umgesetzt.

Zur Gewinnung isolierter Toxoplasmen für Infektionsversuche wurden Tachyzoiten aus frisch lysierten L929-Kokulturen geerntet. Kontaminierende Wirtszellen wurden bei 35 x g für 5 min sedimentiert und die Tachyzoiten anschließend aus dem Überstand bei 1300 x g für 10 min abzentrifugiert. Die Anzahl isolierter Toxoplasmen wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### 2.2.1.2 Kultur der Wirtszelllinien

Murine L929-Fibroblasten wurden auf 6-Lochplatten in DMEM mit 5% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 110 µg/ml Natrium-Pyruvat kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Untergrund gelöst, gründlich resuspendiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:10 in neues Medium überführt.

Humane histiozytische Lymphomzellen (U937) und humane promyelozytische Leukämiezellen (HL-60) wurden in RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in 200 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Sie wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:6 in frisches Medium übertragen und höchstens bis zu einer Passagenzahl von 16 verwendet. HL-60-Zellen wurden vor allen Versuchen für 16-24 h mit 5 nM Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) in RPMI 1640 Medium (s.o.) vorinkubiert, um sie adhären zu lassen. Dadurch waren sie für die Untersuchung im Immunfluoreszenztest (IFT) gut geeignet. Vor Versuchsbeginn wurde das PMA durch dreimaliges Spülen mit RPMI 1640 Medium entfernt.

Humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) wurden in DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 110 µg/ml Natrium-Pyruvat in 200 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Bei Konfluenz wurden sie vom Untergrund abgeschabt und im Verhältnis 1:10 in neues Medium überführt.

HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinomzellen) wurden in DMEM mit 5% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 110 µg/ml Natrium-Pyruvat in 200 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 1 ml 1% EDTA in PBS gespült und dann mit 1 ml 0,25% Trypsin in PBS inkubiert, bis sie vollständig vom Untergrund abgelöst waren. Anschließend wurden sie in 10 ml DMEM Medium (s.o.) überführt, bei 400 x g für 5 min herunterzentrifugiert und dann im Verhältnis 1:6 mit neuem Medium in Zellkulturflaschen subkultiviert.

PC-12 Neuronalzellen (Phäochromozytomzellen der Ratte) wurden in 200 ml Zellkulturflaschen in RPMI 1640, supplementiert mit 5% FCS, 10% Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert und einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 bis 1:4 subkultiviert. Für Infektionsversuche wurden Objektträger mit vier Zellkulturkammern (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) über Nacht mit 0,5 mg/ml Poly-DL-Ornithin Hydrobromid in 150 mM Borsäure-NaOH, pH 8,3, inkubiert und drei mal mit PBS gewaschen. In die vorbehandelten Zellkulturkammern wurden jeweils  $2 \times 10^5$  PC-12-Zellen ausgesät.

Zur Ausbildung von Neuriten wurde dem Medium 50 ng/ml Nerve-Growth-Factor 2,5S (NGF 2,5S, Boehringer, Mannheim) zugesetzt. Zur Apoptoseinduktion durch NGF-Entzug wurden die Zellen viermal in RPMI 1640 (s.o.) ohne FCS oder Pferdeserum gewaschen und dann in demselben Medium inkubiert.

Alle oben genannten Wirtszelllinien wurden, wenn nicht anders beschrieben, zweimal pro Woche passagiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **2.2.1.3 Isolierung und Kultur von murinen Knochenmarksmakrophagen (KMM)**

Murine Knochenmarksmakrophagen wurden aus den Oberschenkeln weiblicher 2-4 Monate alter Balb/c Mäuse (Charles River Wiga, Sulzfeld) mit je 7 ml RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin und 2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>, supplementiert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin mittels einer 0,45 x 12 mm Kanüle in Petrischalen gespült. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und grobe Partikel für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und die Knochenmarkszellen 5 min bei 400 x g abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurde die Anzahl lebender Zellen durch Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (s.o.) mit 25% L929-Zellkulturüberstand als Quelle von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) resuspendiert und in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Loch in 24-Lochplatten auf runden Deckgläschen mit 13 mm Durchmesser ausgesät. Nach drei Tagen wurde ein 50%iger Medienwechsel durchgeführt und nach weiteren drei Tagen das Medium komplett abgesaugt und durch RPMI 1640 ohne L929-Überstand ersetzt. Am nächsten Tag waren die nun ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen für den Versuch einsetzbar. Zur Bestimmung der Anzahl ausdifferenzierter adhärenter KMM wurde ein Deckgläschen in PBS gewaschen und die Zellen in 300 µl Färbelösung (1% Hexadecyltrimethylammonium Bromid, 0,05% Amidoschwarz und 0,1 M Zitronensäure in H<sub>2</sub>O) lysiert. Die isolierten, gefärbten Zellkerne wurden nun in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Gesamtzellzahl pro Deckgläschen bestimmt.

