

5 ZUSAMMENFASSUNG

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der alle kernhaltigen Zellen warmblütiger Vertebraten infizieren kann und in seinem Wirt eine lebenslang persistierende, meist asymptomatische Infektion hervorruft. Die Integrität der Wirtszellen dürfte dabei für das langfristige Überleben dieses Pathogens von Bedeutung sein. Wir untersuchten daher den Einfluss von *T. gondii* auf den programmierten Zelltod (Apoptose) seiner Wirtszellen.

In humanen HL-60- und U937-Zellen war nach Infektion mit *T. gondii* gegenüber nicht-infizierten Kontrollen die Apoptoserate nicht erhöht. Nach Behandlung von HL-60-Zellen mit Actinomycin D bzw. von U937-Zellen mit TNF- α und Cycloheximid war dagegen in nicht-infizierten Zellen eine deutliche Induktion von Apoptose festzustellen. Diese *in vitro* induzierte Apoptose war jedoch nach gleichzeitiger Infektion mit *T. gondii* stark vermindert. Dabei konnte durch Immunfluoreszenzuntersuchungen auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass vor allem parasit-positive HL-60-Zellen einer infizierten Kultur signifikant vor dem programmierten Zelltod geschützt waren.

Um die physiologischen Voraussetzungen des Parasiten zur Inhibierung der Wirtszellapoptose zu untersuchen, wurden HL-60-Zellen mit unbehandelten, UV-bestrahlten oder hitzeinaktivierten Parasiten kultiviert oder mit unterschiedlichen *T. gondii*-Antigenextrakten inkubiert. Für den antiapoptotischen Effekt von *T. gondii* waren UV-bestrahlte Parasiten, welche die Wirtszellen aktiv invadieren, in diesen jedoch nicht mehr replizieren konnten, ausreichend. Abgetötete Parasiten oder Parasiten-Lysat hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Wirtszellapoptose. Offensichtlich muss *T. gondii* zur Inhibierung der Wirtszellapoptose die Wirtszelle also aktiv invadieren, jedoch nicht mehr replikationsfähig sein.

In weiteren Versuchen wurden die Mechanismen der *T. gondii*-induzierten Inhibierung der Wirtszellapoptose untersucht. Weder die Aktivierung des antiapoptotisch wirkenden Nukleären Faktors κ B (NF κ B) noch die Expression von Hitzeschockprotein (HSP) 60/65, das mit der Apoptoseinhibierung in infizierten

Makrophagen in Verbindung gebracht wird, wurde nach Infektion von HL-60-Zellen mit dem Parasiten verändert. Dagegen konnte nachgewiesen werden, dass *T. gondii* mit zentralen Komponenten der wichtigsten Apoptoseinduktionswege interferiert.

Von den Proteinen der Bcl-2-Familie, die eine wichtige regulatorische Funktion bei der Apoptose haben, wurde das antiapoptotisch wirkende Bcl-2 in HL-60-Zellen nicht beeinflusst. Dagegen wurde das ebenfalls antiapoptotisch wirkende Mcl-1 nach Infektion von HL-60- und U937-Zellen mit *T. gondii* und anschließender Apoptoseinduktion stärker exprimiert als in nicht-infizierten Kontrollkulturen. Eine Behandlung von HL-60-Zellen mit dem Mcl-1-Inhibitor LY 294002 führte tatsächlich zu einem Anstieg der ActD-induzierten Apoptose in parasit-positiven Zellen. Obwohl ein Anstieg der Apoptoserate auch in nicht-infizierten Zellen festzustellen war, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Mcl-1 an der parasiten-induzierten Apoptoseinhibierung beteiligt ist.

Die intrazelluläre Verteilung von Cytochrom c wurde in weiteren Versuchen untersucht. Dieses in der Mitochondrienmembran lokalisierte Protein gelangt nach Apoptoseinduktion in das Zytoplasma und aktiviert dort die Caspase 9. Diese Translokation kann durch Mcl-1 inhibiert werden. Wir konnten zeigen, dass die Translokation von Cytochrom c aus den Mitochondrien von HL-60-Zellen in das Zytoplasma nach Infektion mit *T. gondii* herunterreguliert wird: Sowohl in HL-60- als auch in U937-Zelllinien konnte nach Apoptoseinduktion im Vergleich zu nicht-infizierten, apoptotoseinduzierten Kulturen vermehrt inaktive Procaspase 9 nachgewiesen werden, was auf eine verminderte Aktivierung von Caspase 9 hindeutet. Ebenso wurde ihr Substrat, die als Effektorcaspase fungierende Caspase 3 nach Apoptoseinduktion in den beiden infizierten Zellkulturen schwächer aktiviert als in nicht-infizierten Kulturen.

Eine Besonderheit konnte für die Poly-(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), ein häufig als Apoptosemarker eingesetztes Substrat der Caspase 3, nachgewiesen werden. Nach Infektion mit *T. gondii* wurde die Expression von PARP unabhängig von der Apoptoseinduktion herunterreguliert. Dieser Effekt wurde hier zum ersten Mal nach Infektion mit einem intrazellulären Erreger beschrieben. Gleichzeitig wurde die nur noch schwach exprimierte PARP nach Infektion und anschließender

Apoptoseinduktion schwächer gespalten als in nicht-infizierten Kulturen nach Apoptoseinduktion. Zusammen mit der ebenfalls verminderten Spaltung der novel Proteinkinase C δ (nPKC δ), einem anderen Substrat der Caspase 3, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die verminderte Spaltung der Caspase 3 tatsächlich physiologische Bedeutung besitzt.

Zusammenfassend interferiert *T. gondii* also mit mindestens zwei zentralen Komponenten der Apoptoseregulation: Mcl-1 und PARP. Während die Beeinflussung von Mcl-1 auch die Regulation der weiter unten in der Signalkaskade angesiedelten Proteine Cytochrom c, Caspase 9, Caspase 3 und nPKC δ erklären könnte, ist die Herunterregulation von PARP ein zusätzlicher, bisher unbekannter Mechanismus. Zukünftige Untersuchungen müssen die funktionelle Bedeutung dieser beiden Mechanismen für die Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii* klären. Da *T. gondii* nur intrazellulär replizieren kann und ausserhalb seiner Wirtszelle schnell mit Antikörpern opsoniert und dann phagozytiert und abgetötet wird, könnte die Inhibierung der Wirtszellapoptose zum Überleben und zur Persistenz des Parasiten beitragen.