Zur Gewinnung von L929-Überstand wurden L929 Zellen zunächst bis zur Konfluenz in RPMI 1640 mit 10% FCS (s.o.) kultiviert. Nach Isolierung der Zellen wurden sie mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  L929 pro ml in RPMI 1640 Medium (s.o.) in 800 ml Zellkulturflaschen ausgesät und für 6-8 Tage inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, steril filtriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden Zellsuspensionen mit einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml des entsprechenden Zellkulturmediums mit demselben Volumen Einfriermedium (40% Zellkulturmedium der jeweiligen Zelllinie, 40% FCS, 20% Dimethylsulfoxid (DMSO)) gemischt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden dann über Nacht in einem Styroporblock auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut und dann zügig in 30 ml warmes Zellkulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei  $400 \times g$  abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

#### **2.2.1.5 Induktion von Apoptose und Infektion mit *T. gondii***

Zur Infektion der oben aufgeführten permanenten Wirtszelllinien bzw. Primärzellen wurden *T. gondii*-Tachyzoiten wie unter 2.2.1.1 beschrieben isoliert und im Parasit-Wirtszellverhältnis von 4:1 bis 30:1 zu den Wirtszellen gegeben. 30-60 min nach Infektion wurden die Wirtszellen zur Induktion von Apoptose den in Tabelle 1 zusammengefassten Behandlungen unterzogen. Die Inkubationszeiten betragen zwischen 1 und 48 Stunden nach Apoptoseinduktion. Es wurden jeweils vier Ansätze parallel inkubiert: Uninfizierte Kontrollzellen ohne Apoptoseinduktion, infizierte

Kontrollzellen ohne Apoptoseinduktion, uninfizierte Zellen mit Apoptoseinduktion und infizierte Zellen mit Apoptoseinduktion.

**Tabelle 1.** Verwendete Apoptoseinduktoren

Wirtszellen	Apoptose-Induktion	Konzentration	Inkubationsdauer
HL-60	Actinomycin D	0,1-5 µg/ml	2-48 h
	C <sub>8</sub> -Ceramid	1-100µM	3-24 h
	α (TNF-α)	1-25 ng/ml	8-12 h
	α-Fas-Antikörper	1-2 µg/ml	4-24 h
	Sphingomyelinase	100 mU/ml	2-24 h
	C <sub>2</sub> -Ceramid	10 µM	4-24 h
U937	Sphingomyelinase	100 mU/ml	4-8 h
	TNF-α + Cycloheximid	40 ng/ml + 2 µg/ml	8 h
Murine Knochenmarks-makrophagen	Gliotoxin	0,1-10 µM	3-24 h
	TNF-α	5 ng/ml	3-24 h
HeLa	Actinomycin D	1-5 µg/ml	4-24 h
	Staurosporin	0,1-2,0 µM	4-8 h
L929	Actinomycin D	0,05- 5µg/ml	3-48 h
	Adenosin	1 mM	3-48 h
	Colchicin	10-100 µg/ml	3-48 h
	C <sub>8</sub> -Ceramid	10-100 µM	3-48 h
	Gliotoxin	1-10 µmol/l	1-8 h
	TNF-α	1-25 ng/ml	4-48 h
Humane Vorhaut-fibroblasten (HFF)	Actinomycin D	5 µg/ml	8 h
	TNF-α + CHX	40 mg/ml + 2 µg/ml	8 h
	Staurosporin	0,5-1 µM	4-8 h
PC-12	Entzug von Nerve Growth Factor (NGF)	-	42 h

### 2.2.2 Hitzeinaktivierung und UV-Bestrahlung von *T. gondii*

Für Versuche mit hitzeinaktivierten *T. gondii* wurden  $1 \times 10^7$  frisch isolierte Parasiten pro ml Zellkulturmedium für 15 min bei 60°C inkubiert (Sibley et al., 1985). Zur Inhibierung der Parasitenreplikation wurden  $1 \times 10^7$  *T. gondii* pro ml für eine Minute aus einer Entfernung von 20 cm mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Endo et al., 1981).

### 2.2.3 Herstellung von *T. gondii*-Antigenlysat

Zur Herstellung von *T. gondii*-Antigenlysaten wurden *Toxoplasma*-Tachyzoiten mit HFF-Zellen kokultiviert. Nach weitgehender Lyse der Wirtszellen wurden kontaminierende HFF-Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 35 x g abzentrifugiert und der Überstand zusätzlich mit einem Nucleopore-Filter mit 3,0 µm Porengröße (Corning) und Vorfilter filtriert um Zellreste von den Toxoplasmen zu trennen. Das Filtrat wurde für 10 min bei 1300 x g zentrifugiert und das Toxoplasmen-Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Parasitenmenge durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Toxoplasmen für 5 min bei 2700 x g pelletiert und dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

Die pelletierten Toxoplasmen von mehreren Ansätzen wurden in PBS resuspendiert und vereinigt. Die Parasiten wurden nun abwechselnd in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurden sie für 10 min auf Eis mit einem Ultraschall-Zellhomogenisator (Branson Sonifier) bei einem Unterbrechungszyklus von 30% auf Stufe 3 weiter aufgeschlossen und dann für 20 min auf Eis ruhen gelassen. Nach einer weiteren Ultraschallbehandlung (wie oben) wurde das Lysat bei 20800 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als PBS-lösliches Antigenlysat abgenommen und das Pellet in 500µl 1% Natrium-Deoxycholat (NaDOC) in PBS aufgenommen und ein weiteres Mal ultraschallbehandelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 20800 x g für 20 min bei 4°C wurde der Überstand als NaDOC-lösliches Antigenlysat abpipettiert. Beide Antigenlysate wurden danach mit einem 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Proteingehalt wurde durch den BCA-Proteintest entsprechend den Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, IL) mit BSA als Proteinstandard bestimmt. Zusätzlich wurde eine Sterilitätskontrolle durch Inkubation eines Aliquots in Zellkulturmedium für mehrere Tage durchgeführt.

### 2.2.4 DNS-Fragmentationstest

Während der Apoptose wird die DNS zwischen den Nukleosomen gespalten, wodurch Bruchstücke von ca. 180 Basenpaaren und Vielfachen davon entstehen. Diese können beim DNS-Fragmentationstest auf einem Agarosegel als sogenannte apoptotische Leiter sichtbar gemacht werden. Dieser Test wurde nach dem Protokoll von Eldadah et al. (1996) durchgeführt. Zur Isolierung der genomischen DNS wurden pro Versuchsansatz  $2 \times 10^6$  Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und dann mit 2 ml 7 M Guanidin-Hydrochlorid lysiert. Je 1 ml DNS-Purification-Resin (Promega, Mannheim) wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit dem Lysat vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min wurde das Pellet in 3 ml Waschlösung resuspendiert und mittels Vakuum durch eine DNS-Aufreinigungssäule (Wizard Minicolumn, Promega) gesaugt. Die Säule wurde zweimal mit Waschlösung gewaschen und anschließend bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNS erfolgte durch Inkubation der Säule mit 30 µl TE-Puffer für 5 min und anschließender Zentrifugation bei 5000 x g für 5 min. Im DNS-haltigen Eluat wurde kontaminierende RNS durch Inkubation mit 1 µg RNase A für 30 min bei 37°C verdaut. Die DNS wurde mit 10 x Auftragspuffer auf ein 1,5%iges Agarosegel, mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid, aufgetragen und in TAE-Puffer bei 100 V gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### Waschlösung für DNS-Fragmentationstest

90 mM NaCl  
9 mM Tris-HCl, pH 7,4  
2,25 mM EDTA  
55 % Ethanol

#### TAE-Puffer

40 mM Tris  
1% Essigsäure  
1 mM EDTA pH 8,0

#### 10x Auftragspuffer

0,07% Bromphenolblau  
33% Glycerin  
7% SDS  
in TES-Puffer

#### TES-Puffer

50 mM Tris  
5 mM EDTA  
50 mM NaCl, pH 8,0

### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

## 2.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

### 2.2.5.1 Apoptose- und *Toxoplasma*-Nachweis

Zum Nachweis von Apoptose wurde neben dem DNS-Fragmentationstest ein Immunfluoreszenztest (IFT) durchgeführt. Durch gleichzeitige Immunfluoreszenzfärbung der Toxoplasmen konnte dabei das Apoptoseverhalten der Wirtszellen auf individueller Zellebene in Abhängigkeit des Infektionsstatus' untersucht werden.

Dazu wurden adhärent wachsende Zelllinien oder Primärzellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch in 24-Lochplatten ausgesät, in die runde Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) gelegt worden waren. Nach Adhärenz der Zellen (16-24 h) erfolgte wie beschrieben (Punkt 2.2.1.5) die Infektion mit *Toxoplasma* bzw. die Apoptoseinduktion. Für den Immunfluoreszenztest wurden die Zellen nach Beendigung des Infektionsversuches für 30 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, mit PBS gespült und bis zur Immunfärbung bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS inkubiert, 5 Minuten in PBS gewaschen und mit 0,1 mg/ml Saponin, 1 % BSA in PBS (Saponin/BSA/PBS) für 1 Stunde permeabilisiert. Nach erneutem Waschen für 10 min mit 0,1 mg/ml Saponin in PBS (Saponin/PBS) wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Kaninchen anti-*Toxoplasma* Serum (1:5000) in Saponin/BSA/PBS inkubiert. Dazu wurden die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten auf einen 30 µl-Tropfen der Antikörperlösung auf Parafilm gelegt. Nach dreimaligem Waschen mit Saponin/PBS für jeweils 10 min wurden die Zellen für eine Stunde mit 15 µg/ml Cy<sub>2</sub>-(Carbocyanin-)konjugiertem Esel F(ab')<sub>2</sub> Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L) inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde danach dreimal mit Saponin/PBS und einmal mit PBS für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte der Apoptosenachweis entweder durch Färbung mit Hoechst

33258 oder durch den terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-Test (Boehringer, Mannheim).

Durch den Hoechst 33258-Farbstoff wird die DNS intensiv angefärbt, wodurch die Morphologie des Chromatins mikroskopisch beurteilt werden kann. Dabei führt die Färbung in nicht-apoptotischen Zellen zu einer gleichmäßigen Chromatinfärbung, wohingegen in apoptotischen Zellen der Zellkern durch die Kondensation des Chromatins stark granuliert ist. Für die Hoechst-Färbung wurden die Zellen für 30-60 min in 50 ng/ml Hoechst 33258 in PBS inkubiert und anschließend einmal für 5 min in PBS gewaschen.

Der TUNEL-Test beruht auf einer Markierung von DNS-Einzelstrangbrüchen, einem typischen Merkmal der DNS-Spaltung in apoptotischen Zellen. Mit Hilfe der Terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) wird dabei Fluorescein-markiertes dUTP an freie 3'-Enden der Einzelstrangbrüche angehängt, die dadurch fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Für den TUNEL-Test wurden die Zellen für eine Stunde in 20 µl TUNEL-Reagenz (Boehringer, Mannheim) auf Parafilm (s.o.) inkubiert und anschließend für 5 min in PBS gewaschen.

Sowohl nach der Hoechst- als auch der TUNEL-Färbung wurde die Gesamtpopulation der Zellen durch Propidiumjodid sichtbar gemacht, welches unspezifisch Nukleinsäuren anfärbt. Nach Inkubation mit 5 µg/ml Propidiumjodid in PBS für 5 min wurden die Zellen zweimal 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen kurz in entmineralisiertem Wasser gewaschen und dann mit 10 µl Mowiol pro Deckgläschen auf Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen für einige Stunden wurden die fertigen Präparate bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bei 4°C gelagert. Bei der Auswertung wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz ausgezählt und jeweils die Anzahl der apoptotischen, infizierten sowie der gleichzeitig apoptotisch und infizierten Zellen bestimmt.

### 2.2.5.2 Cytochrom c-Nachweis in apoptotischen und infizierten Zellen

Während der Apoptose wird Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transloziert. Um diesen Vorgang im IFT sichtbar zu machen, wurde bei der Markierung von Toxoplasmen mit dem Primärantikörper (s.o.) gleichzeitig 10 µg/ml monoklonaler Maus anti-Cytochrom c-Antikörper (Maus IgG<sub>1</sub>, Klon 6H2.B4, Pharmingen, Hamburg) zugegeben. Die Färbung mit dem Sekundärantikörper erfolgte wie oben beschrieben, zur Markierung des Cytochrom c-Antikörpers wurden zusätzlich 11 µg/ml Cy3-(Indocarbocyanin-)konjugiertes Esel-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment anti-Maus IgG (H+L) (Dianova, Hamburg) zugegeben. Apoptose wurde bei diesem IFT mit dem TUNEL-Test sichtbar gemacht.

### 2.2.6 Vitalitätsfärbung mit Trypanblau

Um Apoptose von Nekrose unterscheiden zu können, wurden bei jedem Experiment parallel Zellen jedes Versuchsansatzes mit 0,1% Trypanblau in PBS angefärbt. Aufgrund der intakten Plasmamembran können dabei apoptotische Zellen Trypanblau ausschließen und sind damit von den blau gefärbten nekrotischen Zellen deutlich unterscheidbar. Pro Ansatz wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz nekrotischer Zellen bestimmt.

### 2.2.7 Electromobility Shift-Assay mit NFκB-spezifischen Oligonukleotidproben

Die DNS-Bindungsaktivität nukleärer Extrakte infizierter und nicht-infizierter HL-60-Zellen nach Induktion von Apoptose mit ActD wurde durch den Electromobility Shift-Assay (EMSA) untersucht. Die Aufreinigung nukleärer Proteine wurde dabei im wesentlichen nach dem Protokoll von Marinovich et al. (1996) durchgeführt. 2 x 10<sup>6</sup> HL-60-Zellen pro Ansatz wurden für 30 s bei 15300 g zentrifugiert und das Pellet in 800

$\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurden 50  $\mu$ l einer 10% Nonidet P-40-Lösung zugegeben und 15 s stark geschüttelt. Nach Zentrifugation für 30 s bei 15300 x g wurde das die Zellkerne enthaltende Pellet in 50  $\mu$ l Puffer C resuspendiert, 20 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 15300 g zentrifugiert. Die Konzentration der im Überstand enthaltenen nukleären Proteine wurde durch den BCA Test nach Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, IL) mit BSA als Standardprotein bestimmt. Der Überstand wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

**Lysepuffer:**

10 mM Hepes, pH 7.8  
 10 mM KCl  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM DTT  
 0,1 mM EDTA  
 0,1 mM PMSF

**Puffer C:**

50 mM Hepes, pH 7.8  
 50 mM KCl  
 300 mM NaCl  
 0,1 mM EDTA  
 1 mM DTT  
 0,1 mM PMSF  
 10% (v/v) Glycerin

DTT und PMSF wurden jeweils frisch zugegeben.

Als Bindungspartner für nukleäres NF $\kappa$ B wurde ein radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid der entsprechenden Spezifität hergestellt. Dazu wurden je 1  $\mu$ l (50  $\mu$ M) des Plus- und Minusstranges mit 48  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gemischt, im Wasserbad auf 80°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

```

Plus-Strang:      5' AG TTG AGG GGA CTT 3'
                  |||  |||
Minus-Strang:    3' CCT GAA AGG GTC CG 5'
  
```

Danach wurden die Oligonukleotide mit dem Prime-It<sup>®</sup>II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) radioaktiv markiert. Dazu wurde das folgende

Reaktionsgemisch angesetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1 µl Stopmix (Prime-It®II, Stratagene) abgebrochen:

- 3,5 µl Oligonukleotid ( $\approx$  3.5 pmol)
- 4,0 µl 5 x Puffer (Prime-It®II, Stratagene)
- 10,0 µl Ampuwa
- 2,0 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Buchler, Braunschweig)
- 0,5 µl Klenow-Enzym (Prime-It®II, Stratagene)

Die radioaktiv markierte Oligonukleotidprobe wurde anschließend durch Ammoniumacetat/Ethanol-Präzipitation gefällt. Dazu wurde zu dem Markierungsgemisch zunächst 1 µg Poly(I)-poly(C) und anschließend 1/5 Volumen 5 M Ammoniumacetat in H<sub>2</sub>O und das 3-fache Volumen Ethanol zugegeben, gründlich gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach wurde das Präzipitat für 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert, das Pellet mit 80% Ethanol vorsichtig gewaschen, kurz bei 10000 x g abzentrifugiert, und anschließend im offenen Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Nach Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität wurde das Pellet in TE-Puffer mit ca. 50000 cpm/µl gelöst.

Die Bindungsreaktion zwischen nukleärem Extrakt und Oligonukleotidprobe wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 15 µl entsprechend dem folgenden Pipettierschema angesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert:

- 5 µg nukleärer Proteinextrakt
- 5 µl 3x Bindungspuffer (s.u.)
- 1 µg Poly(I)-poly(C)
- mit H<sub>2</sub>O auf 13 µl auffüllen
- 2 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid

In der Negativkontrolle wurden anstelle von nukleärem Extrakt 2 µl 10-fach-Auftragspuffer (s.u.) zugegeben, als Positivkontrolle dienten 10 µg nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen (Promega, Mannheim). Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Spezifität der

Bindungsreaktion als spezifischer Kompetitor unmarkiertes NF $\kappa$ B-Konsensus-Oligonukleotid (Promega) sowie als unspezifischer Kompetitor AP2-Konsensus-Oligonukleotid (Promega) mit 10  $\mu$ g HeLa-Extrakt aufgetragen.

Auf einem 7%igen Acrylamid-Gel (s.u.) von 2 mm Dicke und einer Größe von 14 x 15 cm wurden nach einem Vorlauf bei 200 V für eine Stunde die Proben bei ca. 150 V aufgetrennt bis die Front des Bromphenolblauamarkers 75% des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurde das Gel in Frischhaltefolie eingewickelt und gebundene bzw. nichtgebundene Oligonukleotide durch Autoradiographie auf Hyperfilm MP (Amersham Buchler, Braunschweig) sichtbar gemacht.

**3 x Bindungspuffer**

3 mM DTT  
3 mM EDTA  
60 mM HEPES  
150 mM KCL  
12% Ficoll

**10fach-Auftragspuffer für EMSA:**

250 mM Tris-HCl, pH 7,5  
0,2% Bromphenolblau  
40% Glycerin

**7% Acrylamid-Gel** (ca. 40 ml):

7 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)  
2,0 ml TBE Puffer 10x  
1250  $\mu$ l Glycerin 80%  
29,8 ml Ampuwa  
30  $\mu$ l TEMED  
300  $\mu$ l APS

**10 x TBE-Puffer**

0,9 M Tris  
0,9 M Borsäure  
20 mM EDTA, pH 8,0  
in H<sub>2</sub>O

### 2.2.8 SDS-Gelelektrophorese

*T. gondii*-induzierte Veränderungen verschiedener zellulärer Proteine, die bei der Regulation der Wirtszellapoptose beteiligt sein können, wurden durch Auftrennung von Proteinextrakten durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Immunblot untersucht. Dazu wurden pro Ansatz jeweils  $2 \times 10^6$  HL-60- bzw. U937-Zellen mit einem Zellschaber abgelöst oder abpipettiert, bei  $400 \times g$  für 5 min zentrifugiert und anschließend in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in  $50 \mu\text{l}$  radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer lysiert, für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert und die Extrakte bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min bei  $13000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde danach mit zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 gemischt, 5 min auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt und auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Parallel wurde ein Gemisch von Markerproteinen bekannten Molekulargewichts aufgetragen.

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen in  $0,75 \text{ mm}$  dicken Vertikalgelen durchgeführt. Für die Gelherstellung wurden zunächst die Trenngele mit 15% Polyacrylamid zum Nachweis von PARP und HSP60 oder 10% Polyacrylamid zum Nachweis aller anderen Proteine in die Gelkammern gegossen. Bis zur vollständigen Polymerisation der Trenngele wurden diese vorsichtig mit Butanol überschichtet. Nach Entfernen des Butanols durch gründliches Waschen wurde ein 4,4%iges Sammelgel auf das Trenngel aufgegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt.

Nach dem Probenauftrag erfolgte die Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen Laufpuffer bei 25 mA pro Gel für etwa 90 min bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreichte.

	<b>Trenngel, 10 %</b>	<b>Trenngel, 15 %</b>
2 M Tris-HCl, pH 8,8	0,94 ml	0,94 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30% (30/0,8)	1,67 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O (bidest.)	2,27 ml	1,43 ml
APS 10%	20 µl	20 µl
Temed	10 µl	10 µl

**Sammelgel, 4,4%:**

- 1,25 ml 0,5 M Tris, pH 6,8
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,73 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
- 0,4 ml H<sub>2</sub>O (bidest.)
- 12,5 µl APS 10%
- 10 µl Temed
- 8 µl 1% Bromphenolblau

**Laufpuffer (Lämmli-Puffer)**

- 25 mM Tris, pH 8,3
- 0,2 M Glycin
- 0,1% SDS
- in H<sub>2</sub>O

**Zweifach-Probenpuffer:**

- 20 % Glycerin
- 65 mM Dithiothreitol (DTT)
- 4 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
- 0,004 % Bromphenolblau
- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- in H<sub>2</sub>O

**RIPA-Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH 7,4	1 mM PMSF
150 mM NaCl	1 µg/ml Aprotinin
1% Triton X-100	10 µg/ml Leupeptin
0,5% NaDOC	1 µg/ml Pepstatin A
0,1% SDS	1 mM Na-Orthovanadat

### 2.2.9 Western-Blotting und Immunfärbung

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Semi-Dry-Blotting (Kyhse-Andersen, 1984) elektrophoretisch auf Nitrocellulose(NC)-Membranen (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham Buehler, Braunschweig) übertragen.

Die Transfereinheit war dabei wie folgt aufgebaut:

- Graphitelektrode (Kathode)
- 9 Whatman Filterpapiere getränkt in 40 mM 6-Aminocapronsäure, pH 7,6, 20% Methanol
- SDS-PAGE-Gel
- Nitrozellulose (NC)-Membran
- 3 Filterpapiere getränkt in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% Methanol
- 6 Filterpapiere getränkt in 0,3 M Tris-HCl, pH 10,4, 20% Methanol
- Graphitelektrode (Anode)

Die Proteine wurden bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Transferfläche für 90 min auf die NC-Membran übertragen. Zur Kontrolle des Transfers der Proteine wurde die Membran anschließend für 2 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser entfärbt. Mittels dieser Färbung konnte zusätzlich die gleichmäßige Beladung aller Spuren mit Proteinhomogenisaten kontrolliert werden.

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte durch Immunfärbung der NC-Membran mit dem ECL-System (enhanced chemiluminescence, Amersham). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in Blockierreagenz inkubiert. Nach dem Waschen für einmal 15 min und zweimal 5 min in Waschlösung wurde die NC-Membran für 90 min mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2) in der angegebenen Konzentration in Inkubationsreagenz inkubiert. Nach erneutem Waschen (wie oben) wurde für 1 h mit dem Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen oder Ziege anti-Maus IgG (H+L), Dianova, Hamburg) in Inkubationsreagenz inkubiert.

Anschließend wurde intensiv mit Waschlösung gewaschen, d.h. mindestens einmal 15 min und viermal 5 min. Die Membran wurde für 1-2 Minuten mit ECL-Reagenz inkubiert, überschüssiges Reagenz entfernt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Anschließend wurde die NC-Membran auf Hyperfilm ECL (Amersham Buchler, Braunschweig) exponiert.

Alle Western-Blots wurden zwei oder drei mal durchgeführt.

### Waschlösung:

0,05 % Tween-20 in PBS, pH 7,4

### Blockierreagenz für Immunoblot:

5% Magermilchpulver

0,2 % Tween-20

0,02 % NaN<sub>3</sub>

in PBS, pH 7,4

### Inkubationsreagenz:

5% Magermilchpulver

0,05 % Tween-20

in PBS, pH 7,4

**Tabelle 2.** Für Immunblotting eingesetzte Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Herkunft	Gel (% Acrylamid)
Actin (m)	1:100	M	15
HSP60 (p)	1:1000	K	10
Bcl-2 (m)	3 µg/ml	M	15
Caspase 3 (p)	1:1500	K	15
Caspase 8 (p)	1:250	M	15
Caspase 9 (p)	2 µg/ml	K	15
Cytochrom c, Clone 7H8.2C12 (m)	2 µg/ml	M	15
Proteinkinase c, nPKC δ (C20), (p)	1:2000	K	15
PARP, Clone C2-10 (m)	1:2000	M	10
Mcl-1 (p)	1:1000	K	15

M: aus der Maus; K: aus dem Kaninchen; m: monoklonal; p: polyklonal

Alle monoklonalen Antikörper sind IgG-Antikörper, außer Actin (IgM), welches als Kit mit entsprechendem Sekundärantikörper geliefert wurde.

### **2.2.10 Nachweis der subzellulären Verteilung von Cytochrom c im Immunblot**

Um die subzelluläre Verteilung von Cytochrom c in infizierten und nicht-infizierten Zellen nach Induktion von Apoptose zu untersuchen, wurden mitochondriale und zytosolische Fraktionen von HL-60- und U937-Zellen nach dem Protokoll von Single et al., (1998) isoliert. Dazu wurden  $4 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in 125  $\mu$ l PBS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 150  $\mu$ g/ml Digitonin in 500 mM Saccharose in H<sub>2</sub>O lysiert. Nach 30 s auf Eis wurde die mitochondriale Fraktion von der zytosolischen durch Zentrifugation bei 14000 x g für 60 s bei 4°C abgetrennt. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde in 50  $\mu$ l RIPA-Puffer (siehe Punkt 2.2.8) resuspendiert und wie beschrieben weiterverarbeitet. Der Überstand, welcher der zytosolischen Fraktion entsprach, wurde direkt mit Zweifach-Auftragspuffer im Verhältnis 1:2 vermischt, aufgekocht und auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach elektrophoretischem Transfer der separierten Proteine auf eine NC-Membran wurde die Immunfärbung wie beschrieben durchgeführt.

### **2.2.11 Inhibierungsversuche von Mcl-1**

Um die Bedeutung der parasiten-induzierten Veränderung der Mcl-1-Expression in der Wirtszelle zu untersuchen, wurde das Apoptoseverhalten infizierter und nicht-infizierter Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Mcl-1-Inhibitoren untersucht. Dazu wurden HL-60-Zellen in 24-Loch-Platten auf Deckgläschen wie beschrieben (Punkt 2.2.5) ausgesät. Ein bis zwei Stunden vor Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit Mcl-1-Inhibitoren wie unten angegeben behandelt. Danach wurden behandelte und unbehandelte Kontrollzellen mit *T. gondii* wie beschrieben (Punkt 2.2.1.5) infiziert und 30 min später mit 5  $\mu$ g/ml ActD behandelt. Die Zellen wurden wie in Tabelle 3 beschrieben mit verschiedenen Mcl-1-Inhibitoren und einem neutralisierendem Antikörper behandelt. Der Zeitpunkt der Inhibitorzugabe wurde aus der Literatur übernommen (Wang et al., 1999a; Wang et al., 1999b).

**Tabelle 3**

Mcl-1-Inhibitor	Konzentration	Zeitpunkt der Zugabe
4-Aminopyridin	0,5, 2 und 4 mM	1 h vor Apoptoseinduktion
Wortmannin	0,05, 0,1 und 0,25 $\mu$ M	2 h vor Apoptoseinduktion
LY 294002	25, 50 und 100 $\mu$ M	2 h vor Apoptoseinduktion
anti-GM-CSF Antikörper	0,5, 2,5 und 15 $\mu$ g/ml	30 min vor Apoptoseinduktion

Da Wortmannin und LY 294002 in DMSO gelöst waren, wurden als Kontrolle für diese Inhibitoren Parallelansätze mit DMSO in den entsprechenden Konzentrationen angesetzt. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-GM-CSF Antikörpers wurden jeweils Parallelansätze mit einem Isotyp-Kontrollantikörper in den gleichen Konzentrationen durchgeführt. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen durch IFT auf Apoptose und Toxoplasmen-Infektion wie beschrieben (Punkt 2.2.5) untersucht.

### 2.2.12 Statistik

Für die Auswertung der IFTs wurden jeweils mindestens 500 Zellen pro Ansatz ausgezählt. Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Zur Signifikanzprüfung zwischen Mittelwerten unterschiedlicher Behandlungsgruppen wurde der Student's t-Test angewandt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant beurteilt.